

ПЦР-детекция и идентификация возбудителей хламидийных инфекций человека и обезьян

В.В. Слободенюк¹, В.А. Алёшкин¹, Б.А. Лапин², С.С. Афанасьев¹, Д.В. Кокушков³,
О.Г. Гречишникова¹, Е.А. Воропаева¹, Э.К. Джикидзе², Ю.В. Несвижский³,
Н.В. Воложанцев⁴, Э.А. Светоч⁴, И.А. Дятлов⁴, М.С. Афанасьев¹, О.В. Рубальский⁵,
В.А. Метельская¹, А.Л. Байракова¹, Е.А. Егорова¹, Е.О. Рубальский⁵, И.В. Евсегнеева³,
А.В. Караулов³

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

²Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи-Адлер;

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

³Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва;

⁵Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

PCR-detection and identification of chlamydia infections pathogens of human and monkeys

V.V. Slobodenyuk¹, V.A. Aleshkin¹, B.A. Lapin S.S.², O.G. Afanasyev¹, D.V. Kokuschkov³, O.G. Grechishnikova¹, E.A. Voropaeva¹, E.K. Dzhikidze², Yu.V. Nesvizhsky³, N.V. Volozhantsev⁴, E.A. Svetoch⁴, I.A. Dyatlov⁴, M.S. Afanasyev¹, O.V. Rubalskiy⁵, V.A. Metelskaya¹, A.L. Bayrakova¹, E.A. Egorova¹, E.O. Rubalskiy⁵, A.V., I.V. Evsegneeva³, Karaulov³

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

³I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow

Аннотация

С помощью биоинформационного анализа впервые подобраны и синтезированы праймеры для видовой мультиплексной детекции и идентификации *Chlamydomphila pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis*, а также для детекции штаммов *Chlamydia trachomatis*, несущих плазмиду и свободных от нее. Исследовали 61 штамм (44 штаммов *Chlamydia trachomatis* и 17 штаммов *Chlamydomphila pneumoniae*), вирифицированных в мазках соскобах, а также на культуре клеток McCoy, зараженных клиническим материалом, полученным от человека и обезьян с различной патологией органов репродуктивного тракта, органов дыхания и зрения с подозрением на хламидийную инфекцию. Предлагаемые ПЦР-тест-системы для детекции и дифференциации *Ch. pneumoniae* и *Ch. trachomatis* позволили одновременно не только вирифицировать возбудителей у человека и обезьян (в большем проценте случаев по сравнению с коммерческими ПЦР-тест-системами), но и осуществлять дифференциацию

Summary

By means of bioinformation analysis for the first time are selected and synthesised primers for specific multiplex detection and identification of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*, and also for detection strains *Chlamydia trachomatis*, carrying plasmid and free from it. Investigated 61 strains (44 strains *Chlamydia trachomatis* and 17 strains *Chlamydomphila pneumoniae*), which were verified in smear scrape, and also on culture of cells McCoy infected with a clinical material, received from human and monkeys with a various pathology of organs of a genesial tract, a respiratory organs and organs of sight with suspicion on a chlamydia infection. Offered PCR-test systems for detection and differentiation *Ch. pneumoniae* and *Ch. trachomatis* have allowed simultaneously not only to verify pathogens at human and monkeys (in larger percent of cases in comparison with commercial PCR-test systems), but also to carry out

хламидий, оценивать их вирулентность (плазмидных и бесплазмидных штаммы). Предлагаемые ПЦР-тест-системы могут применяться для прямой детекции хламидий *Ch. pneumoniae* и *Ch. trachomatis* в образцах клинического материала и в культуре клеток (повышение диагностической значимости культурального метода).

Ключевые слова

Биоинформационный анализ, урогенитальный хламидиоз, *Ch. pneumoniae*, ПЦР-тест-системы, дифференциация хламидий.

Хламидии являются широко распространенной группой облигатных внутриклеточных микроорганизмов. В настоящее время, особо важное значение для медицины представляют *Chlamydia trachomatis*, вызывающая различные заболевания урогенитального тракта, трахому, лимфогранулему венерум, патологию органов дыхания и офтальмию новорожденных, и *Chlamydoxila pneumoniae* как патоген почти половины пневмоний на сегодняшний день, а также, играющая роль в патологии сердечно-сосудистой системы [1].

