

Совершенствование лабораторной диагностики уrogenитальной хламидийной инфекции у пациентов с нарушением репродуктивной функции, инфицированных *Chlamydia trachomatis*

В. А. Федорова^{1, 2, 3}, Э. С. Султанамедов⁴, Ю. В. Салтыков^{1, 2, 3}, С. Р. Утц⁴, В. Л. Мотин⁵

¹ ГНУ ВНИИВВИМ

601125, Владимирская область, Петушинский район, п. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1

² Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, филиал в Саратове

410028, г. Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, д. 6

³ ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

410000, г. Саратов, Театральная пл., д. 1А

⁴ ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России

410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

⁵ Университет Техаса, факультет медицины (UTMB)

г. Галвестон, США, TX 77555, 301 University Boulevard

В развитии бесплодия доминирующую роль отводят инфекциям, передаваемым половым путем (ИППП), среди которых лидирует уrogenитальная хламидийная инфекция (УГХИ), вызываемая *Chlamydia trachomatis* (СТ). Известно два варианта возбудителя, представленных дикими (wtСТ) и новыми (nvСТ) штаммами СТ с делецией размером 377 bp в участке гена *orf1* криптической плазмиды.

Цель исследования. Изучение клинического материала, полученного из уrogenитального тракта супружеских пар с бесплодием, на наличие генетического материала wtСТ и nvСТ.

Материал и методы. Клинический материал (соскобы из уретры и цервикального канала) супружеских пар ($n = 14$) в возрасте от 25 лет до 41 года на наличие специфической хламидийной ДНК wtСТ и nvСТ или специфических антигенов *C. trachomatis* исследовали моноплексными и дуплексными вариантами ПЦР, элементарных телец хламидий — ПИФ, обнаружение хламидийных антител в образцах сыворотки крови проводили методом ТИФА.

Результаты. У 100% супружеских пар с бесплодием был детектирован nvСТ с типичной делецией в 377 bp геновара E1. Отрицательные результаты на наличие ДНК wtСТ зарегистрированы у 87,5% пациентов этой группы, у одного пациента (12,5%) — вероятная коинфекция nvСТ + wtСТ геноваров E1 + D. В контрольной группе с УГХИ выявлены штаммы только wtСТ геноваров E (субтипов E1, E2, E6), G (субтипов G1, G2), F (субтип F1) и K. Показаны трудности обнаружения nvСТ при использовании МАНК, ПИФ и ТИФА, приводятся сведения о сравнительной эффективности методов.

Заключение. Хроническая УГХИ у пациентов с нарушением репродуктивной функции может быть вызвана моноинфекцией nvСТ или коинфекцией nvСТ + wtСТ. Отрицательные результаты МАНК не могут в 100% случаев коррелировать с отсутствием УГХИ и требуют дальнейшего подтверждения в тестах, позволяющих выявлять все известные варианты *C. trachomatis*.

Ключевые слова: **уrogenитальная хламидийная инфекция, *Chlamydia trachomatis*, новый «шведский» вариант, nvСТ, ПЦР-диагностика, бесплодие.**

Контактная информация: feodorovav@mail.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2017; (2): 34—44.

Improvement of laboratory diagnostics of urogenital chlamydial infection in patients with impaired reproductive functions found to be infected with *Chlamydia trachomatis*

V. A. Fedorova^{1,2,3}, E. S. Sultanakhmedov⁴, Y. V. Saltykov^{1,2,3}, S. R. Utz⁴, V. L. Motin⁵

¹ State Science Institution National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology
Academician Bakoulov str., 1, Volginsky, Petushki area, Vladimir region, 601125, Russia

² Federal Research Center of Virology and Microbiology, the Branch in Saratov
53-y Strelkovoy Divizii str., 6, Saratov, 410028, Russia

³ Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov
Teatral'naya pl., 1A, Saratov, 410000, Russia

⁴ Saratov State Medical University named after V. I. Rasumovsky
Bol'shaya Kazach'ya str., 112, Saratov, 410012, Russia

⁵ University of Texas Medical Branch (UTMB), University Boulevard
301, Galveston, TX 77555, USA

The dominant role in human infertility has been attributed to sexually transmitted infections (STIs) with a leading contribution of urogenital chlamydial infection (UGCI) caused by *Chlamydia trachomatis* (CT). The two variants of this pathogen are represented by the wild-type (wtCT) and new Swedish (nvCT) strains containing 377 bp deletion within the cryptic plasmid *orf1* gene.

Objective. The purpose of the study was investigation of the clinical specimens obtained from the urogenital tract of couples coping with infertility for the presence of genetic material of wtCT and nvCT.

Material and methods. Clinical samples (scrapings from the urethra and cervix) obtained from 25 to 41 years old couples ($n = 14$) were tested for the presence of identifiable wtCT and nvCT chlamydia DNA by monoplex and duplex PCR, specific antigens *C. trachomatis* in elementary bodies by using immunofluorescence analysis (IFA), while detection of anti-chlamydia antibodies in sera was determined by immunoenzymatic assay (IEA).

Results. The nvCT variant with typical deletion of 377 bp within the *orf1* gene that belongs to the genovar E subtype E1 was detected in 100% of couples with infertility. The negative results of DNA testing for wtCT were registered in 87.5% of patients from this group, while one individual (12.5%) was likely coinfecting with nvCT and wtCT of E1 and D genovars, respectively. The wtCT strains of genovar E (subtypes E1, E2, E6), G (subtypes G1, G2), F (subtypes F1), and K were identified in control group among patients with UGCI. The study revealed difficulties in detection of nvCT by nucleic acid amplification test (NAAT), IFA, and IEA; data on comparison of the efficacy of these methods are presented.

Conclusion. Chronic UGCI in patients with reproductive dysfunctions can be caused by nvCT alone or as result of co-infection with nvCT and wtCT. The negative results in NAAT may not 100% correlate with the absence of UGCI that requires further confirmation in tests allowing detection of all known variants of *C. trachomatis*.

