Фенотипическая характеристика штаммов хламидий, выделенных от человека и обезьян культуральным методом

О.Г. Гречишникова[1], В.В. Слободенюк[1], В.А. Алёшкин[1], Б.А. Лапин[2], С.С. Афанасьев[1], В.Ф.Ликов[3], Е.А. Воропаева[1], Э.К. Джикидзе[2], Ю.В. Несвижский[3], Н.В. Воложанцев[4], Н.Н. Полещук[4], Э.А. Светоч[4], И.А. Дятлов[4], М. С. Афанасьев[1], О.В. Рубальский[5], В.А. Метельская[1], А.Л. Байракова[1], Л.В. Рубанин[1], Е.А. Егорова[1], Е.О. Рубальский[5] З.Б. Квачёва[5], И.В. Евсегнеева[3], А.В. Караулов[3]

[1]Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва

[2]Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи-Адлер

[3]Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва

[4]Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск), Московская область

[5]Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

The phenotypical characteristic of chlamydia strains separated from humans and monkeys with the application of cultural method

O.G. Grechishnikova[1], V.V. Slobodenuk[1], V.A. Aleshkin[1], B.A Lapin[2], S.S. Afanasiev[1], V.F. Likov[3], E.A. Voropaeva[1], E.K. Jikidze[2], U.V. Nesvizskii[3], N.V. Vologanntsev[4], N.N. Poleschuk[4], E.A. Svetoch[4], I.A. Diatlov[4], M.S. Afanasiev[1], O.V. Rubalskii[5], V.A. Metelskaia[1], A.L. Bairakova[1], L.V. Rubanin[1], E.A Egorova[1], O.E. Rubalskii[5], Z.B. Kvacheva[5], I.V. Evsegneeva[3], A.V. Karaulov[3]

[1]G.N. Gabrichevskiy Research Institute of Epidemiology and Microbiology

[3]I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow

Анотация

Материалом для исследования служили 64 штамм хламидий (41 штамм от обезьян и 23 штамма от человека) полученных при различной патологии органов репродуктивного тракта, органов дыхания и зрения. Оптимизированы условия культивирования хламидий в культуре клеток. При детекции в культуре хламидий для повышения чувствительности культурального метода наряду с общепринятыми методами окраски клеток дополнительно применяли оригинальные мультиплексные ПЦР-тест-системы для видовой верификации Chl. pneumoniae и Ch. trachomatis, а также для верификации плазмид у штаммов Ch. trachomatis. Использование оригинальных ПЦР-тест-систем видовой детекции Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae и детекции плазмидных штаммов Ch. trachomatis наряду с общепринятыми методами окраски при работе с культурой клеток позволяет не только определить вид хламидии, но и исключает наличие ложноположительных и ложноотрицательных результатов, кото-

Summary

The material for examination consisted of 24 Chlamydia strains (41 separated from monkeys and 23 from humans) and was obtained from patients with different kinds of pathology of reproductive organs, respiratory system and organs of sight. The conditions of cultivating of Chlamydia in the culture of eukaryotic cells were optimized.

The original multiplex PCR test systems for identifying of Chl. pneumoniae and Ch. trachomatis and verifying of plasmids in Ch. trachomatis were used additionally to the well known methods of sample staining in order to improve the sensitivity of cultural method.

The usage of the original multiplex PCR test systems for identifying of Ch. pneumoniae and Ch. trachomatis and detection of plasmid strains of Ch. trachomatis simultaneously with generally accepted methods of staining when applied to the cell culture allows not only to determine the species of Chlamydia, but also excludes the presence of false-positive and false – negative results, which occurs if the

рые присутствуют при применении меченных FITC моноклональных антител и окраски по Романовскому-Гимзе. Штаммы Ch. trachomatis, полученные от обезьян при культивировании в культуре клеток способны также образовывать внутриклеточные хламидийные включения в виде одного общего или множественных, как и человеческие штаммы. Носительство плазмиды штаммами Ch. trachomatis от человека и обезьян определяет фенотипическое различие внутриклеточных хламидийных включений.

Ключевые слова

Хламидиоз, Ch. pneumonia, Chl. Pneumonia, ПЦР-тест-системы, дифференциация хламидий, внутриклеточные включения, оптимизация условий культивирования.

staining with FITC labeled monoclonal antibodies or Romanovsky's stain are used.
Strains of Ch. trachomatis, which were separated from monkeys and humans after the cultivation on the culture of the eukaryotic cells appeared to be able to form the intracellular Chlamydia inclusions. The harboring of plasmid in the strains of Ch. trachomatis of human and monkey origin determines the phenotypical difference between intracellular Chlamydia inclusions.