Возрос интерес к поиску наиболее оптимальной экспериментальной модели, применяемой для изучения различного рода хламидийной патологии, в том числе и к обезьянам как более близким к человеку по эволюционной лестнице. Известны работы, где описывается восприимчивость данных животных к хламидиям, выделенных от человека, в результате экспериментального заражения. Установлено, что у обезьян регистрируются заболевания хламидийной этиологии, которые сопровождаются поражением урогенитального тракта, органов дыхания и органов зрения [2].

В виду того, что хламидии способны к персистенции в организме и обладают способностью к активации жизнедеятельности в результате ослабления защитных сил организма, диагностика их является сложной задачей. Перспективным методом диагностики хламидиозов остается ДНК-диагностика, которая основана на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Определение ДНК хламидий служит не только основой верификации возбудителя при острой, хронической и персистирующей формах инфекционного процесса, но и для определения геновариантов возбудителя, серотипов, а также установление чувствительности к антибиотикам. ПЦР-диагностика хламидиозов, основанная на детекции либо одного какого-нибудь вида хламидий разных родов *Chlamydoxila* и *Chlamydia*, либо разных видов, принадлежащим одному из родов [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Известен способ детекции хламидий вида *Ch. trachomatis* с применением либо ПЦР-участка ДНК

differentiation of clamylia, to estimate their virulence (strains with or without plasmids). Offered PCR-test systems can be applied to direct detection of chlamydia *Ch. pneumoniae* and *Ch. trachomatis* in samples of a clinical material and in culture of cells (rising of the diagnostic importance of a cultural method).

Key words

Bioinformation analysis, urogenital chlamydiosis, *Ch. pneumoniae*, PCR-test systems, differentiation of clamylia.

криптической плазмиды [8], либо гена 16S rRNA [11]. Целесообразно использовать ПЦР-диагностику, основанную на одновременном применении указанных двух подходов. Выявляются штаммы, свободные от криптической плазмиды. Один из них был выделен от больного с проктоколитом и охарактеризован как серотип L2 [12], другой - у пациента с асимптоматическим течением уретрита как серовар В [13], третий клинический изолят С599 - от 26-летнего пациента из уретры также с асимптоматической картиной течения заболевания и был охарактеризован после секвенирования как серовар E/Bour [14]. В то же время определение только гена 16S rRNA также не дает полную характеристику штамма на присутствие плазмиды, отвечающую за повышенную вирулентность. Поэтому необходимо одновременное выявление в ПЦР и плазмидной ДНК, и гена 16S rRNA.

Описан способ детекции хламидий с применением для ПЦР-диагностики, как участка ДНК криптической плазмиды, так и участка гена *omp1*, кодирующего основной белок наружной мембраны [3, 10]. Однако, и этот метод детекции *Ch. trachomatis* недостаточно эффективен для диагностики *Ch. trachomatis* в виду того, что существует 19 серовариантов данного возбудителя, которые детектируются именно по специфическому участку этого эпитопа. В результате чего диагностика с применением праймеров к гену *omp1* может давать ложноотрицательные результаты.

Известна мультиплексная ПЦР-тест-система на основе получения и детекции фрагментов генов главного белка мембраны МOMP для выявления возбудителей хламидийной инфекции животных и птиц (*Chlamydoxila felis*, *Chlamydoxila psittaci*, *Chlamydoxila abortus*, *Chlamydoxila pneumoniae* и *Chlamydia suis*). Позволяет проводить детекцию возбудителей хламидиоза, выявляемых, в основном, у животных [3].

Применяется методика ПЦР-анализа по верификации возбудителей хламидийной инфекции в хронической или персистентной форме, основанная на детекции экспрессии гена белка

(*pyk*, *nlpd*, *Cpn0585*, *ompA*, *оупрВ*, *hsp60*), отвечающего за литическую фазу цикла развития хламидий, или гена белка, отвечающего за синтез липополисахарида. Однако, применение этого варианта метода в клинической диагностике крайне неэффективно из-за того, что праймеры ориентированы только к определенному эпитопу, экспрессия которого осуществляется в характерную ему фазу цикла хламидий, что уменьшает тем самым процент детекции возбудителя [9].