Key words: uro-genital chlamydial infection, *Chlamydia trachomatis*, novel Swedish strain, nvCT, PCR-diagnostics, infertility.

Введение

Сохранение и укрепление репродуктивного здоровья населения является важной и одновременно сложной задачей современного здравоохранения и одним из приоритетных направлений государственной политики РФ [1]. Несмотря на серьезный прогресс в повышении доступности качественной медицинской помощи во многом благодаря улучшению материально-технического обеспечения учреждений здравоохранения, а также осуществлению эффективных мероприятий по предупреждению и раннему выявлению инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) [2], общее количество бесплодных браков среди лиц репродуктивного возраста достигает 15—18% [3]. По мнению экспертов [3], примерно для каждой седьмой пары в нашей стране бесплодие является одной из важнейших проблем планирования семьи.

Как известно, нарушение фертильности мужчин и женщин может быть обусловлено различными патологическими состояниями организма: инфекционными процессами, органическими дисфункциями, аутоиммунными заболеваниями, эндокринопатиями и др. [4]. Однако доминирующую роль в развитии бесплодия отводят инфекциям, передаваемым половым путем (ИППП), среди которых, безусловно, лидирует урогенитальная хламидийная инфекция (УГХИ), вызываемая *Chlamydia trachomatis* [5]. По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется более 90 млн новых случаев инфицирования лиц репродуктивного возраста данным патогеном с тенденцией к росту заболеваемости как в развитых, так и в развивающихся странах [4]. При этом расходы национальных служб здравоохранения на лечение пациентов с УГХИ ежегодно составляют до 10 млрд долларов США [4, 6]. Считается, что в настоящее время более 30% молодых женщин инфицированы *C. trachomatis* и имеют лабораторное подтверждение этого [6].

Глобальный характер распространенности УГХИ и отсутствие специфических клинических проявлений заболевания предопределили важность лабораторной диагностики для выявления возбудителя как в нашей стране, так и за рубежом. С этой целью разработаны и широко применяются иммуносерологические, культуральный и молекулярно-биологические методы, направленные на выявление как антигенов и/или антител к *C. trachomatis* (твердофазный иммуноферментный анализ — ТИФА), так и непосредственно самого возбудителя (прямая иммунофлюоресценция — ПИФ), различные клеточные линии, эмбрионы и т. д., или специфической хламидийной ДНК/РНК [4]. Несмотря на широкую востребованность, согласно точке зрения международных экспертов [4], далеко не все из перечисленных методов по основным параметрам (чувствительности и специфичности) соответствуют критериям, предъявляемым к диагностическим тестам, рекомендованным для установления диагноза

УГХИ. В частности, выявление хламидийных антител в большей степени указывает на перенесенную ранее УГХИ, чем на активность и динамику инфекционного процесса, а чувствительность культурального метода не превышает 40—70% [4]. Поэтому основное место в диагностике УГХИ в настоящее время международные эксперты отводят методам амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) [4, 7]. Однако даже среди многообразия современных высокочувствительных молекулярно-диагностических тест-систем, основанных на детекции различных генетических мишеней хламидий с применением разных методов выявления нуклеиновых кислот, равно как и диагностических платформ последнего поколения, зачастую сложно подобрать набор, обеспечивающий детекцию специфической хламидийной ДНК в клиническом материале 100% пациентов с УГХИ.

Сравнительные испытания основных характеристик отечественных тест-систем для выявления ДНК *C. trachomatis* в клинических образцах больных людей методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) трех компаний-производителей («ДНК-технология», «Литех» и «Интерлабсервис», Москва) доказали высокую специфичность и чувствительность каждого набора, сопоставимые с аналогичными параметрами зарубежных китов производства США (Roche Diagnostics, Abbot Molecular Diagnostics, Gen-Probe Inc., Becton Dickinson Diagnostic Systems и др.) [8]. Сообщалось также о соответствии в целом указанных характеристик российских ПЦР-систем таковым наборов, одобренных Food and Drug Administration (FDA, США), в частности Cobas Amplicor (традиционная/конвенциональная ПЦР) и Cobas TagMan48 (реал-тайм ПЦР) (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, США), как тест-систем, полностью отвечающих всем требованиям мирового практического здравоохранения [9]. Более того, некоторые отечественные ПЦР тест-системы оказались пригодны для детекции как диких штаммов хламидий (wtCT от англ. wild type of *C. trachomatis*), так и нового «шведского» варианта *C. trachomatis* (nvCT от англ. novel *C. trachomatis*), впервые детектированного в 2006 г. у пациентов с УГХИ в Швеции [10]. Как известно, характерной особенностью таких «дефектных» штаммов хламидий является наличие делеции размером 377 bp в участке гена *orf1* криптической плазмиды, который долгое время использовался в качестве мишени в коммерческих ПЦР тест-системах, применяемых в большинстве диагностических лабораторий мира [11, 12]. Соответственно, поэтому штаммы nvCT, в отличие от wtCT, невозможно выявить в ПЦР коммерческими наборами, направленными на выявление указанного индивидуального гена *C. trachomatis*, что зачастую может обеспечивать получение ложноотрицательных результатов лабораторного анализа [11—12]. В такой ситуации примерно 10 лет назад оказалась Швеция,

в отдельных регионах которой обнаруживалось 20—64% пациентов с УГХИ, инфицированных дефектными штаммами *C. trachomatis* и не выявляемых обычной ПЦР [13].

Разработка и широкое применение для лабораторной диагностики наборов для выявления других генов плазмидного репликона или дуплексных вариантов ПЦР с одновременной детекцией генов плазмиды и хромосомы, равно как и обязательная регистрация новых случаев инфицирования УГХИ, значительно повысили эффективность выявления бактерий *C. trachomatis* в клиническом материале и, соответственно, первоначально обеспечили более чем двукратное увеличение заболеваемости в ряде европейских стран, составив в 2000 г. 143 случая на 100 тыс. населения, а в 2009 г. — 332 на 100 тыс. населения [14]. Последующее резкое снижение количества пациентов с УГХИ в указанных странах подтвердило правильность стратегии, направленной на применение ПЦР тест-систем для детекции обоих вариантов возбудителя [15].