Key words

Chlamydiosis, Ch. pneumonia, Ch. pneumonia, PCR test systems, differentiation of Chlamydia, intracellular inclusions, optimization of cultivation conditions.

Хламидиозы – это заболевания, вызываемые микробами рода Chlamydia и Chlamydophila, которые отличаются как источником и механизмом передачи инфекции, так характером поражения и клиническим проявлением, а также имеющие повсеместное (пневмохламидиоз, урогенитальный хламидиоз, паратрахома и др.) и эндемическое (трахома, лимфогранулема) распространение. Наибольшее значение имеют хламидиозы, вызываемые Chlamydia trachomatis и Chlamydophila pneumoniae, играющие важную роль в патологии человека и обезьян [1, 2, 3, 4].

Учитывая тот факт, что хламидии не культивируются на искусственных питательных средах, а их паразитизм – выраженная метаболическая зависимость от клетки-хозяина, «золотым стандартом» лабораторного обнаружения хламидий считается культуральный метод, основанный на выделении возбудителя от больного на монослое культуры клеток: Hela-229, L-929, ВНК-21 (клон В), McCoy и др., предварительно обработанной антиметаболитами или цитостатиками [5]. Детекция хламидий в культуре клеток проводится с помощью окраски клеток культуры специфическими поли- или моноклональными антителами с флуоресцентной меткой (возможно определении хламидий до вида), раствором Люголя, по Романовского-Гимзе (иногда выявляются ложные включения). Выделение хламидий в культуре клеток остается неотъемлемой частью диагностики хламидиоза на сегодняшний день, благодаря тому, что он позволяет не только оценить жизнеспособность возбудителя, но и дать фенотипическую характеристику и оценить вирулентность штаммов.

Культивирование хламидий в культуре клеток сопровождается либо образованием множественных хламидийных включений, либо одного общего. Это связано, прежде всего, с отсутствием или наличием экспрессии гена *incA* на уровне белка IncA (семейство Inc-белков включает IncA, IncB, IncC, IncE и IncG), который входит в состав мембраны включений и отвечающий за реализацию вакуолизации. В случае полного отсутствия его экспрессии хламидийные включения приобретают множественный характер [6, 7]. Инкубация культуры клеток при температуре 32 °С приводит к замедлению экспрессии гена *incA*, в то время как при 37 °С происходит восстановление, в случае, если экспрессия не полностью отсутствует [9]. Кроме того, белок IncA играет важную функцию в образовании так называемых вторичных включений через фибры, нити, позволяющие хламидиям формировать внутриклеточные ниши, в которых они могут расти и обеспечивать непрерывное инфицирование в пределах потомства клеток, образующихся в процессе деления материнской клетки [11]. Следовательно, отсутствие или наличие экспрессии гена *incA* играет определяющую роль в цикле развития и в вирулентности хламидий.

При культивировании хламидий в культуре клеток можно выявить еще один фактор вирулентности - метаболизм и уровень аккумуляции гликогена, за осуществление метаболизма которого у хламидий отвечают набор генов: mrsA_1, glgC, glgA, glgB, glgX, glgP, являющихся хромосомными генами. В тоже время установлено, что у плазмидных штаммов хламидий в геномной последовательности плазмиды существуют последовательности специфичные хромосомным генам, выполняющие функцию транскрипционного регулятора последних, что, в свою очередь, сказывается на метаболизме и накоплении гликогена у бесплазмидных штаммов. Отсутствие плазмиды приводит к тому, что накопление

гликогена значительно уменьшается, зерна приобретают меньший диаметр, хламидийные включения в клетках меньше по размеру, чем у плазмидных вариантов, а также, 50% инфекционная доза бесплазмидного штамма в 400 раз превышает аналогичную дозу штамма, несущего плазмиду [10].

Таким образом, актуален поиск оптимального алгоритма проведения диагностики хламидиоза культуральным методом.