В работе, посвященной разработкам ПЦР-диагностики хламидий вида *Chlamydia pneumoniae*, представлен метод, основанный на детекции гена 23S rRNA [7].

Обнаружение хламидий приводится и в работе по мультиплексному выявлению урогенитальных инфекций (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex S*), где проводится детекция гена 16S rRNA к *Chlamydia trachomatis* [4]. Однако это не позволяет выявлять вид хламидий, а также не дает должным образом оценить характеристику штамма на носительство плазмиды.

Возможна мультиплексная детекция хламидийных инфекций путем выявления представителей семейства *Chlamydiaceae* с использованием семейственно-специфических праймеров к гену *omp1* на основе разницы температуры плавления продуктов в режиме реального времени [5].

Таким образом, для человека или приматов актуальна разработка способа одновременной детекции *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis* методом ПЦР как в случае микст-инфекции (при заболеваниях органов дыхания), так и в случае моноинфицирования. При этом необходима верификация не только штаммов *Ch. trachomatis*, несущих плазмиду, но и бесплазмидных вариантов. Идентифицированы и секвенированы плазмиды: *Ch. trachomatis*: pCTA, pCTT1, pCHL1, pLVG440 и pLGV2 от сероваров А [15], В [16], D [11], L1 [16] и L2 [12], соответственно, и от *Ch. pneumoniae* (штамма № 16), выделенного от лошади [19]. В изолятах *Ch. pneumoniae*, выделенных от людей, плазмиды не определяется. Плазмиды являются носителем гена, кодирующего белок *pgr3*, который входит в структуру мембраны хламидии и играет роль в иммунном ответе организма на возбудитель, индуцирует выработку цитокинов в макрофагах [21]. В случае инактивации *pgr3* выработка цитокинов исчезала. Плазмиды играют роль в аккумуляции гликогена в хламидийных включениях, что объясняется присутствием в плазмиде последовательностей специфичных хромосомным генам, отвечающих

за метаболизм гликогена (*pgi*, *mrsA1*, *glgA*, *glgB*, *glgX* и *glgP*). Отсутствие или наличие плазмиды влияет на метаболизм гликогена (уровень и накопление его в хламидийных включениях выше у плазмидных вариантов), обуславливающих вирулентность возбудителя [22]. Следовательно, штамм *Ch. trachomatis*, не несущий криптохлоридную плазмиду, может вызывать асимптоматическую картину течения заболевания. Наличие плазмиды в штамме *Ch. trachomatis* свидетельствует о его вирулентности. Целесообразно проводить детекцию хламидий как несущих плазмиду, так и свободных от неё штаммов, что позволит увеличить процент выявления хламидийных инфекций, прогнозировать характер течения инфекции, подобрать иммуномодулирующие препараты и повысить эффективность проводимой терапии.

Целью работы являлось обоснование создания быстрой и надежной тест-системы мультиплексной ПЦР-детекции возбудителей хламидиозов человека и обезьян, видов *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis*, а также мультиплексной системы, для универсальной ПЦР-детекции плазмидных и бесплазмидных штаммов вида *Ch. trachomatis*.

Материалы и методы

Применяли биоинформационный анализ при выборе последовательностей олигонуклеотидных праймеров. Для поиска праймеров применяли комплексное программное обеспечение, включающее DNAsis, Vector NTI Suite, DNASTAR, BLAST 4.0, и данные Gene Bank. Был проведен анализ последовательностей генов 16S rRNA *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis*, и плазмид *Chlamydia trachomatis*. Для видовой мультиплексной детекции и идентификации *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis* впервые подобрали 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 *C. pneumoniae* - 440 пар нуклеотидов, для *C. trachomatis* - 334 пары нуклеотидов.