В РФ официальные статистические данные указывают прямо противоположную динамику: показатели заболеваемости УГХИ за последние 12 лет снизились на 50,6% [2]. С одной стороны, это свидетельствует о повышении качества оказания населению медицинской помощи, а с другой — наводит на мысль о необходимости более углубленного лабораторного обследования пациентов с отрицательными результатами моноплексной ПЦР, у которых имеются какие-либо другие, пусть даже косвенные, признаки заболевания. В первую очередь это может быть наличие скудных клинических проявлений в виде незначительных признаков цервицита или уретрита, выявление хламидийных антител даже в невысоких диагностических титрах, анамнестических данных об потенциальных осложнениях после ранее перенесенной УГХИ или сведений об обнаружении специфической хламидийной ДНК у партнера. Особую важность своевременное выявление *nvST* может иметь для супружеских пар с диагнозом бесплодие. Очевидно, в последнем случае клинический материал должен быть в обязательном порядке исследован только теми диагностическими тестами, которые позволяют детектировать «дефектные» штаммы *C. trachomatis*.

Недавно сообщалось о выявлении в РФ (Санкт-Петербург, Саратов) отдельных случаев инфицирования пациентов с УГХИ *nvST* при их целенаправленном поиске коммерческими или экспериментальными вариантами ПЦР [10, 16]. Также есть сведения о различиях (до 50,9%) в результатах ПЦР при сравнении с референтным дуплексным вариантом анализа (Roche Cobas Amplicor) или альтернативными иммунотестами (ПИФ, дот-иммуноанализом — ДИА), позволяющими детектировать хламидийные антигены, кодируемые хромосомой, или элементарные тельца *C. trachomatis*

[17, 18]. Вполне вероятно, что по крайней мере определенная часть ложноотрицательных результатов моноплексных вариантов ПЦР может обеспечиваться наличием у пациентов с УГХИ *nvST*. При этом остается неясным, играют ли такие дефектные штаммы роль возбудителя хламидиоза в развитии осложнения в виде бесплодия, и если да, то в виде самостоятельного этиологического фактора или как коинфекция с дикими штаммами хламидий.

Целью настоящего исследования явилось изучение клинического материала, полученного из урогенитального тракта супружеских пар с бесплодием, на наличие генетического материала дикого и/или нового «шведского» вариантов *C. trachomatis* (*wtST* и *nvST*).

Материал и методы

В исследовании принимали участие 28 человек — 14 супружеских пар (14 мужчин и 14 женщин) репродуктивного возраста от 25 до 44 лет (средний возраст — 34,4 года), обратившихся в Клинику кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России в период 2012—2014 гг. Пациенты были разделены на три группы, включающие супружеские пары: №1 — четыре пары (4 женщины и четверо мужчин, $n = 8$) с диагнозом бесплодие и в анамнезе перенесенной ранее хронической УГХИ; №2 — 5 гетеросексуальных пар ($n = 10$) с подтвержденной УГХИ и с ненарушенной репродуктивной функцией (положительный контроль); №3 — 5 гетеросексуальных пар ($n = 10$) заведомо здоровых доноров, не имевших симптомов со стороны мочеполювого тракта (отрицательный контроль). Все пациенты и здоровые доноры были ознакомлены с этапами исследования и подписали информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство.

Каждому пациенту проведено клинико-лабораторное и инструментальное обследование с целью исключения других нозологий, а также иных ИППП. Обследование включало изучение жалоб, сбор анамнеза, физикальный осмотр, лабораторные исследования (бактериоскопия для определения *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*; ПЦР для идентификации *C. trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, вируса папилломы человека, вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва); ТИФА для исключения сифилитической инфекции, вирусных гепатитов В и С, ВИЧ (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск), а также инструментальное обследование (ультразвуковое сканирование мочеполювых органов). Лабораторные методы исследования включали бактериоскопическое исследование отделяемого цервикального канала, влагалища и уретры, эякулята и секрета предстательной

железы в соответствии с рекомендациями ВОЗ [19]. Бактериоскопическое исследование клинического материала на наличие гонореи и трихомонад проводилось согласно методическим рекомендациям МЗ РФ «Стандартизация медицинской помощи больным гонококковой инфекцией» (Приказы №173, 176 от 28.02.2005), Положения МЗ РФ «О мерах по предупреждению распространения заболеваний, передающихся половым путем» (Приказ №291 от 30.07.2001) и реализации мероприятий в рамках подпрограммы «О мерах по предупреждению дальнейшего распространения заболеваний, передаваемых половым путем», утвержденной Постановлением Правительства РФ №280 от 10.05.2007. Материалом для всех молекулярно-биологических исследований служили клинические образцы (соскобы из уретры и цервикального канала), взятие которых производилось одноразовыми цитощетками или ватными зондами.

ДНК из материала изолировали методом нуклеосорбции с применением набора «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Наличие специфической хламидийной ДНК wtCT и nvCT вариантов определяли ПЦР коммерческими наборами «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*, комплект 1» (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск) для одновременного выявления хромосомного и плазмидного генов *C. trachomatis* в режиме реального времени (дуплекс-ПЦР) или «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-EPH» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва), позволяющим детектировать плазмидную ДНК хламидий (плазмид-ПЦР). Также все клинические образцы тестировали в ПЦР с панелью оригинальных праймеров для выявления плазмидных генов (*orf1* с или без делеции, *orf2* и *orf8* (соответственно варианты nvCT или wtCT) или участков гена *omp1*, кодирующего основной белок наружной мембраны MOMP (от англ. Major outer membrane protein), как указано ранее [16, 20]. Определение генов хламидий по варибельному региону VD2 гена *omp1* *C. trachomatis* проводили согласно рекомендациям [21]. Все праймеры были валидированы относительно коммерческого набора Roche Cobas Amplicor (США). Секвенирование ампликонов для подтверждения наличия делеции в гене *orf1* и генотипирования осуществляли в компании «Евроген» (<http://evrogen.ru/>, Москва). Элементарные тельца *C. trachomatis* в клинических образцах выявляли ПИФ с использованием набора «ХлаМоноСкрин-2» производства ООО «Ниармедик плюс» (Москва). Хламидийные антитела в сыворотках пациентов детектировали в ТИФА с применением наборов «ХламиБест *C. trachomatis*-IgG/IgA/IgM» (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск) с определением диагностических титров согласно инструкции к наборам.