Целью работы являлось проведение фенотипической оценки штаммов хламидий Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae человека модифицированным культуральным методом.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 64 штамма хламидий (41 штамм от обезьян и 23 штамма от человека) полученных при различной патологии органов репродуктивного тракта, органов дыхания и зрения. В качестве положительных контрольных образцов выступали референс штаммы Chl. pneumoniae – «В» и Ch. trachomatis – «Бурхан», полученные из Государственной коллекции вирусов ГУ НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

В качестве транспортной среды использовали 3 варианта растворов: а) среда Игла с глютамином и солями Хэнкса, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, гентамицином 40 мкг/мл и амфотерицином В 25 мкг/мл (среда № 1, готовилась в лаборатории); б) транспортная пробирка заводского производства, содержащая дакроновый тампон и губку, пропитанную антибиотиками и антимикотическими препаратами (среда № 2); в) сахарозо-фосфатный буфер, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, гентамицин 20 мкг/мл, ванкомицин 100 мкг/мл, амфотерицин В 2 мкг/мл (среда № 3, готовилась в лаборатории).

В работе использовались 3 клеточные линии McCoy, Vero, Hela. В качестве питательных сред: а) среда Игла с солями Хэнкса и глутамином; б) среда RPMI-1640 с глутамином; в) среда DMEM с глутамином и с 25 мМ HEPES.

Для формирования монослоя использовали: а) 24-луночные планшеты с покровными стеклами, б) пластиковые плоскодонные пробирки с покровными стеклами, в) стеклянные пенициллиновые флаконы с покровными стеклами.

Заражение и культивирование штаммов проводили в суточной культуре клеток, выращенной на покровных стеклах, которое включало следующие этапы: удаление среды роста из лунок с культурой клеток, инокуляцию клинического материала, центрифугирование при 1000 об/мин в течение 1 часа, инкубацию при 37 °С 2 часа, удаление инокулята и внесение изолирующей среды. Дальнейшую инкубацию осуществляли при 37 °С в течение 72 часов. По истечении срока инкубации идентификацию хламидий проводили окрашиванием по Романовскому - Гимзе, согласно общепринятой методике [5], раствором Люголя и меченными FITC моноклональными антителами для выявления антигенов *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae* в реакции прямой (для *Ch. trachomatis*) и непрямой (для *Chl. pneumoniae*) иммунофлуоресценции (тест-система CeLLabs, Австралия). В препаратах инфицированных клеточных культур хламидии выявлялись в виде характерных цитоплазматических включений, окрашенных в соответствующий методу цвет.

Титрование хламидий проводили стандартным методом по цитопатическому действию ($ТЦД_{50}$/мл) [11]. Для этого из лунок отбирали культуральную жидкость и готовили последовательные 10-кратные разведения. Затем по 0,2 мл каждого разведения вносили в 2-х суточную культуру клеток McCoy, выращенную на стеклышках. Инфекционным титром считали наивысшее разведение, при котором в 50% клеток McCoy выявлялся характерный цитопатический эффект с образованием хламидийных включений.

Для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов при окраске дополнительно применяли оригинальные мультиплексные ПЦР-тест-системы для видовой верификации Chl. pneumoniae и Ch. trachomatis, а также для верификации плазмид у штаммов Ch. trachomatis. Для видовой мультиплексной детекции и идентификации Chl. pneumoniae и Ch. trachomatis прменили оригинальные универсальные праймеры на фрагмент гена 16S rRNA: форвард праймер Ctr: 5'-TGGCGATATTTGGGCATCC-3' (CP000051 Gene Bank) и Cpn: 5'-CGGAATAATGACTTCGGTTG - 3' (AE002161 Gene Bank), общий реверс праймер R: 5'-CTTCTTTACCTGGTACGCTC-3' (AE001363 Gene Bank). Размер амплифицируемого продукта для Chl. pneumoniae - 440 пар нуклеотидов, для Ch. trachomatis – 334 пары нуклеотидов. Для детекции штаммов Ch. trachomatis, несущих плазмиду и свободных от нее, применили оригинальную комбинация праймеров: форвард праймер Ctr: 5'-TGGCGATATTTGGGCATCC-3' и реверс праймер R: 5'-CTTCTTTACCTGGTACGCTC-3' для амплификации фрагмента (334 пары нуклеотидов) 16S

rRNA гена Ch. trachomatis; форвард праймер PLf: 5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3' (XO6707 Gene Bank) и реверс праймер PLr: 5'-AATCAATGCCCGGGATTGGT-3' (AM886279 Gene Bank) для амплификации участка гена криптической плазмиды (241 пара нуклеотидов) Chlamydia trachomatis.

Выделение ДНК из суспензии зараженной культуры клеток McCoy проводили с помощью набора «Выделение ДНК & РНК из биологических жидкостей на магнитных частицах» (НПАО «Силекс М»). Стадию амплификации проводили в 25 мкл смеси: ПЦР Буфер (x10): 700 mM Трис-HCl, pH 8.6 / 25 °C, 166 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, Taq – полимераза, на амплификаторе GeneAmp2700 (Applied Biosystems).