Для детекции штаммов *Chlamydia trachomatis*, несущих плазмиду и свободных от нее, была впервые предложена следующая оригинальная комбинация праймеров: форвард праймер Ctr: 5'-TGGCGATATTTGGGCATCC-3' и реверс праймер R: 5'-CTTCTTTACCTGGTACGCTC-3' для амплификации фрагмента (334 пары нуклеотидов) 16S

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

Отработку условий амплификации и специфичность праймеров проводили на референс штаммах *Chlamydia pneumoniae* – «В» и *Chlamydia trachomatis* – «Бурхан», полученных из Государственной коллекции вирусов ГУ НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. На начальном этапе работы с лиофилизированной суспензией штаммов было проведено 2-3 пассажа на восприимчивой лабораторной модели клеток McCoу для полного восстановления исходной биологии штаммов и инфекционного титра 7,0-8,0 lg TCD50/мл.

Материалом для исследования служили 61 штамм (44 штаммов *Chlamydia trachomatis* и 17 штаммов *Chlamydia pneumoniae*), вирифицированных в мазках соскобах, а также на культуре клеток McCoу, зараженных клиническим материалом, полученным от человека и обезьян с различной патологией органов репродуктивного тракта, органов дыхания и зрения с подозрением на хламидийную инфекцию. Идентификацию хламидий проводили окрашиванием по Романовскому-Гимзе, согласно общепринятой методике [1, 2, 3], и мечеными FITC моноклональными антителами для выявления антигенов *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia pneumoniae* в реакции прямой иммунофлуоресценции (тест-система CeLLabs, Австралия). В препаратах инфицированных клеточных культур хламидии выявлялись в виде характерных цитоплазматических включений, окрашенных в соответствующий методу цвет.

Проводили выделение ДНК с помощью набора «Выделение ДНК & РНК из биологических жидкостей на магнитных частицах» (НПАО «Силекс М») из суспензии зараженной культуры клеток McCoу.

Стадию амплификации проводили в 25 мкл смеси: ПЦР Буфер (Ч10): 700 mM Трис-НCl, pH 8,6 / 25 °C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, Taq – полимеразы, на амплификаторе GeneAmp2700 (Applied Biosystems). При подборе условий реакции варьировали содержание ионов магния, температуру отжига праймеров.

Для амплификации фрагментов 16S rRNA гена *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 16S rRNA гена и криптической плазмиды *Ch. 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.

Сравнительная оценка у человека и обезьян чувствительности и специфичности предлагаемых мультиплексной ПЦР-детекции *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis* (система для видовой верификации), а также мультиплексной ПЦР-детекции как несущих плазмиду, так и бесплазмидных штаммов вида *Ch. trachomatis* (система для верификации плазмид) проводилась в сравнении с ПЦР-тест-системой «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и в сопоставлении с референс штаммами *Chlamydia pneumoniae* – «В» и *Chlamydia trachomatis* – «Бурхан». Основой коммерческой тест-системы «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-FL» праймер криптической плазмиды.

Результаты и обсуждение

Проведена предварительная отработка условий амплификации и специфичности праймеров предлагаемых систем на референс штаммах *Chlamydia pneumoniae* – «В» и *Chlamydia trachomatis* – «Бурхан». При амплификации выделенной ДНК с культуры клеток, зараженной двумя штаммами, и последующем анализе фрагментов амплификации с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле регистрировали размеры продуктов, специфичных для каждого вида хламидий. При выделении ДНК хламидий из культуры клеток, зараженных либо штаммом *Chlamydia pneumoniae* – «В», либо *Chlamydia trachomatis* – «Бурхан» и проведении амплификации, анализ продуктов амплификации показал фрагмент, специфичный только одному виду хламидий, штаммом которого проводили заражение культуры клеток. Проведена оценка чувствительности и специфичности ПЦР-детекции штаммов *Ch. trachomatis*, несущих плазмиду и свободных от нее, предлагаемой системой для верификации плазмид. При амплификации выделенной ДНК с культуры клеток, зараженной штаммом *Chlamydia pneumoniae* – «В», анализ продуктов амплификации показал отрицательный результат, что подтверждает специфичность предлагаемых праймеров как к гену 16S rRNA *Ch. trachomatis*, так и к участку ДНК криптической плазмиды, которая отсутствует у штамма *Chlamydia pneumoniae*. При амплификации выделенной ДНК с культуры

клеток, зараженной штаммом *Ch. trachomatis* – «Бурхан», анализ продуктов амплификации был положительным по обоим эпитомам: гену 16S rRNA и плазмиде. Это характеризует данный штамм как носитель плазмиды.