Статистическая обработка данных проводилась общепринятыми методами, как указано ранее [4, 18].

Результаты

По результатам клинко-лабораторного обследования у всех женщин группы №1 с диагнозом бесплодие выявлены незначительные клинические признаки цервицита, подтвержденные данными микроскопического анализа материала. У всех пациенток наблюдалось слизисто-гнойное отделяемое из цервикального канала; у одной пациентки — болезненные тракции шейки матки, у двух пациенток при проведении бимануального исследования определялись характерные симптомы воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), подтвержденные результатами трансвагинального ультразвукового исследования (ТВУЗИ) (табл. 1). У женщин контрольной группы №2 наблюдались типичные проявления УГХИ в виде цервицита и уретрита с наличием слизисто-гнойных выделений из цервикального канала.

Только у одного мужчины группы №1 был выявлен уретрит, а у трех пациентов при проведении пальцевого ректального исследования наблюдалось изменение консистенции и увеличение размеров предстательной железы (ПЖ) и болезненность при пальпации. У этих же пациентов по результатам трансректального ультразвукового исследования (ТРУЗИ) отмечалось наличие ультразвуковых критериев простатита. Еще у одного мужчины зафиксированы аналогичные ультразвуковые признаки воспаления в ПЖ, хотя изменений при пальцевом ректальном исследовании выявлено не было (см. табл. 1). Пациенты группы №2 продемонстрировали практически весь спектр клинических симптомов со стороны верхних и нижних отделов мочеполового тракта: ВЗОМТ, уретрит, эпидидимит, простатит, слизисто-гнойные выделения из уретры, которые были представлены у некоторых пациентов в разных сочетаниях. Ни у кого из пациентов не было выявлено клинических проявлений или возбудителей других ИППП.

Изучение спермограммы в целом показало сходные изменения микро- и макроскопических характеристик эякулята у пациентов с бесплодием группы №1 аналогично больным с УГХИ группы №2 (табл. 2). В первую очередь обращала на себя внимание явная олигозооспермия, т.е. значительное снижение общего количества и концентрации сперматозоидов у половины пациентов с бесплодием, хотя это оказалось менее выраженным по сравнению с параметрами, зарегистрированными у представителей группы №2 (положительный контроль). При этом в группе №1 в 100% (4/4) случаев также наблюдалось изменение подвижности сперматозоидов. Только у 40% (2/5) пациентов группы №2 зарегистрировано значительное снижение количества сперматозоидов с прогрессивной подвижностью. В контрольной группе №3 отмечено полное соответствие нормам ВОЗ в виде нормозооспермии [19]. Также следует отметить изменение макроскопических параметров,

Таблица 1 Сравнительная характеристика клинических проявлений УГХИ у пациентов групп № 1—3

Группа пациентов	Пол	Генетический вариант <i>C. trachomatis</i>	Клиническая характеристика				Клинические проявления**													
			наличие субъективных признаков		отсутствие субъективных признаков		признаки цервицита/уретрита		слизисто-гнойные выделения из цервикального канала/уретры		дисурия		симптомы проктита		бесплодие		ВЗОМТ/эпидидимит		простатит	
			абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	Женщины	Вариант pvCT	1/4	25	3/4	75	4/4	100	4/4	100	0/4	0	0/4	0	4/4	100	2/4	50	—	—
2		Вариант wtCT	5/5	100	0	0	5/5	100	5/5	100	2/5	40	0/5	0	0/5	0	1/5	20	—	—
3		Контроль*	0/5	0	5/5	100	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0	—	—
1	Мужчины	Вариант pvCT	1/4	25	3/4	75	1/4	25	1/4	25	0/4	0	0/4	0	4/4	100	1/4	25	4/4	100
2		Вариант wtCT	5/5	100	0	0	5/5	100	5/5	100	2/5	40	0/5	0	0/5	0	2/5	40	2/5	40
3		Контроль*	0/5	0	5/5	100	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0

Примечание. * — отрицательный контроль — здоровые доноры. ** — согласно рекомендациям [4].

Таблица 2 Сравнительный анализ эякулята пациентов групп № 1—3 в соответствии с рекомендациями ВОЗ*

Параметр	Норма ВОЗ*	Соответствие норме ВОЗ у пациентов группы номер					
		1 (вариант pvCT)		2 (вариант wtCT)		3 (контроль**)	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Объем, мл	> 1,5	4/4	100	5/5	100	5/5	100
Вязкость, см	0,1—2,0	1/4	25	1/5	20	5/5	100
Цвет	белый	3/4	75	1/5	20	5/5	100
pH	7,2—7,8	2/4	50	2/5	40	5/5	100
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	> 15,0	2/4	50	1/5	20	5/5	100
Общее кол-во сперматозоидов в эякуляте, млн	> 39,0	2/4	50	1/5	20	5/5	100
Кол-во сперматозоидов с прогрессивной подвижностью, %	> 32,0	0/4	0	2/5	40	5/5	100
Кол-во сперматозоидов с подвижностью, %	> 40,0	4/4	100	5/5	100	5/5	100
Морфология (нормальных форм), %	4	2/4	50	1/5	20	5/5	100
Кол-во живых сперматозоидов, %	> 58,0	0/4	0	5/5	100	5/5	100
Агглютинация сперматозоидов	Отсутствует	0/4	0	2/5	40	5/5	100
Агрегация сперматозоидов	Отсутствует	2/4	50	1/5	20	5/5	100
Лейкоциты, млн/мл	< 1,0	3/4	75	2/5	40	5/5	100
MAR-тест***, %	< 50	0/4	0	5/5	100	5/5	100

Примечание. * — представлено в источнике [18]. ** — отрицательный контроль — здоровые доноры. *** — от Mixed antiglobulin reaction [18].