Для амплификации фрагментов системы видовой детекции Ch. pneumoniae и Ch. trachomatis применяли условия: 95 °C – 3 мин., затем 40 циклов: 94 °C – 30 сек., 58 °C – 30 сек., 72 °C – 30 сек., в конце 72 °C – 2 мин. и охлаждение до 6°C с последующим хранением при 10 °C. Для амплификации фрагментов системы для обнаружения носительства плазмиды C. trachomatis применяли условия: 95 °C – 3 мин., затем 40 циклов: 94 °C – 20 сек., 60 °C – 20 сек., 72 °C – 20 сек., в конце 72 °C – 2 мин. и охлаждение до 6 °C с последующим хранением при 10 °C. Анализ продуктов амплификации проводили разделением фрагментов ДНК в 2% агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ детекции хламидий человека и обезьян в культуре клеток с помощью окраски Романовского-Гимзе, раствором Люголя, меченных FITC моноклональных антител, молекулярно-генетического метода – ПЦР с использованием оригинальных системы видовой детекции хламидий Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae и системы детекции плазмиды Ch. trachomatis. В ходе исследования при культивировании штаммов хламидий оценивали характер образования внутриклеточных хламидийных включений в зараженной культуре клеток.

Было установлено, что транспортные среды № 1 и № 2 не являются оптимальными для хранения и транспортировки хламидий. Недостатками среды №1 являлись: высокое содержание антимикотического препарата, а так же наличие только гентамицина, к которому отмечается резистентность у многих микроорганизмов. Вследствие этих факторов культивирование хламидий нередко заканчивалось неудачей, из-за деструктивных изменений в клетках, вызванных амфотерицином В и размножающейся микрофлорой. К существенному недостатку среды № 2 следует отнести отсутствие раствора в пробирке. Зонд, опущенный в пробирку, зачастую не попадает в смоченную губку, вследствие этого жизнеспособность хламидий теряется уже на этапе транспортировки. Оптимальной оказалась среда № 3. В культуре клеток McCoy штаммы хламидий вызывали изменения с образованием выраженных специфических включений. В культуре Vero и Hela цитопатический эффект был невыраженным или отсутствовал. Клетки McCoy содержались в криобанке. Контроль качества клеток проводился прижизненно под микроскопом. В работу брались клетки с отсутствием зернистости в цитоплазме и четкими границами. Регулярно проводился контроль микоплазменной контаминации с помощью оригинальных праймеров методом ПЦР. Наиболее оптимальной оказалась среда DMEM с глутамином и HEPES вследствие содержания 25 мМоль HEPES, имея при этом более высокую буферную емкость и поддерживая необходимый для клеток pH длительное время; среда содержит также бикарбонат натрия. Значимых различий при культивировании в разных емкостях (в 24-луночных планшетах, пластиковых плоскодонных пробирках, стеклянных пенициллиновых флаконах) выявлено не было. Однако использование планшетов требует наличие центрифуг с соответствующим ротором. Был подобран оптимальным режим для центрифугирования – 1000 об/мин в течение 1 часа.

Оптимизация культивирования хламидий позволила провести сравнительную фенотипическую характеристику штаммов Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae человека и обезьян в культуре клеток McCoy. Оценивали титр возбудителя, характер образования включений и уровень накопления гликогена в зараженной культуре клеток. Для детекции хламидий использовали окрашивание по Романовскому-Гимзе, для видовой идентификации – специфические моноклональные FITC-меченные антитела, для определения гликогена – раствор Люголя.

Установлено, что все штаммы вызывали в культуре клеток McCoy характерное для хламидий цитопатическое действие ($ЦПД_{50}$/мл), степень выраженности которого варьировала от слабой до выраженной. Титры Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae в зависимости от штамма колебались от 2,0 до 5,5 lg $ТЦД_{50}$/мл (табл. 1 и 2). В

двух случаях на первом пассаже хламидии в культуре клеток не выявлялись. Учитывая, что в анамнезе эти пациенты имели хронические заболевания урогенитального тракта, было произведено до 3-х пассажей клинического материала, в котором через 216 часов определили Ch. trachomatis в низком титре 2,0 lg $ТЦД_{50}$/мл. Неудачи выделения возбудителя в культуре клеток при длительно текущем хламидиозе объясняются тем, что зачастую при таком состоянии хламидии в организме человека останавливают свое развитие на стадии ретикулярных телец, являющихся неинфекционными формами. При культивировании таких форм необходимо провести несколько пассажей, чтобы восстановить инфекционность возбудителя.