В модельных экспериментах с использованием разведений хламидийной ДНК референс штаммов по оценке аналитической чувствительности предлагаемых тест-систем установлено, что нижний предел обнаружения и *Chlamydia trachomatis*, и *Chlamydia pneumoniae* составляет от 5 до 10 геном-эквивалентов на реакцию. При этом неспецифическая амплификация не наблюдается.

При оценке 17 (2 от человека и 15 от приматов) хламидийных штаммов, полученных на культуре клеток, системой для видовой верификации только 14 штаммов были подтверждены как *Ch. pneumoniae* (табл. 1). Три штамма, полученных от обезьян, были детектированы как смесь двух возбудителей *Ch. pneumoniae* и *Ch. trachomatis*, что указывает на микст-инфекцию. Один штамм, полученный от человека и два штамма, полученных от обезьян, были подтверждены как *Ch. trachomatis*, что говорит о наличии перекреста при выявлении хламидий мечеными FITC монокло-

нальными антителами для выявления антигенов *Ch. trachomatis* и *Ch. pneumoniae* в реакции прямой иммунофлуоресценции. При ПЦР-детекции референс штаммов *Chlamydia pneumoniae* – «В» и *Chlamydia trachomatis* – «Бурхан» неспецифических продуктов не наблюдалось, амплификация проходила только с наработкой специфических фрагментов. При оценке штаммов *Ch. trachomatis* от человека и обезьян с патологией органов дыхания на наличие или отсутствия плазмиды с помощью системы для верификации плазмид было показано, что данные штаммы являлись носителями плазмиды, что также подтверждается набором «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-FL». Штаммы *Ch. trachomatis*, полученные от обезьян с микст-пневмохламидиозом, также содержали плазмиды.

При патологии органов репродуктивного тракта человека на культуре клеток был выделен 21 штамм *Ch. trachomatis*, что подтверждено ПЦР с коммерческим набором и с предлагаемой системой для видовой верификации. Благодаря предлагаемой системе для верификации плазмид установлено наличие плазмид у данных штаммов (табл. 2). Хламидии, выделенные от обезьян с патологией уrogenитального тракта на

Таблица 1
Видовая детекция хламидий из дыхательных путей у человека и обезьян

п/н	От кого выделено	Место выделения	Видовая детекция <i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
1	человек	носоглотка	+	-
2	человек	носоглотка	-	+
3	обезьяна	легкие	+	-
4	обезьяна	легкие	+	-
5	обезьяна	легкие	+	-
6	обезьяна	легкие	+	+
7	обезьяна	легкие	+	+
8	обезьяна	легкие	+	+
9	обезьяна	легкие	+	-
10	обезьяна	легкие	-	+
11	обезьяна	легкие	+	-
12	обезьяна	легкие	+	-
13	обезьяна	легкие	+	-
14	обезьяна	легкие	+	-
15	обезьяна	легкие	-	+
16	обезьяна	легкие	+	-
17	обезьяна	носоглотка	+	-
18	<i>Ch. trachomatis</i> -«Бурхан»	-	-	+
19	<i>Ch. pneumoniae</i> - «В»	-	+	-
20	Смесь штаммов «Бурхан» и В»	-	+	+