Таблица 3 Сравнительная эффективность детекции специфической хламидийной ДНК в ПЦР, ПИФ и ТИФА у пациентов с УГХИ

Группа пациентов	Генетический вариант <i>C. trachomatis</i>	Коммерческие варианты ПЦР				ПЦР на мишень								ПИФ		ТИФА		Геновар <i>C. trachomatis</i>	Кол-во выявленных случаев	
		плазмид-ПЦР		дуплекс-ПЦР*		плазмидная				хромосомная				абс.	%	абс.	%		абс.	%
		абс.	%	абс.	%	ПЦР- <i>orf2</i>		ПЦР- <i>orf8</i>		ПЦР- <i>nvCT</i>		ПЦР- <i>omp1</i>								
						абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%			
1	Вариант <i>nvCT</i>	2/8	25	2/8	25	0/8	0	3/8	37,5	8/8	100	8/8	100	5/8	62,5	7/8	87,5	E (E1, E+D (E1+D))	7/8	87,5
2	Вариант <i>wtCT</i>	6/10	60	10/10	100	10/10	100	10/10	100	0/10	0	10/10	100	10/10	100	5/10	50	E (E1, E2, E6) G (G1, G2) F (F1) K	4/10	40
3	Контроль**	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0	0	0

Примечание. * — одновременная детекция плазмидной и хромосомной мишени. ** — отрицательный контроль — здоровые доноры.

таких как вязкость и цвет, что могло косвенно указывать на дисфункцию предстательной железы [19] у большинства пациентов группы №2 и пациентов с бесплодием из группы №1. Правомерность данного предположения может быть подтверждена лейкоцитоспермией у тех же пациентов (табл. 2). Почти у половины мужчин групп №1 и 2 имел место также незначительный сдвиг pH эякулята в щелочную сторону. Тератозооспермия в виде морфологически аномальных сперматозоидов обнаружена только у половины мужчин с бесплодием, что в 2,5 раза меньше, чем у пациентов группы №2. Наиболее важным следует считать практически полное отсутствие живых сперматозоидов у мужчин группы №1. Ни у одного пациента контрольных групп №2 и 3 снижения жизнеспособности сперматозоидов не выявлено.

Другой отличительной особенностью является наличие выраженной сперматоагглютинации у всех 100% (4/4) пациентов с бесплодием (группа №1), что в полной мере было подтверждено результатами МАР-теста (от англ. Mixed antiglobulin reaction). Аналогичный параметр оказался менее выражен у пациентов с УГХИ контрольной группы №2, хотя среди последних было выявлено значительно меньше (на 30%) случаев агрегации сперматозоидов — 20% (1/5) против 50% (2/4) в группе №1.

При исследовании клинического материала пациентов на наличие или отсутствие ДНК *C. trachomatis* у 100% (8/8) пациентов группы №1 был детектирован *nvCT*, что подтверждено последующим секвенированием индивидуальных ампликонов. Как видно на рисунке, расшифровка нуклеотидных последовательностей показала наличие типичной делеции размеров

377 bp., полностью идентичной таковой в референтном штамме *nvCT C. trachomatis* Sweden 2, ранее выделенном от пациента с УГХИ в Швеции и депонированном в мировом геномном банке (номера доступа (Accession number): NC_017441.1 и FN652779.2). Ни в одном из клинических образцов пациентов групп №2 и 3 не было выявлено положительных проб, содержащих аналогичную делецию (табл. 3). Наибольшую эффективность определения специфической хламидийной ДНК у пациентов с бесплодием (группа №1), кроме специально сконструированной ПЦР-*nvCT*, показали варианты ПЦР, направленные на детекцию хромосомного гена *omp1* или гена криптической плазмиды *orf8*. В указанной группе оба коммерческих набора позволили выявить относительно небольшое количество позитивных ответов, хотя и большее по сравнению с ПЦР, в которой в качестве мишени была использована последовательность гена *orf2*. Оба коммерческих набора оказались довольно эффективными при детекции хламидийной ДНК у доноров обеих контрольных групп (№2 и 3), причем дуплексный вариант анализа показал преимущества при выявлении ДНК *wtCT* по крайней мере на 40%, поскольку обеспечивал 100% (10/10) позитивных реакций у пациентов группы №2 по сравнению с моноплексным вариантом, способным определять хламидийную ДНК только у 60% (6/10) обследуемых той же группы (см. табл. 3). При этом наличие антихламидийных антител в диагностических титрах 1:32 — 1:160 (согласно инструкции к наборам) регистрировалось у большинства пациентов с бесплодием (группа №1) и значительно реже (не более чем у половины) у больных с УГХИ (группа №2). Напротив, ПИФ усту-