При окраске по Романовскому-Гимзе цитоплазматические включения визуализировались в 45 случаях из 64. При окраске раствором Люголя выявилось 38 штаммов Ch. trachomatis, продуцирующих гликоген (табл. 1, 2). У штаммов Chl. pneumonia гликогенобразующая активность отсутствует. При видовой идентификации хламидий меченными FITC моноклональными антителами получен неоднозначный результат. При окраске музейных штаммов хламидий наблюдалась перекрестная реакция моноклональных антител со штаммами Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae. Аналогичный результат был получен у 11 штаммов. Применение системы видовой детекции и системы детекции плазмиды методом ПЦР помогло установить наличие перекрестной реакции, в результате применения моноклональных антител, а также, точно определить видовую принадлежность хламидий. Выделенные 21 штамм из урогенитального тракта человека детектирован оригинальными ПЦР-тест-системами как Ch. trachomatis, плазмидный вариант. Из двух штаммов, выделенных из носоглотки человека, один идентифицирован как Ch. trachomatis, другой Chl. pneumoniae. У обезьян детектировано 9 изолятов Chl. pneumoniae и 26 изолятов Ch. trachomatis. В 3 случаях из легких было выявлено сразу два вида хламидий. Ch. trachomatis (13 штаммов), выделенных у обезьян, не являлись носителями криптической плазмиды. Отмечено, что бесплазмидные варианты хламидий выявлялись в культуре клеток в стабильно низких титрах.

Таким образом, при детекции и идентификации хламидий человека и обезьян в культуре клеток разными методами установлено, что детекция хламидий окраской Романовского-Гимзе не позволяет дать полную дифференцировку хламидий до вида. Отсутствие хламидийных включений при данной окраске не свидетельствует об отсутствии хламидий в культуре клеток, что подтверждается окраской меченными FITC моноклональными антителами. Однако, в результате применения меченных моноклональных антител при детекции и идентификации хламидий в культуре клеток, наблюдается появление перекрестных реакций, что приводит к некорректной оценке результатов. Дополнительная детекция оригинальными ПЦР-тест-ситемами позволяют не только определить вид хламидии, но и исключить наличие ложноположительных и ложноотрицательных результатов, тем самым повысить чувствительность и специфичность культурального метода.

Из 21 штамма Ch. trachomatis, полученных от человека, при культивировании в культуре клеток (37 °С), 6 штаммов образовывали множественные внутриклеточные хламидийные включения, что свидетельствовало об отсутствии экспрессии гена *incA* на уровне белка, обусловливающего включения такого характера (табл. 3). У остальных 15 штаммов и референс штамма Ch. trachomatis – «Бурхан» в культуре клеток выявлялись хламидийные включения в виде одного общего включения. При культивировании 26 штаммов Ch. trachomatis, полученных от обезьян, в культуре клеток были выявлены множественные внутриклеточные хламидийные включения у 10 из них. У 16 штаммов Ch. trachomatis экспрессия гена *incA* на уровне белка была сохранена, на что указывало образование общего хламидийного включения в культуре клеток. Кроме того, при культивировании в культуре клеток штаммов хламидий Ch. trachomatis, выделенных от обезьян, у плазмидных вариантов хламидийные включения имели более крупный вид, по сравнению с бесплазмидными вариантами. При использовании окраски по Романовскому – Гимзе и Люголя при детекции бесплазмидных штаммов в культуре клеток результаты были отрицательными. Это связано, прежде всего, с функцией плазмиды - контролировать метаболизм и накопление гликогена в хламидийных включениях, приводящего к увеличению гликогеновых зерен и, соответственно, к укрупнению хламидийных включений.

При культивировании штаммов хламидий Ch. trachomatis, полученных от человека, различий между штаммами не наблюдали, так как они не являлись свободными от плазмиды, что подтверждалось результатами исследований с помощью ПЦР. Также не было выявлено фенотипических

Таблица 1
Видовая детекция хламидий и детекция плазмидных и бесплазмидных штаммов хламидий человека.