Примечания: + - положительный результат; - - отрицательный результат

Таблица 2

Детекция плазмидных и бесплазмидных штаммов хламидий у человека и обезьян

Номер п/п	От кого выделено	Место выделения	Детекция плазмидных и бесплазмидных штаммов		«АмплиСенс Chlamydia trachomatis-FL»
			Плазмидные	Бесплазмидные	
1	человек	уретра	+	-	+
2	==/=	церв. канал	+	-	+
3	==/=	церв. канал	+	-	+
4	==/=	церв. канал	+	-	+
5	==/=	уретра	+	-	+
6	==/=	уретра	+	-	+
7	==/=	уретра	+	-	+
8	==/=	уретра	+	-	+
9	==/=	церв. канал	+	-	+
10	==/=	уретра	+	-	+
11	==/=	уретра	+	-	+
12	==/=	уретра	+	-	+
13	==/=	уретра	+	-	+
14	==/=	уретра	+	-	+
15	==/=	церв. канал	+	-	+
16	==/=	церв. канал	+	-	+
17	==/=	церв. канал	+	-	+
18	==/=	уретра	+	-	+
19	==/=	уретра	+	-	+
20	==/=	уретра	+	-	+
21	==/=	уретра	+	-	+
22	обезьяна	церв. канал	+	-	+
23	==/=	церв. канал	-	+	-
24	==/=	церв. канал	-	+	-
25	==/=	уретра	-	+	-
26	==/=	уретра	-	+	-
27	==/=	конъюнктивы	+	-	+
28	==/=	конъюнктивы	+	-	+
29	==/=	уретра	-	+	-
30	==/=	церв. канал	+	-	+
31	==/=	уретра	-	+	-
32	==/=	уретра	-	+	-
33	==/=	церв. канал	-	+	-
34	==/=	церв. канал	+	-	+
35	==/=	церв. канал	-	+	-
36	==/=	церв. канал	-	+	-
37	==/=	церв. канал	+	-	+
38	==/=	церв. канал	+	-	+
39	==/=	церв. канал	-	+	-
40	==/=	церв. канал	+	-	+
41	==/=	уретра	-	+	-
42	==/=	уретра	-	+	-
43	==/=	церв. канал	+	-	+
44	==/=	церв. канал	+	-	+
45	Ch. trachomatis - -«Бурхан»		+	-	+

Примечания: + - положительный результат; - - отрицательный результат.

культуре клеток (23 штамма), были также детектированы и по ПЦР с коммерческим набором и с предлагаемой системой для видовой верификации как *Ch. trachomatis*, 13 из которых свободны от плазмид (установлено при оценке предлагаемой системой для верификации плазмид), что не может быть обнаружено набором «АмплиСенс Chlamydia trachomatis-FL», но подтверждается предлагаемым набором по детекции бесплазмидных штаммов, повышая тем самым процент диагностики хламидиоза ($\chi^2=17,35$; $p<0,001$).

Апробацию чувствительности системы видовой верификации хламидий и системы по обнаружению плазмиды проводили также на клиническом материале мазков-соскобов, полученных из уретры, цервикального канала, носоглотки у 15 человек, обратившихся в диагностический центр. У обезьян исследованы мазки-соскобы из цервикального канала, носоглотки у 19 особей.

У 6 из 15 пациентов обнаружена ДНК плазмидных штаммов *Ch. trachomatis* в соскобном материале из урогенитального тракта и у 1 пациента из носоглотки (табл. 3). Бесплазмидных

Таблица 3
Апробация предлагаемых ПЦР-тест-систем на клиническом материале

п/н	Откуда выделено	Место выделения	Система видовой верификации		Система для верификации плазмид
			<i>Ch. trachomatis</i>	<i>Ch. pneumoniae</i>	
1	человек	церв. канал	+	-	+
2	человек	церв. канал	-	-	-
3	человек	церв. канал	+	-	+
4	человек	церв. канал	+	-	+
5	человек	церв. канал	-	-	-
6	человек	церв. канал	-	-	-
7	человек	церв. канал	+	-	+
8	человек	уретра	+	-	+
9	человек	уретра	+	-	+
10	человек	уретра	-	-	-
11	человек	уретра	-	-	-
12	человек	уретра	-	-	-
13	человек	уретра	-	-	-
14	человек	носоглотка	-	+	-
15	человек	носоглотка	+	-	+
16	обезьяна	церв. канал	+	-	+
17	обезьяна	церв. канал	+	-	-
18	обезьяна	церв. канал	+	-	-
19	обезьяна	церв. канал	-	-	-
20	обезьяна	церв. канал	-	-	-
21	обезьяна	церв. канал	+	-	+
22	обезьяна	церв. канал	-	-	-
23	обезьяна	церв. канал	+	-	-
24	обезьяна	церв. канал	+	-	-
25	обезьяна	церв. канал	-	-	-
26	обезьяна	уретра	+	-	-
27	обезьяна	уретра	+	-	-
28	обезьяна	уретра	+	-	+
29	обезьяна	уретра	-	-	-
30	обезьяна	уретра	-	-	-
31	обезьяна	носоглотка	-	+	-

Примечания: + - положительный результат; - - отрицательный результат.