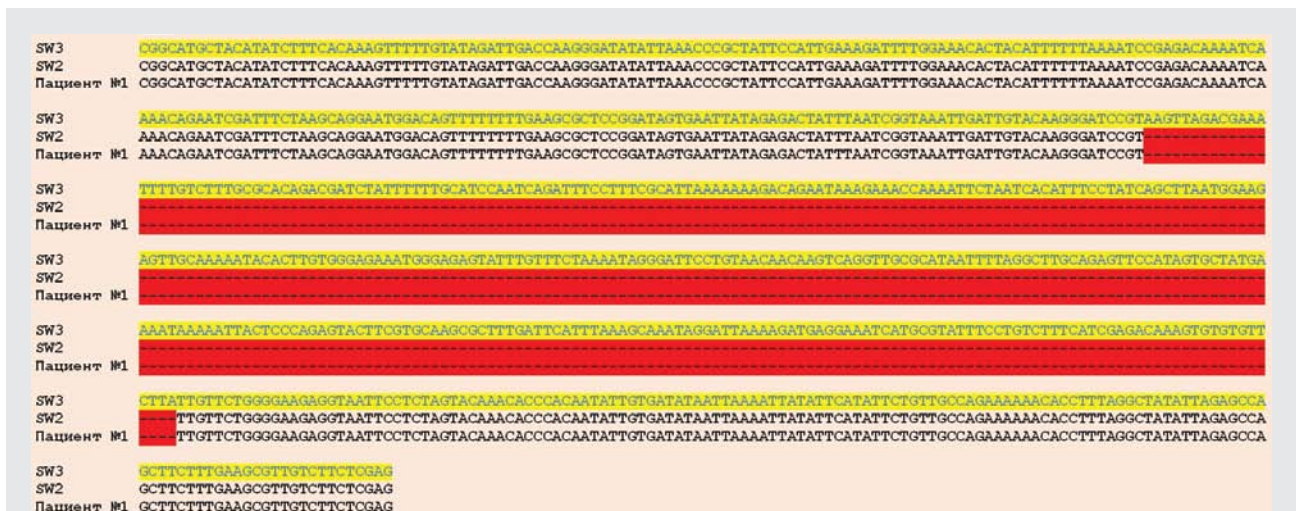


Рисунок. Репрезентативное сравнение фрагмента гена *orf1* референтных штаммов *C. trachomatis* SW2 (nvCT) и SW3 (wtCT) с расшифрованной последовательностью ДНК, изолированного из клинического материала пациента № 1 с бесплодием (группа № 1). Делеция в референтном штамме SW2 (nvCT) и материале пациента обозначена символами «----» и выделена красным маркером

пал по количеству позитивных ответов ТИФА и вариантам ПЦР, направленным на детекцию nvCT и гена *omp1*, но демонстрировал 100% эффективность при исследовании клинических образцов на наличие или отсутствие клеток *C. trachomatis* у доноров обеих контрольных групп — 10/10 и 0/10 в группах №2 и 3 соответственно (см. табл. 3).

Генотипирование хламидийной ДНК также показало определенные различия в принадлежности штаммов возбудителя УГХИ к тому или иному субтипу. Так, у пациентов группы № 1 была выявлена ДНК только одного геновара — E1, идентичного штамму *C. trachomatis* E/Bour, ранее изолированного из конъюнктивы пациента с УГХИ в Калифорнии (номер в Генном банке NC_020971.1). Только у одной женщины этой группы одновременно была обнаружена хламидийная ДНК геновара D (см. табл. 3). У пациентов группы №2 удалось обнаружить большее разнообразие в виде четырех различных геноваров (E, G, F и K), причем первые два оказались представлены тремя (штаммы геновара E) или двумя (штаммы геновара G) субтипами, что было обнаружено по наличию типичных однонуклеотидных замен в позициях 997 и 995 у штаммов геновара E и в позиции 1003 у штаммов геновара G аналогично ранее сделанным наблюдениям [22, 23].

Изучение сравнительной эффективности полностью подтвердило высокую специфичность и положительную прогностическую ценность (ППЦ) каждого из использованных в настоящем исследовании ме-

тодов выявления хламидийной ДНК как у пациентов с бесплодием (группа № 1), так и у доноров обеих контрольных групп. Однако в группе пациентов с УГХИ, инфицированных только nvCT, wtCT или обоими вариантами *C. trachomatis*, только у двух методов — ПЦР-nvCT или ПЦР-*omp1*, были зафиксированы 100% (8/8 реакций) чувствительность и отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ) (табл. 4). Детекцию wtCT оказалось возможно проводить большим количеством методов, включая ПИФ и все использованные нами экспериментальные варианты ПЦР. При этом коммерческий метод ПЦР, позволяющий выявлять только плазмидную ДНК, явно уступал по чувствительности и ОПЦ коммерческому дуплексному набору, направленному на одновременную детекцию плазмидной и хромосомной хламидийной ДНК.

Обсуждение

В настоящем исследовании впервые доказана возможность обнаружения специфической хламидийной ДНК у пациентов с хронической УГХИ, осложненной бесплодием, и ложноотрицательными результатами МАНК. Детальное изучение клинического материала, полученного из нижних отделов урогенитального тракта супружеских пар с соответствующей патологией, позволило выявить наличие у всех пациентов этой группы детектируемых количеств ДНК nvCT. Очевидно, последний является этиологическим фактором УГХИ, поскольку других патогенов у больших данной группы обнаружено не было. Только в одном случае удалось детектировать

Таблица 4 Сравнительная эффективность использования методов диагностики УГХИ у пациентов групп № 1—3

Метод детекции <i>C. trachomatis</i>	Чувствительность	Специфичность	ППЦ	ОПЦ
Группа № 1 (вариант nvST) Плазмид-ПЦР	64,3	100	100	50
Дуплекс-ПЦР	75	100	100	62,5
ПЦР- <i>orf2</i>	69,2	100	100	55,6
ПЦР- <i>orf8</i>	78,3	100	100	66,7
ПЦР-nvST	100	100	100	100
ПЦР- <i>omp1</i>	100	100	100	100
ПЦР-nvST+ ПЦР- <i>omp1</i>	100	100	100	100
ПИФ	85,7	100	100	76,9
ТИФА	75	100	100	62,5
Группы № 2 (вариант wtST — положительный контроль) и № 3 (здоровые доноры — отрицательный контроль) Плазмид-ПЦР	71,4	100	100	71,4
Дуплекс-ПЦР	100	100	100	100
ПЦР- <i>orf2</i>	100	100	100	100
ПЦР- <i>orf8</i>	100	100	100	100
ПЦР-nvST	0*	100	0*	100
ПЦР- <i>omp1</i>	100	100	100	100
ПЦР-nvST+ ПЦР- <i>omp1</i>	100	100	100	100
ПИФ	100	100	100	100
ТИФА	66,7	100	100	66,7

Примечание. * — неприменимо.