№ пп	Место взятия материала	Титр возбудителя $ТЦД_{50}$/мл	Методы детекции хламидий в культуре клеток						
			Окраска Люголем	Окраска Романовского-Гимзе	Меченные FITC антитела		ПЦР		
					Chl. pneumoniae	Ch. trachomatis	Система для видовой верификации		Система для верификации плазмид
							Chl. pneumoniae	Ch. trachomatis	
1	носоглотка	2,0 lg	-	-	+	+	+	-	-
2	носоглотка	2,5 lg	+	+	+	+	-	+	+
3	уретра	2,9 lg	+	+	*	+	-	+	+
4	церв. канал	5,5 lg	+	+	*	+	-	+	+
5	церв. канал	5,1 lg	+	+	*	+	-	+	+
6	церв. канал	4,5 lg	+	+	*	+	-	+	+
7	уретра	3,5 lg	+	+	*	+	-	+	+
8	уретра	3,9 lg	+	+	*	+	-	+	+
9	уретра	2,5 lg	+	+	*	-	-	+	+
10	уретра	4,7 lg	+	+	*	+	-	+	+
11	церв. канал	5,2 lg	+	+	*	+	-	+	+
12	уретра	3,8 lg	+	+	*	+	-	+	+
13	уретра	3,6 lg	+	+	*	+	-	+	+
14	уретра	4,1 lg	+	+	*	+	-	+	+
15	уретра	4,6 lg	+	+	*	+	-	+	+
16	уретра	5,3 lg	+	+	*	+	-	+	+
17	церв. канал	5,5 lg	+	+	*	+	-	+	+
18	церв. канал	3,2 lg	+	+	*	+	-	+	+
19	церв. канал	2,0 lg	+	-	*	+	-	+	+
20	уретра	4,8 lg	+	+	*	+	-	+	+
21	уретра	3,5 lg	+	+	*	+	-	+	+
22	уретра	4,3 lg	+	+	*	+	-	+	+
23	уретра	2,9 lg	+	+	*	-	-	+	+
24	Ch. trachomatis-Бурхан»	5,3 lg	+	+	+	+	-	+	+
25	Chl. pneumoniae–«В»	3,5 lg	-	+	+	+	+	-	-
26	Смесь обоих штаммов		*	*	+	+	+	+	+

Примечания:* - не использовали в исследовании; + - положительный результат; - - отрицательный результат.

Таблица 2
Видовая детекция хламидий и детекция плазмидных и бесплазмидных штаммов хламидий обезьян

№ пп	Место взятия материала	Титр возбудителя $ТЦД_{50}$/мл	Методы детекции хламидий в культуре клеток						
			Окраска Люголем	Окраска Романовского-Гимзе	Меченные FITC антитела		ПЦР		
					Chl. pneumoniae	Ch. trachomatis	Система для видовой верификации		Система для верификации плазмид
							Chl. pneumoniae	Ch. trachomatis	
1	легкие	2,1 lg	-	-	+	+	+	-	-
2	легкие	3,3 lg	-	+	+	+	+	-	-
3	легкие	3,8 lg	-	+	+	+	+	-	-
4	легкие	4,1 lg	+	+	+	+	+	+	+
5	легкие	4,9 lg	+	+	+	+	+	+	+
6	легкие	2,3 lg	+	+	+	+	+	+	+
7	легкие	3,3 lg	-	+	+	+	+	-	-
8	легкие	3,7 lg	+	+	-	+	-	+	+
9	легкие	2,6 lg	-	+	+	+	+	-	-
10	легкие	2,9 lg	-	+	+	-	+	-	-
11	легкие	3,6 lg	-	+	+	+	+	-	-
12	легкие	2,7 lg	-	+	+	+	+	-	-
13	легкие	2,3 lg	+	+	+	+	-	+	+
14	легкие	3,4 lg	+	+	+	+	-	+	+
15	носоглотка	3,6 lg	-	+	+	+	+	-	-
16	церв. канал	4,3 lg	+	+	*	+	-	+	+
17	церв. канал	3,1 lg	-	-	*	+	-	+	-
18	церв. канал	2,8 lg	-	-	*	+	-	+	-
19	уретра	2,4 lg	-	-	*	+	-	+	-
20	уретра	4,3 lg	-	-	*	+	-	+	-
21	конъюнктива	4,3 lg	+	+	-	+	-	+	+
22	конъюнктива	4,9 lg	+	+	-	+	-	+	+
23	уретра	2,0 lg	-	-	*	+	-	+	-
24	церв. канал	4,3 lg	+	+	*	+	-	+	+
25	уретра	3,0 lg	-	-	*	+	-	+	-
26	уретра	3,2 lg	-	-	*	+	-	+	-
27	церв. канал	2,9 lg	-	-	*	+	-	+	-
28	церв. канал	5,1 lg	+	+	*	+	-	+	+
29	церв. канал	3,1 lg	-	-	*	+	-	+	-
30	церв. канал	2,4 lg	-	-	*	+	-	+	-
31	церв. канал	5,2 lg	+	+	*	+	-	+	+
32	церв. канал	4,9 lg	+	+	*	+	-	+	+
33	церв. канал	3,3 lg	-	-	*	+	-	+	-
34	церв. канал	4,6 lg	+	+	*	+	-	+	+
35	уретра	2,3 lg	-	-	*	+	-	+	-
36	уретра	3,1 lg	-	-	*	+	-	+	-
37	церв. канал	4,8 lg	+	+	*	+	-	+	+
38	церв. канал	5,5 lg	+	+	*	+	-	+	+

Примечания:* - не использовали в исследовании; + - положительный результат; - - отрицательный результат.

Таблица 3
Фенотипические особенности образования хламидийных внутриклеточных включений у штаммов хламидий Ch. trachomatis

№ пп	От кого выделено	Место взятия материала	Характер хламидийных включений При 37°С	
			Множественные	Общее
1	человек	уретра	-	+
2	человек	цервикальный канал	-	+
3	человек	цервикальный канал	-	+
4	человек	цервикальный канал	+	-
5	человек	уретра	-	+
6	человек	уретра	-	+
7	человек	уретра	-	+
8	человек	уретра	+	-
9	человек	цервикальный канал	+	-
10	человек	уретра	-	+
11	человек	уретра	-	+
12	человек	уретра	-	+
13	человек	уретра	-	+
14	человек	уретра	+	-
15	человек	цервикальный канал	+	-
16	человек	цервикальный канал	+	-
17	человек	цервикальный канал	-	+
18	человек	уретра	-	+
19	человек	уретра	-	+
20	человек	уретра	-	+
21	человек	уретра	-	+
22	обезьяна	цервикальный канал	+	-
23	обезьяна	цервикальный канал	+	-
24	обезьяна	цервикальный канал	-	+
25	обезьяна	уретра	-	+
26	обезьяна	уретра	+	-
27	обезьяна	конъюнктива	-	+
28	обезьяна	конъюнктива	-	+
29	обезьяна	уретра	+	-
30	обезьяна	цервикальный канал	+	-
31	обезьяна	уретра	+	-
32	обезьяна	уретра	+	-
33	обезьяна	цервикальный канал	-	+
34	обезьяна	цервикальный канал	-	+
35	обезьяна	цервикальный канал	-	+
36	обезьяна	цервикальный канал	+	-
37	обезьяна	цервикальный канал	-	+
38	обезьяна	цервикальный канал	-	+
39	обезьяна	цервикальный канал	-	+
40	обезьяна	цервикальный канал	+	-
41	обезьяна	уретра	-	+
42	обезьяна	уретра	-	+
43	обезьяна	цервикальный канал	-	+
44	обезьяна	цервикальный канал	+	-
45	Ch. trachomatis-«Бурхан»	-	-	+

Примечания + - положительный результат; - - отрицательный результат.

различий при культивировании в культуре клеток штаммов Ch. pneumoniae, полученных от человека и обезьян с патологией органов дыхания.

Таким образом, использование оригинальных ПЦР-тест-систем видовой детекции Ch. trachomatis и Chl. pneumoniae и детекции плазмидных штаммов Ch. trachomatis в культуре клеток позволяет не только определить вид хламидии, но и исключает наличие ложноположительных и ложноотрицательных результатов, которые присутствуют при применении меченных FITC моноклональных антител и окрасок по Романовскому-Гимзе или люголем. Оптимизация условий культивирования хламидий в культуре клеток и совершенствование системы их детекции в культуре повышает диагностическую значимость культурального метода исследования на хламидиоз. Штаммы Ch. trachomatis, полученные от обезьян при культивировании в культуре клеток способны также образовывать внутриклеточные хламидийные включения в виде одного общего или множественных, как и человеческие штаммы. Носительство плазмиды штаммами Ch. trachomatis от человека и обезьян определяет фенотипическое различие внутриклеточных хламидийных включений.

Литература

1. Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. – М.: Медицинская книга, Н.Новгород: Издательство НГМА: 2003.

2. Зимин А.Л. Разработка метода специфической детекции и видовой дифференциации возбудителей хламидиозов на основе структурного полиморфизма гена omp2.-Автореф. дис. канд. биол. наук. М: 2003

3. Метельская В.А., Алешкин В.А., Зверев В.В. и др. Современные методы лабораторной диагностики хламидиозов. Журн. микробиол., 2008, № 4: с. 111 – 117

4. Слободенюк В.В., Алёшкин В.А., Лапин Б.А. и др. Сравнительная характеристика методов верификации *Chlamydia trachomatis* у человека и обезьян. Естественные науки. 2009, № 1(26): с. 59-67

5. Лобзин Ю.В., Ляшенко Ю.И., Позняк А.Л. Хламидийные инфекции.-СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ»: 2003.

6. Pannekoek Y., Spaargaren J., Ankie A.J. et al. Interrelationship between Polymorphisms of *incA*, Fusogenic Properties of *Chlamydia trachomatis* Strains, and Clinical Manifestations in Patients in The Netherlands. Clin. Microbiol., 2005, Vol. 43, № 5: p. 2441-2443

7. Suchland R.J., Rockey D.D., Bannantine J.P., Stamm W.E. Isolates of *Chlamydia trachomatis* Lack IncA, a Protein Localized to the Inclusion Membrane. Infection and Immunity. 2000, Vol. 68, № 1: p. 360 – 367

8. Fields K.A., Fischer E., Hackstadt T. Inhibition of *Chlamydia trachomatis* Inclusions at 32°C Correlates with Restricted Export of IncA. Infection and Immunity. 2002, Vol. 70, № 7: p. 3816-3823

9. Suchland R.J., Rockey D.D., Weeks S.K. et al. Development of Secondary Inclusions in Cells Infected by *Chlamydia trachomatis*. Infection and Immunity. 2005, Vol. 73, № 7: p. 3954-3962

10. Carlson J.H., Whitmire W.M., Crane D.D. et al. The *Chlamydia trachomatis* Plasmid Is a Transcriptional Regulator of Chromosomal Genes and a Virulence Factor. Infection and Immunity.2008, Vol. 76, № 6: p. 2273-2283

11. Павлович С.А. Микробиология с иммунологией и вирусологией. Учебн пособие для Мед. ВУЗов. Изд. 2.-Минск: Высш. Школа. 2008.

КАРАУЛОВ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ - 119992, ул.Трубецкая, д.8, стр.2 Кафедра клинической иммунологии и аллергологии ММА им.И.М.Сеченова,
E-mail: karaulov@mtu-net.ru
Ольга Геннадьевна Гречишникова[1], младший научный сотрудник, Владимир Владимирович Слободенюк[1], аспирант; Владимир Андрианович Алешкин[1], профессор, доктор биологических наук, директор; Станислав Степанович Афанасьев[1], профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора; Борис Аркадьевич Лапин[2], академик РАМН, профессор, доктор медицинских наук, директор; Этери Капитоновна Джикидзе[2], профессор, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией; Юрий Владимирович Несвижский[3], профессор, доктор медицинских наук, декан медико-профилактического факультета; Николай Валентинович Воложанцев[4], кандидат биологических наук, заведующий лабораторией; Эдуард Арсеньевич Светоч[4], профессор, доктор ветеринарных наук, заведующий отделом; Иван Алексеевич Дятлов[4], профессор, доктор медицинских наук, директор; Олег Васильевич Рубальский[5], профессор, доктор медицинских наук, директор научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии;; Елена Александровна Воропаева[1], кандидат биологических наук, начальник лаборатории; Максим Станиславович Афанасьев[1], кандидат

медицинских наук, научный сотрудник; Валерия Алексеевна Метельская[1], младший научный сотрудник; Александра Львовна Байракова[1], младший научный сотрудник; Екатерина Александровна Егорова[1], кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник; Евгений Олегович Рубальский[5], студент, пятый курс, лечебный факультет, Ликов Виктор Федорович[3], профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ММА им. И.М.Сеченова и Александр Викторович Караулов[3], член-корреспондент РАМН, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой клинической аллергологии и иммунологии ММА им.И.М.Сеченова;

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского[1]
Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10
Тел. (495)708-02-62, E-mail: info@gabrich.com
Научно-исследовательский институт медицинской приматологии[2]
Россия, 354376, Сочи-Адлер, Веселое-1
Тел. (8622)42-22-39, E-mail: blapin@yandex.ru
Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова[3]
Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Тел. (495)395-64-97, E-mail: karaulov@mtu-net.ru
Центр прикладной микробиологии и биотехнологии[4]
Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район, п.г.т. Оболенск
Тел. (4967)36-00-03, E-mail: nikvol@obolensk.org
Астраханская государственная медицинская академия[5]

Поступила 20.04.09 г