штаммов не было обнаружено. У одного пациента из носоглотки системой видовой верификации обнаружена ДНК *Ch. pneumoniae*. У 7 пациентов хламидии обнаружены не были. Из 16 приматов у 9 из урогенитального тракта выявлена ДНК *Ch. trachomatis*, причем только 3 из них содержали плазмидную ДНК. У одной особи обнаружена ДНК *Ch. pneumoniae* из носоглотки. У 6 особей хламидии обнаружены не были.

Заключение

Таким образом, предлагаемые ПЦР-тест-системы для детекции и дифференциации *Ch. pneumoniae* и *Ch. trachomatis* позволяют одновременно не только верифицировать возбудите-

лей у человека и обезьян (в большем проценте случаев по сравнению с коммерческими ПЦР-тест-системами), но и осуществлять дифференциацию хламидий, оценивать их вирулентность (плазмидных и бесплазмидных штаммы) благодаря специально подобранным праймерам для мультиплексного видового обнаружения возбудителей. У приматов более, чем в половине случаев обнаруживаются бесплазмидные штаммы *Ch. trachomatis*. Предлагаемые ПЦР-тест-системы могут применяться для прямой диагностики хламидий *Ch. pneumoniae* и *Ch. trachomatis* в образцах клинического материала и в культуре клеток (повышение диагностической значимости культурального метода).

Литература

1. Метельская В.А., Алешкин В.А., Зверев В.В. и др. Современные методы лабораторной диагностики хламидиозов. Журн. микробиол., 2008, № 4: с. 111-117
2. 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): 59-67.
3. Ксенз И.Н., Почерняев К.Ф., Курман А.Ф. Способ определения ДНК возбудителей хламидийных инфекций в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Патент UA 11834 U, 16.01.2006
4. Мазепа В. Н., Шипулин Г. А., Бруснигина Н. Ф., Черневская О. М. Способ выявления наиболее значимых возбудителей негонококковых урогенитальных инфекций (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex S*) у детей с использованием метода ПЦР. Патент RU 2271003 C2, 27.02.2006.
5. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Способ дифференциальной диагностики представителей семейства Chlamydiaceae. Патент RU 2245369 C1, 05.05.2003.
6. Corsaro D., Greub G. Pathogenic Potential of Novel Chlamydiae and Diagnostic Approaches to Infections Due to These Obligate Intracellular Bacteria. C. Microbiology REVIEWS. 2006, Vol.19, № 2: p. 283-297
7. Cunningham M. Compositions, methods and kits for determining the presence of *Chlamydomonas pneumoniae* in a test sample. Patent WO 2006/133385 A2, 14.12.2006
8. Mahony J. B., Kathy E. Luinstra, John W. Sellors, Max A. Chernesky. Comparison of Plasmid - and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. Clin. Microb., 1993, Vol. 31, № 7: p. 1753-1758
9. Timms P. Novel diagnostic agents of chronic or persistent Chlamydial diseases and uses thereof. Patent WO 02/14516 A1, 21.02.2002
10. Tracey J. Bodetti, Timms P. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA and Antigen in the Circulating Mononuclear Cell Fractions of Humans and Koalas. Infection and Immunity. 2000, Vol. 68, № 5: p. 2744-2747
11. Burton M.J., Holland M.J., Jeffries D. et al. Conjunctival chlamydial 16S ribosomal RNA expression in trachoma: is chlamydial metabolic activity required for disease to develop? Clinical Infectious Diseases. 2006, Vol. 42, № 4: p. 463-470
12. Peterson E.M., Markoff B.A., Schuchter J., de la Maza L.M. The 7, 5 kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. Plasmid.1990, № 23: p. 144-148
13. Aldo Farencena, Maurizio Comanducci. Characterization of A New Isolate of *Chlamydia trachomatis* Which Lacks the Common Plasmid and Has Properties of Biovar trachoma. Infection and Immunity. 1997, Vol. 65, № 7: p. 2965-2969
14. Diane R. Stothard, James A. Williams. Identification of a *Chlamydia trachomatis* Serovar E Urogenital Isolate Which Lacks the Cryptic Plasmid. Infection and Immunity. 1998, Vol. 66, № 12: p. 6010-6013
15. Carlson, J. H., Porcella S. F., McClarty G., Caldwell H. D. Comparative genomic analysis of *Chlamydia trachomatis* oculotropic and genitotropic strains. Infection and Immunity.2005, Vol. 73, № 12: p. 6407-6418
16. Sriprakash K.S., Macavoy E.S. Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*. Plasmid.1987, № 18: p. 205-214
17. Comanducci M., Ricci S., Cevenini R., Ratti G. Diversity of the *Chlamydia trachomatis* common plasmid in biovars with different pathogenicity. Plasmid.1990, № 23: p. 149-154
18. Hatt C., Ward M. E., Clarke I.N. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication //Nucleic Acids Res.-1988.-№ 16.-P. 4053-4067.
19. Comanducci M., Ricci S., Ratti G. The structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells. Mol. Microbiol.1988, № 2: p. 531-538
20. Pickett M.A., Everson J.S., Pead P.J., Clarke I.N. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydomonas pneumoniae* (№ 16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. Microbiology. 2005, № 151: p. 893-903

21. Zhongyu Li, Ding Chen, Youmin Zhong, Shiping Wang, Guangming Zhong. The Chlamydial Plasmid-Encoded Protein pgp3 Is Secreted into the Cytosol of Chlamydia-Infected Cells. *Infection and Immunity*. 2008, Vol. 76, № 8: p.3415–3428

22. Carlson John H., William M. Whitmire, Deborah D. Crane 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

23. Савичева А.М., Башмакова М.А., Кошелева Н.Г. Хламидийная инфекция в акушерстве и гинекологии (диагностика, клиника, лечение). Методическое пособие.-Спб: ООО «Издательство, ЭН-Л».-2002

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
Владимир Владимирович Слободенюк¹, аспирант; Владимир Андрианович Алёшкин¹, профессор, доктор биологических наук, директор; Станислав Степанович Афанасьев¹, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора; Борис Аркадьевич Лапин², академик РАМН, профессор, доктор медицинских наук, директор; Этери Капитоновна Джикидзе², профессор, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией; Юрий Владимирович Несвижский³, профессор, доктор медицинских наук, декан медико-профилактического факультета; Николай Валентинович Воложанцев⁴, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией; Эдуард Арсеньевич Светоч⁴, профессор, доктор ветеринарных наук, заведующий отделом; Иван Алексеевич Дятлов⁴, профессор, доктор медицинских наук, директор; Олег Васильевич Рубальский⁵, профессор, доктор медицинских наук, директор научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии; Ольга Геннадьевна Гречишниковна¹, младший научный сотрудник; Елена Александровна Воропаева¹, кандидат биологических наук, начальник лаборатории; Максим Станиславович Афанасьев¹, кандидат медицинских наук, научный сотрудник; Валерия Алексеевна Метельская¹, младший научный сотрудник; Александра Львовна Байракова¹, младший научный сотрудник; Екатерина Александровна Егорова¹, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник; Евгений Олегович Рубальский⁵, студент, пятый курс, лечебный факультет, Кокушков Дмитрий Федорович доцент кафедры и Александр Викторович Караулов³, 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. Габричевского¹

Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Тел. (495)708-02-62, E-mail: info@gabrich.com

Научно-исследовательский институт медицинской приматологии²

Россия, 354376, Сочи-Адлер, Веселое-1

Тел. (8622)42-22-39, E-mail: blapin@yandex.ru

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова³

Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Тел. (495)395-64-97, E-mail: karaulov@mtu-net.ru

Центр прикладной микробиологии и биотехнологии⁴

Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район, п.г.т. Оболенск

Тел. (4967)36-00-03, E-mail: nikvol@obolensk.org

Астраханская государственная медицинская академия⁵

Россия, 414000, Астрахань, ул. Бакинская, 121

Тел. (8512)38-50-66, E-mail: rubalsky@inbox.ru

Поступила 20.04.09 г