одновременно ДНК обоих вариантов *C. trachomatis*, что может указывать на способность nvST преимущественно и самостоятельно вызывать развитие осложненных вариантов УГХИ, хотя данный вариант возбудителя, видимо, может встречаться и в виде коинфекции с wtST. При этом перед практическим врачом стоит трудная задача своевременного выявления пациентов, инфицированных nvST (моноинфекция), либо идентификации nvST в виде коинфекции с wtST. Ситуация осложняется почти полным отсутствием у больных, инфицированных nvST, специфических субъективных и объективных проявлений заболевания, т.е. фактически указывает на асимптоматическое течение УГХИ, вызванного данным вариантом *C. trachomatis* [24]. Основываясь на данных литературы [4, 8, 9, 11, 12, 16, 18, 20] и настоящего исследования (см. табл. 3—4), далеко не каждый тест или вариант МАНК, даже такой самый современный, высокочувствительный, как ПЦР в реальном времени, позволяющий детектировать отдельные микробные

клетки, способен реально выявлять в клиническом материале штаммы хламидий с вариабельностью в отдельных локусах генома. Поэтому задача своевременной детекции мутантных штаммов, отличающихся от диких отсутствием всего нескольких сотен нуклеотидов, кажется неразрешимой без целенаправленного поиска таких микроорганизмов. С одной стороны, оба отечественных коммерческих набора, использованных в настоящей работе, как было заявлено [10], должны детектировать nvST. Однако по факту оба набора идентифицировали хламидийную ДНК не более чем в 25% (2/8) образцов, содержащих ДНК nvST, как было установлено в ПЦР-nvST и подтверждено секвенированием (см. рисунок). Наличие ДНК криптической плазмиды *C. trachomatis* в этих же образцах было также обнаружено вариантом ПЦР, нацеленным на выявление гена *orf8*, т.е. соответственно двумя независимыми тестами, а генотипирование позволило установить принадлежность обнаруженных штаммов хламидий к геновару E субтипу E1, что

может подтверждать определенную способность обоих коммерческих тестов выявлять в отдельных случаях nvCT в клиническом материале. В то же время здесь нельзя исключать потенциальную коинфекцию с дикими штаммами хламидий того же субтипа, которую мы четко зарегистрировали у одной из пациенток с бесплодием в виде штаммов хламидий двух разных геноваров — E и D (см. табл. 3). Может ли этот случай оказаться уникальным сочетанием двух субтипов nvCT (D и E) как второго варианта «шведского» делеционного мутанта, пока сказать сложно, поскольку в доступной литературе отсутствуют такие данные.

Следует отметить также относительно низкую диагностическую значимость гена *orf2* (CDS2), который из-за своей высокой консервативности рассматривается Seth-Smith et al. [25] в качестве одной из наиболее перспективных альтернативных молекулярных мишеней для детекции nvCT. Результаты настоящего исследования указывают на довольно низкую чувствительность, ОПЦ и практически отрицательные результаты тестирования в ПЦР-*orf2* ДНК клинических образцов пациентов, инфицированных указанным вариантом *C. trachomatis* (см. табл. 2—3), что может быть связано помимо мутации в гене *orf1* с дополни-

тельными модификациями в других генах плазмиды, в частности *orf2*, аналогично штаммам nvCT, выявляемым у пациентов за рубежом [26].

Тем не менее резкое снижение показателей фертильности в группе № 1 у мужчин с бесплодием диктует необходимость скорейшего внедрения в практическое здравоохранение методов, эффективно детектирующих оба варианта возбудителя УГХИ — nvCT и wtCT.

Заключение

Появление новых генетических вариантов *C. trachomatis* создает серьезные трудности лабораторной диагностики возбудителя УГХИ и может обеспечивать определенное количество ложноотрицательных результатов при тестировании клинического материала пациентов МАНК, направленными на детекцию только wtCT. Соответственно, отрицательные результаты МАНК не могут в 100% случаев коррелировать с отсутствием УГХИ и в определенных случаях (анамнестические и лабораторные параметры) требуют дальнейшего подтверждения в тестах, позволяющих выявлять все известные варианты *C. trachomatis*, в первую очередь nvCT как один из наиболее эпидемически опасных штаммов хламидий. ■

Литература

1. Указ Президента РФ № 1351 от 09.10.2007 «Об утверждении Концепции демографической политики Российской Федерации на период до 2025 года». Собрание законодательства Российской Федерации от 15.10.2007. №42, ст. 5009 с изменениями и дополнениями от 1 июля 2014 г.
2. Kubanova A. A., Melekhina L. E., Kubanov A. A., Bogdanova E. V. Resources and activities of dermatovenereological medical organizations in Russian Federation in 2013. Vestnik Dermatol Venerol 2014; (3): 16—36. [Кубанова А. А., Мелехина Л. Е., Кубанов А. А., Богданова Е. В. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля в Российской Федерации в 2013 году. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (3):16—36.]
3. Murzabayeva S.Sh. The importance of primary preventive measures in reproductive health preservation of Russian Federation population. Pediatric and Adolescent Reproductive Health 2014; (2): 15—19. [Мурзабаева С. Ш. Первичная профилактика — приоритетное направление в сохранении репродуктивного здоровья населения в Российской Федерации. Репродукт здоровье детей и подростков 2014; (2): 15—19.]
4. Domeyka M., Savicheva A. M., Sokolovskiy E., Ballard R., Unemo M. Guidelines for the laboratory diagnosis of infections of the urogenital tract. Spb: Izd-vo N-L 2012: 10—47. [Домейка М., Савичева А. М., Соколовский Е., Баллард Р., Унемо М. Руководство по лабораторной диагностике инфекций уrogenитального тракта. СПб: Изд-во Н-Л 2012: 10—47.]
5. Torrone E., Papp J., Weinstock H. Prevalence of Chlamydia trachomatis Genital Infection Among Persons Aged 14–39 Years — United States, 2007–2012. CDC, MMWR <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6338a3.htm> (26 September 2014)
6. Chiaradonna C. The Chlamydia cascade: enhanced STD prevention strategies for adolescents. J Pediatr Adolesc Gynecol 2008;21(5):233–41.
7. WHO. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Geneva: World Health Organization, 2013.
8. Shipitsyna E., Zolotoverkhaya E., Agné-Stadling I., Krysanova A., Savicheva A., Sokolovsky E., Domeika M., Unemo M. First evaluation of six nucleic acid amplification tests widely used in the diagnosis of Chlamydia trachomatis in Russia. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009 Mar;23(3):268–76.
9. Emmadi R., Boonyaratanakornkit J. B., Selvarangan R., Shyamala V., Zimmer B. L., Williams L., Bryant B., Schutzbank T., Schoonmaker M. M., Amos Wilson J. A., Hall L., Pancholi P., Bernard K. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing: a review of FDA-approved and cleared assays. J Mol Diagn 2011; 13(6): 583—604.
10. Shipitsyna E., Hadad R., Ryzhkova O., Savicheva A., Domeika M., Unemo M. First reported case of the Swedish new variant of Chlamydia trachomatis (nvCT) in Eastern Europe (Russia), and evaluation of Russian nucleic acid amplification tests regarding their ability to detect nvCT. Acta Derm Venereol. 2012; 92(3):330—1.
11. Ripa T., Nilsson P. A variant of Chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. Euro Surveill 2006; 9;11(11):E061109.2.
12. Ripa T., Nilsson P. A. A Chlamydia trachomatis strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. Sex Transm Dis 2007;34(5):255–6.
13. Pedersen L. N., Herrmann B., Møller J. K. Typing Chlamydia trachomatis: from egg yolk to nanotechnology. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;55(2):120—30.

14. [Антибактериальная терапия урогенитальной хламидийной инфекции у взрослых: позиция европейских экспертов. Гинекология 2012. 2—10 стр.]
15. Persson K., Hammas B., Janson H., Bjartling C., Dillner J., Dillner L. Decline of the new Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* after introduction of appropriate testing. *Sex Transm Infect* 2012;88(6):451—5.
16. Feodorova V.A., Sultanakhmedov E.S., Saltykov Yu.V., Polyaniina T.I., Utz S.R., Zaitsev S.S., Bogoutdinov N.Sh., Motin V.L. The first case of the Swedish new variant *Chlamydia trachomatis* in the Southeastern European region of Russia. *Proceeding Book, IUSTI Europe Scientific Meeting in St Julian. Malta*. 2014; 106.
17. [Савичева А.М., Соколовский Е.В., Домейка М.З. Улучшение качества лабораторной диагностики инфекций урогенитального тракта. *Практическая медицина* 2009;5(37)24.]
18. Feodorova V.A., Bannikova V.A., Alikberov Sh.A., Eliseev Iu.Iu., Grashkin V.A. Comparative efficiency of detection of the causative agent of urogenital chlamydia by immunofluorescence, polymerase chain reaction, and dot immunoassay. *Klin Lab Diagn* 2007; (7): 30-35. [Федорова В.А., Банникова В.А., Аликберов Ш.А., Елисеев Ю.Ю., Грашкин В.А. Сравнительная эффективность обнаружения возбудителя урогенитального хламидиоза методами иммунофлуоресценции, ПЦР и Дот-иммуноанализа. *Клин Лаб Диагн* 2007; (7): 30—35.]
19. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition, 2010.
20. Catsburg A. TaqMan Assay for Swedish *Chlamydia trachomatis* Variant / A. Catsburg, L. van Dommelen, V. Smelov, H. J. C. de Vries, A. Savitcheva, M. Domeika, B. Herrmann, S. Ouburg, C. J. P. A. Hoebe, A. Nilsson, P. H. M. Savelkoul, S. A. Morré // *Emerg. Infect. Dis.* 2007. Vol. 13(9). P. 1432—1434.
21. Quint K. D., van Doorn L. J., Kleter B., de Koning M. N., van den Munkhof H. A., Morre S. A., ter Harmsel B., Weiderpass E., Harbers G., Melchers W. J., Quint W. G. A highly sensitive, multiplex broad-spectrum PCR- DNA-enzyme immunoassay and reverse hybridization assay for rapid detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars. *J Mol Diagn* 2007; 9:631—638.
22. Lysén, Osterlund A., Rubin C. J., Persson T., Persson I., Herrmann B. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1641—7.
23. Feodorova V. A., Konnova, S. S., Saltykov, Y. V., Zaitsev, S. S., Polyaniina, T. I., Druzhkin, I. V., Fedotov, E. A., Gaydos, C. A., Quinn, T. C. and Motin, V. L. *Chlamydia trachomatis* isolate Saratov E6/61.35-B1 major outer membrane protein (*ompA*) gene, partial *cds* 1,156 bp linear DNA Accession: KU963177.1
24. Bjartling C., Osser S., Johnsson A., Persson K. Clinical manifestations and epidemiology of the new genetic variant of *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis.* 2009; 36(9):529—35.
25. Seth-Smith H.M., Harris S.R., Persson K., Marsh P., Barron A., Bignell A., Bjartling C., Clark L., Cutcliffe L.T., Lambden P.R., Lennard N., Lockey S.J., Quail M.A., Salim O., Skilton R. J., Wang Y., Holland M. J., Parkhill J., Thomson N. R., Clarke I. N. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics* 2009; 10:239.
26. Unemo M., Clarke I.N. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24: 62—9.

об авторах:

В.А. Федорова — д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной биологии хламидиозов ГНУ ВНИИВВиМ, главный научный сотрудник ФИЦ вирусологии и микробиологии, филиала в Саратове, профессор кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Э.С. Султанакмедов — врач-дерматовенеролог клиники кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России

Ю.В. Салтыков — научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии хламидиозов ГНУ ВНИИВВиМ, научный сотрудник ФИЦ вирусологии и микробиологии, филиала в Саратове, аспирант ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

С.Р. Утц — д.м.н., профессор, зав. кафедрой кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России

В.Л. Мотин — д.м.н., профессор, зав. лабораторией, медицинский факультет Университета Техаса (UTMB), Галвестон

Информация о грантах, контрактах и других формах финансовой поддержки

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-16-01099)

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье