

Рищук С.В. Аберрантные формы хламидий как общебиологическая стратегия выживания вида. Особенности диагностики и лечения / С.В. Рищук // TERRA MEDICA. – 2013. - №2. – С.9-21

**Рищук С.В.
Rishchuk S.V.**

Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.
North-Western State Medical University I.I.Mechnikov, St.-Petersburg, Russia.

**АБЕРРАНТНЫЕ ФОРМЫ ХЛАМИДИЙ КАК ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКАЯ
СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ ВИДА.
ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ.**

Сведения об авторах:

Рищук Сергей Владимирович - доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург, Россия.

Проведен анализ способности микроорганизмов к приспособлению, адаптации к меняющимся условиям существования. Дана характеристика аберрантных форм хламидий, а также факторов, способствующих их формированию. Освещены проблемные вопросы диагностики, лечения и излеченности при персистентной хламидийной инфекции.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, персистенция, диагностика, лечение, излеченность.

Способность микроорганизмов к приспособлению, адаптации к меняющимся условиям существования общеизвестна. Именно высокая пластичность микробной клетки в отношении различных стрессовых воздействий среды обитания позволила им выработать в процессе эволюции, с одной стороны, различные механизмы выживания в конкретном специфическом биотопе, а с другой – механизмы, имеющие выраженный общий универсальный характер [1].

Рассматривая покой как универсальную форму адаптации бактерий (равно как и других организмов) к меняющимся условиям среды, следует признать, что стратегия переживания микроорганизмами неблагоприятных воздействий не ограничивается образованием метаболически покоящихся (анабиотических) форм, к которым относят

специализированные покоящиеся формы – споры и цистоподобные покоящиеся клетки. В последние годы изучены способы переживания неспорообразующих бактерий за счет перехода в состояние «вегетативного» покоя, именуемое как «dormant state» (покоящееся, дремлющее состояние). Дормантные клетки не способны образовывать колонии на лабораторных агаризованных питательных средах, проявляя (хотя и низкую) анабиотическую активность. Переход активно метаболизирующих делящихся клеток бактерий (микроорганизмов) к состоянию пролиферативного покоя в стационарных клетках или метаболического покоя в репродуктивных покоящихся формах всегда обусловлен действием стрессорных факторов и является следствием стресса.

Возможны следующие варианты развития событий (рис. 1). Если условия среды меняются на благоприятствующие росту, то микроорганизмы претерпевают стресс новой среды, меняют генетическую программу и возвращаются к размножению. В том случае, когда стрессовая ситуация сохраняется, следуют два исхода: либо гибель клеток – их автолиз, либо включение генетической программы образования покоящихся репродуктивных форм. Покоящиеся клетки характеризуются особым физиологическим состоянием – покоем, которое обуславливает их способность переживать недостаток или полное отсутствие питательных веществ и энергии, а также оставаться устойчивыми к повреждающим факторам среды. Свойственный покоящимся формам тип метаболизма, при котором редуцирован обмен веществ клеток с внешней средой и повышена их устойчивость к факторам окружения, предложено называть гипобиозом [2].

Гипобиоз подразделяют на гипометаболизм и аметаболизм (криптобиоз, абиоз), которые определяют различные уровни покоя. Гипометаболизм (гибернация, диапауза, оцепенение – *quiescens*) характеризуется низкими, но измеряемыми метаболическими активностями. У микроорганизмов это состояние характеризует клетки культур стационарной фазы, а также уровень метаболизма жизнеспособных некультивируемых клеток или ультрамикробактерий.

Аметаболизм (синонимы: анабиоз, криптобиоз) – крайнее проявление гипометаболизма, рассматривается как способность организмов (клеток) обратимо приостанавливать процессы жизнедеятельности.



Рисунок 1. Метаболические превращения клеток микроорганизмов [1]

В полной мере сказанное относится и к проблеме персистенции бактериальных патогенов в т.ч. хламидий – адаптивной стратегии выживания вида в условиях инфекции.

В соответствии с канонами классической микробиологии, исход любого инфекционного процесса определяется тремя компонентами: патогеном (этиологический фактор), макроорганизмом и условиями внешней среды. Исход инфекционного процесса заканчивается либо выздоровлением организма, либо его гибелью, либо возможно третье состояние – хронизация инфекции в виде носительства или заболевания, в основе которой - длительное переживание возбудителя в организме хозяина или персистенция (от лат. *persistere* – оставаться, упорствовать). Это устойчивое сосуществование с хозяином возможно при наличии определенных биологических свойств микроорганизмов, с одной стороны, и дефектности защиты хозяина – с другой [1,3]. Анализ имеющихся фактических материалов по выживанию паразита в хозяине убеждает, что в процессе взаимодействия обоих участников инфекции у возбудителя эволюционно закрепилось четыре способа защиты (изоляции) пептидогликана от факторов иммунитета: 1) экранирование клеточной стенки бактерий; 2) продукция секретируемых факторов, инактивирующих защиту хозяина; 3) антигенная мимикрия; 4) образование форм с отсутствием (дефектом) клеточной стенки бактерий (L-формы, микоплазмы).

При изучении хламидийной инфекции наиболее актуальным является вариант с дефектом клеточной стенки, который (если говорить об aberrантных тельцах) напоминает покоящиеся формы спорообразующих бактерий и покоящиеся или некультивируемые формы неспорообразующих бактерий в состоянии гипобиоза, который сформировался под воздействием неблагоприятных факторов макроорганизма.

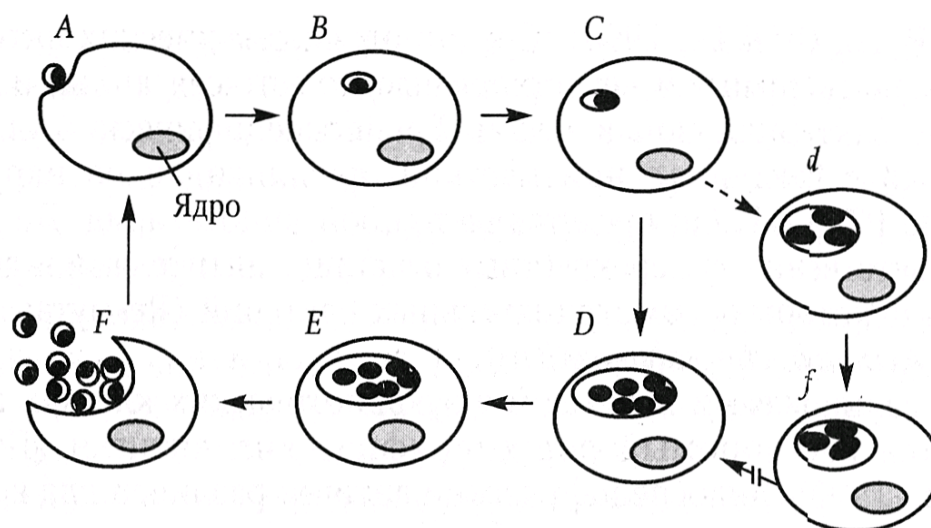
Развитие хронической хламидийной инфекции определяется в большей степени адаптационными свойствами патогена и образованием его персистирующих (или точнее – aberrантных) форм, обладающих весьма эффективными механизмами инактивации защитных факторов организма хозяина и использования регуляторных путей клетки хозяина для развития инфекционного процесса. Патогенетическое значение aberrантных форм хламидий определяется, с одной стороны, длительным выживанием патогена в макроорганизме с сохранением патогенного потенциала, а с другой - выраженными иммунопатологическими реакциями и антиапоптозным эффектом [4].

Жизненный цикл хламидий уникальный. Он включает в себя последовательную смену двух высокоспециализированных форм, адаптированных для внутри- и внеклеточного существования [5]. В упрощенной форме жизненный цикл возбудителя можно представить в следующем виде (рис. 2). Элементарные тельца (ЭТ) прикрепляются к чувствительным клеткам и поглощаются ими с формированием внутриклеточной вакуоли. ЭТ реорганизуются в метаболически активные неинфекционные внутриклеточные формы – ретикулярные тельца (РТ), проходя стадию промежуточных телец (ПТ) через 6-8 ч после инфицирования клетки-хозяина.

Делятся РТ бинарно внутри образующейся эндосомы, которая представляет собой микроколонию и выявляется при микроскопии как хламидийное включение [6]. Цикл развития считается завершенным после выхода из клетки инфекционных ЭТ в результате лизиса клетки-хозяина или экзоцитоза, что позволяет ЭТ вступать в новый жизненный цикл, распространяя инфекцию в неинфицированные клетки.

Полный цикл развития хламидий при изучении *in vitro* на культуре чувствительных клеток длится 48-72 ч в зависимости от штамма хламидий, природы клеток-хозяев и условий среды. Морфологические и метаболические свойства хламидий обусловлены их адаптацией к условиям вне- и внутриклеточного существования. Специфическим защитным механизмом хламидий является ингибирование слияния фагосом с лизосомами [7]. Во включении, содержащем живые *C. trachomatis* L₂, не происходит закисления содержимого фагосомы, и pH остается равным 6,0 в течение 12 ч после его формирования [8]. Хотя жизненный цикл хламидий достаточно хорошо охарактеризован мик-

роскопически, механизмы контроля и регуляции внутриклеточного развития остаются неизвестными.



Примечание: от А-В-С-D-E-F – типичный цикл;

С-d-f-D – формирование aberrантных телец

Рисунок 2. Жизненный цикл хламидий.

Уникальным свойством хламидий, во многом определяющим течение инфекции и влияющим на результаты проводимой антибактериальной терапии, является образование aberrантных (персистентных) форм. Необходимо отметить, что названия «персистентная форма» или «персистентные тельца» не совсем корректны т.к. феномен персистенции при хламидиозе определяется не только данной формой патогена, но и наличием элементарных и ретикулярных телец. Наличие морфологически измененных форм хламидий при персистирующей инфекции было показано J. W. Moulder et al. [9], а также работами О. Е. Орловой и др. [10]. J. W. Moulder et al. разработали модель персистирующей инфекции на клетках L, зараженных бВС *C. psittaci*.

Исследователи получили клеточный монослой, который при визуальном обследовании был практически свободен от хламидийных включений, но характеризовался замедленным ростом, устойчивостью к суперинфекции *C. psittaci* и состоял из клеток с измененным белковым составом клеточной стенки [11]. Авторы предположили, что изменение свойств культуры вызвано присутствием хламидий во всех или почти во всех L-клетках. Так как клетки проявляли измененные свойства без видимых симптомов

хламидийной инфекции, авторы предложили назвать такие хламидии «*cryptic body*» – скрытые тельца.

Персистентные культуры были чувствительны к рифампицину и хлортетрациклину, что указывало на наличие активной транскрипции ДНК и трансляции и-РНК. Однако устойчивость к пенициллину и миноциклину указывала на уменьшение чувствительности к некоторым антибиотикам. Через несколько недель после пересева клеток обычно наблюдалось резкое увеличение количества хламидийных включений и разрушение почти всех клеток монослоя, то есть переход от персистирующей культуры к продуктивной инфекции. Этот переход был частично обусловлен плотностью клеточной культуры, составом питательной среды, но, с другой стороны, зависел от целостности клеточной стенки ЭТ [12]. В данном эксперименте не были идентифицированы таинственные тельца, однако было ясно, что они являлись результатом изменения нормального жизненного цикла хламидий. В дальнейшем в экспериментах других исследователей персистирующая хламидийная инфекция была получена на большом количестве клеточных культур при различных воздействиях: при дефиците питательных веществ, при применении противомикробных препаратов, при индукции иммунологическими медиаторами [13,14].

Персистирующая инфекция может быть индуцирована при выращивании хламидий в дефицитной культуральной среде [15]. Добавление полноценной среды переводит инфекцию в активную продуктивную форму. Недостаточность в культуральной среде L-изолейцина, цистеина или валина также может вызвать обратимую персистенцию [16]. О. Е. Орлова и др. [10], используя дефицитную среду, получили на клетках McSoy модель спонтанно активирующейся персистирующей хламидийной инфекции, аналогичную модели J. W . Moulder.

В последние годы после определения полной нуклеотидной последовательности генома *C. trachomatis* и *C. pneumonia* найдено уже достаточное число молекулярных маркеров различных стадий жизненного цикла хламидий. Для стадии мультипликации – размножения РТ – характерны, например, экспрессия генов транскрипционных факторов сигма-28 и сигма-66, а также гена FtsK, который требуется для деления клеток. Недавно было показано, что транскрипция FtsK может служить также маркером персистенции, так как при переходе культуры в персистирующее состояние, когда РТ только увеличиваются в размерах, но не размножаются, его транскрипции не происходит. На стадии созревания – перехода РТ в ЭТ – экспрессируются гены позднего оперона CRP, которые обеспечивают жесткость оболочки ЭТ, транскрипционный фактор сигма-56,

ДНК-связывающие и гистоноподобные белки hstA и hstB, участвующие в конденсации хроматина [17].

При исследовании клинического штамма, устойчивого к высокой концентрации доксициклина, в нем обнаружено существенное снижение уровня транскрипта гена CRP, что свидетельствует о значительных сдвигах в цикле развития данного изолята, по сравнению с лабораторным штаммом. После проведения ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) в препарате обнаруживаются транскрипты 16S РНК и практически отсутствуют транскрипты гена CRP, что свидетельствует о нарушении процесса образования ЭТ.

При проведении исследований эффективности действия антибактериальных агентов *in vitro* на культуре клеток становится возможным характеризовать все стадии жизненного цикла хламидий. Маркером стадии преобразования ЭТ в РТ может служить транскрипция гена *eiо*, затем при делении РТ – генов *FtsK*, сигма-факторов 28 и 66, *YgeD*, при появлении зрелых инфекционных ЭТ – генов *60srp*, *15srp*, *crp*, *hstA*, *hstB*. Таким образом, комплексная оценка транскрипции маркеров всех стадий дает подтверждение перехода бактерии в персистирующее состояние.

Способность хламидий к персистенции является определяющим фактором хронизации инфекции и в связи с этим вызывает трудности в проведении антибиотикотерапии. Большое количество работ посвящено изучению влияния противомикробных препаратов (пенициллинов, хлорамфеникола и хлортетрациклина, эритромицина, сульфаниламидов) на хламидии. Их воздействие, имеющее различные точки приложения, вызывает сходные изменения морфологии и жизненного цикла хламидий. Это воздействие зависит от дозы антибиотика и от стадии, на которой происходит инкубация, что позволяет предположить наличие универсального ключевого механизма, опосредующего действие этих агентов [18,19,20,21,22].

При иммунологическом ответе на хламидийную инфекцию ключевую роль играют цитокины, которые не влияют непосредственно на хламидии, но, изменяя метаболизм клетки-хозяина, интерферируют с процессами нормального внутриклеточного развития хламидий. Наибольшее внимание исследователей привлекают интерферон-гамма (ИФ- γ), интерлейкин-1 (ИЛ-1), фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α). Хламидии были среди первых возбудителей невирусной природы, которые изучались в качестве индукторов интерферона (ИФ).

Было показано ингибирование до 80 % внутриклеточного роста хламидий экзогенным ИФ. Активный противохламидийный компонент супернатантной жидкости ак-

тивированных Т-лимфоцитов был идентифицирован как ИФ- γ [23]. Высокий уровень ИФ полностью ингибирует рост хламидий при условии, если ИФ был добавлен за 24 ч до заражения. Низкие дозы индуцируют развитие морфологически aberrантных форм включений при добавлении после заражения клеток [24,25]. Доказано, что действие ИФ- γ на эпителиальные клетки приводит к деградации триптофана на наружной мембране митохондрий в цитозоле. Истощение внутриклеточного пула триптофана также вызывает хламидийную стресс-реакцию.

После удаления из среды ИФ реактивируются жизнеспособные инфекционные ЭТ [13]. При индуцированной пенициллином персистирующей инфекции из инфицированных клеток также происходит выделение хламидийного белка теплового шока (hsp60) [26]. После очистки этот белок вызывает развитие гиперчувствительности замедленного типа у иммунных морских свинок. Если секреция hsp60 осуществляется также в ответ на ИФ, это может быть дальнейшим подтверждением того, что в ответ на хламидийную инфекцию развивается опосредованная иммунной системой персистенция хламидий и происходят иммунопатологические изменения органов хозяина [13].

Другие цитокины (ФНО- α и ИЛ-1) также могут индуцировать изменения жизненного цикла хламидий и способствовать возникновению персистенции [27]. Факторы, влияющие на активность клетки-хозяина, такие как цАМФ, цГМФ, кальций, также могут индуцировать развитие персистенции *in vitro* [28]. Основные медиаторы, способствующие формированию aberrантных форм хламидий, представлены в таблице 1.

Таким образом, основным механизмом, препятствующим редифференциации РТ в ЭТ, является особый цитокиновый спектр, ведущий к дефициту компонентов и/или блокаде синтеза белков наружной мембраны ЭТ хламидий под действием медиаторов персистенции. Это приводит к продолжению роста микроорганизма без соответствующего деления. Неполноценность наружной мембраны и клеточной стенки способствует увеличению интрацеллюлярного осмотического давления, ответственного за разбухание хламидийных структур. Характер иммунного ответа при хламидийной инфекции (наряду с другими факторами) может способствовать формированию персистенции возбудителя в организме хозяина.

Одним из механизмов выживания хламидий в клетке хозяина оказалась их способность регулировать апоптоз. Апоптоз – мощное и важнейшее средство естественной профилактики раковых и других злокачественных новообразований [29,30]. Актуальность изучения механизмов апоптоза определяется взаимосвязью нарушения регуляции процесса запрограммированной гибели клеток с большинством заболеваний. Прежде

всего это онкологические заболевания, аутоиммунные и нейротрофические нарушения, некоторые заболевания крови [30,31].

Таблица 1

Эндогенные факторы персистенции *C. trachomatis*

Медиатор	Эффект
Низкие концентрации γ -интерферона	Резкое снижение количества эндогенного триптофана (активация фермента индоламин-2,3-диоксигеназы, расщепляющего триптофан до N-формилкинурина).
ФНО- α	Опосредованный путем активации β -ИФ (блокирует репродукцию внутриклеточных микроорганизмов путем усиления экспрессии мембранных белков клеток)
Дефицит эндогенного триптофана	Необходим для построения основного белка наружной мембраны (МOMP – <i>main outer membrane protein</i>)
Дефицит цГМФ и высокое количество цАМФ	Отсутствие активации ферментов, необходимых для дифференциации РТ в ЭТ
Дефицит и/или действие антагонистов Ca^{2+}	Нарушение агрегации эндосомальных вакуолей.
L-изолейцин	Эффект, возможно, обусловлен включением продукта метаболизма α -метилбутирата-СоА в синтез жирных кислот <i>C. trachomatis</i> с последующим встраиванием «чужих» триглицеридов в клеточную мембрану, приводя к ее дестабилизации.
Дефицит цистеина	Незаменимая аминокислота, контролирующая дифференциацию РТ в ЭТ. Ее дефицит приводит к уменьшению числа дисульфидных мостиков - факторов прочности клеточной стенки.

Нарушение процесса апоптоза играет важную роль в развитии СПИДа, а также в патогенезе вирусных заболеваний, вызванных аденовирусами, вирусами гриппа, герпес-вирусами [32]. Применительно к инфекционной патологии, обусловленной бактериальными патогенами, апоптоз выполняет функцию защиты макроорганизма. Гибель инфицированных клеток с последующей элиминацией разрушенных клеток и микроорганизмов клетками иммунной системы позволяет предотвратить распространение инфекционного процесса.

Антиапоптозная активность хламидий, по-видимому, была закреплена в процессе эволюции как фактор патогенности. Исследования последнего времени дают основания предполагать, что хламидии используют различные механизмы управления клеточной гибелью, которые работают на нескольких этапах проведения апоптозного сигнала. В экспериментах *in vitro* на различных клеточных моделях было показано, что хламидии защищают эпителиальные клетки, моноциты/макрофага от апоптоза, индуцированного как внешними, так и внутренними сигналами. Показано, что блокирование апоптоза происходит как при продуктивной, так и при персистентной инфекции,

что и определяет её хронизацию. Исследованиями последних лет установлено, что *S.trachomatis* на внеклеточной стадии жизненного цикла вызывает активацию транскрипционного фактора NF-kB посредством взаимодействия элементарных телец с рецепторным комплексом TLR4/MD2/CD14 на мембране эукариотической клетки. *S.trachomatis* подавляет активность одного из ключевых регуляторов апоптоза - белка p53, на этапе активного внутриклеточного развития патогена. Это приводит к ингибированию патогеном p53-зависимого апоптоза. В свою очередь, активность белка p53 негативно влияла на развитие хламидийной инфекции в культуре клеток. Показано, что инфекция, вызванная *S.trachomatis*, на ранних этапах жизненного цикла активирует основной эндогенный путь выживания клетки, опосредованный активностью протеинкиназы-B [4].

Некоторыми авторами было установлено, что ингибирование хламидиями апоптоза происходит, по крайней мере, на двух этапах сигнального пути: до выхода цитохрома C из митохондрий и до активации каспазы 9 (рис. 3) [33,34].

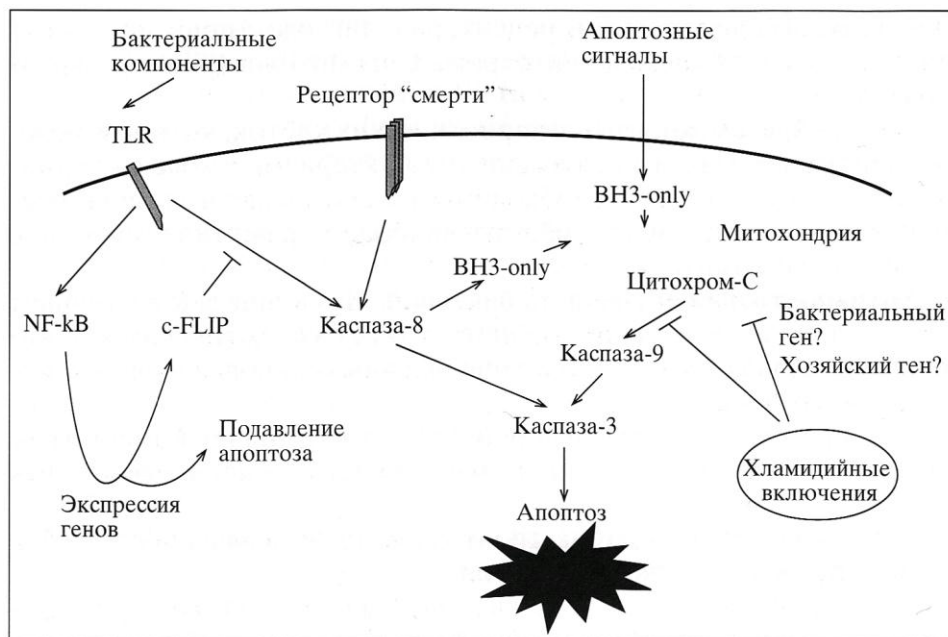


Рисунок 3. Бактериальная регуляция апоптоза [33,34].

Особые сложности возникают при диагностике персистирующей хламидийной инфекции. Из цитологических методов информативным является электронная микроскопия. Она позволяет визуализировать aberrantные (персистирующие) формы хламидий. Недостатком метода является дороговизна и недоступность для проведения обследования широкого круга пациентов. Материалом может служить не только эпителий

слизистых оболочек половых путей, доступных при физикальном обследовании, но и биопсийный материал из пораженных тканей (спайки, маточные трубы).

При проведении исследования необходимо ориентироваться на наличие: а) гигантских РТ с расширенным периплазматическим пространством; б) деления протопласта РТ и отшнуровки мелких шаровидных форм в периплазматическом пространстве; в) мелковакуолярных включений, лежащих на периферии клеток, медленно транспортирующихся в перинуклеарную зону; г) огромного количества мембранных пузырьков неправильной формы внутри РТ [5,35,36].

Бактериоскопия имеет низкую специфичность (не более 30 %), поэтому данный метод в настоящее время представляет больше историческую, чем практическую ценность [37].

Методы прямой и непрямой иммунофлуоресценции не применимы для диагностики персистирующей инфекции, так как основаны на обнаружении светящихся комплексов антигенов возбудителя - основного белка наружной мембраны (МОМР – *main outer membrane protein*) и липополисахарида (ЛПС), находящихся на поверхности ЭТ хламидий, расположенных внеклеточно. При персистенции блокирована продукция МОМР и ЛПС, патоген находится внутриклеточно, а ЭТ выявляются лишь в 8,2 % случаев [38].

Метод культуры клеток также малоэффективен, так как в одном пассаже в культуре клеток хламидий при персистирующей инфекции, как правило, не выделяются вследствие неинфекционности и непродуктивности аберрантных включений [5,39,40]. Только при многократном перевивании в связи со снятием влияния факторов персистенции может наступить реверсия микроорганизмов с образованием типичных ЭТ и РТ.

В последние годы большое внимание уделяется определению белка теплового шока хламидии *hsp60* – *heat shock protein* 60 к Да (*Chsp60*), а также специфических к нему антител. Однако доказана его 50% гомология с таким же белком человека - *hsp-60*, который является мембранным белком стрессового клеточного ответа и синтезируется в ответ на различные физические, химические и физиологические воздействия. У человека в норме он входит в состав митохондрий и отвечает за сборку, транспорт и регуляцию АТФ-азной активности. Экспрессировать *hsp-60* способны также все бактерии и другие клетки в процессе своего нормального функционирования. Поэтому определение самого *Chsp60* и антител к нему малоспецифично. Хотя вследствие почти 50% гомологии с таким же белком человека, он индуцирует образование специфических ан-

тител и состояние гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [41,14]. Антитела класса IgA к hsp60 хламидии доминируют у женщин с первичным бесплодием и у женщин с повторяющимися спонтанными абортами [42]. Доказана транскрипция генов hsp60 хламидиями, локализованными в синовиальной оболочке при реактивных артритах [43].

Самым перспективным методом детекции aberrантных (некультивируемых) форм бактерий (в т.ч. хламидий) в последнее время стал молекулярно-генетический на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР, real-time ПЦР) [44,45,46,47,48, 49,50, 51,52]. Он позволяет выявлять уникальную для искомого микроорганизма нуклеотидную последовательность, присутствующую в исследуемом образце в минимальном количестве и не поддающуюся обнаружению другими методами. При использовании ПЦР можно многократно (в 10^6 - 10^8 раз) размножить или амплифицировать эту последовательность. Методический подход на основе ПЦР дает возможность обойти основную трудность, связанную с тестированием находящихся в некультивируемом состоянии бактерий, так как их размножение как таковых можно заменить амплификацией видоспецифичного для данной бактерии фрагмента ДНК.

Однако часть исследователей считают не вполне правомочным использование метода классической ПЦР для выявления некультивируемых форм бактерий из-за возможности индикации не только жизнеспособных некультивируемых клеток, но и мертвых, содержащих генетический материал. Методом, исключающим этот недостаток, является сочетание ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Маркером присутствия и жизнеспособности бактерий в этом случае служит короткоживущая специфическая молекула и-РНК заведомо экспрессирующегося в некультивируемых формах известного исследователю гена. По наличию в полученном из образца препарате суммарной РНК и-РНК изучаемого гена можно судить о его активности, а следовательно, о жизнеспособности искомым бактерий [53].

В настоящее время стала возможной оценка инфекции без поиска видоспецифических фрагментов патогена. В таких случаях из образца выделяется суммарная ДНК и амплифицируются гены, кодирующие рибосомальные РНК (рРНК). Уже признано, что рРНК являются лучшими мишенями как для изучения филогенетических взаимоотношений, так и для идентификации микроорганизмов.

На современном этапе методы молекулярной генетики дают возможность осуществлять комплексную оценку транскрипции маркеров всех стадий и дают подтверждение перехода бактерии в персистирующее состояние: определение гена *eio* – мар-

кера стадии преобразования ЭТ в РТ; генов Ftsk, сигма-факторов 28 и 66, YgeD – маркеров деления клеток хламидий; генов 60srp, 15srp, srp, hstA, hstB – как генетических признаков зрелых инфекционных ЭТ. Однако эти методы ресурсоемкие и пока не применимы в лабораториях практического здравоохранения.

Таким образом, теоретически лабораторным подтверждением наличия персистирующей хламидийной инфекции с присутствием aberrантных форм патогена может быть сочетание обнаружение фрагментов ДНК и и-РНК хламидий в ПЦР, real-time ПЦР и ОТ-ПЦР со следующими лабораторными признаками: 1) высоким титром сывороточных антител к хламидийному белку Chsp60; 2) обнаружением самого Chsp60 в исследуемом материале; 3) уменьшением количества МOMP хламидий по данным прямой и непрямой иммунофлуоресценции; 4) выявлением мелковакуолярных цитоплазматических включений (МЦПВ) хламидий в культуре клеток; 5) результатами комплексной оценкой транскрипции маркеров всех стадий дает ответ о переходе бактерии в персистирующее состояние: а) отсутствие гена euo - маркера стадии преобразования ЭТ в РТ; б) отсутствие генов Ftsk, сигма-факторов 28 и 66, YgeD - контролирующих деление клеток хламидий; в) отсутствие генов 60srp, 15srp, srp, hstA, hstB – отвечающих за появление зрелых инфекционных ЭТ.

Однако на сегодня многие из этих методов применимы только в научных лабораториях или являются мало специфичными. Кроме того, имеются сложности получения патогена в исследуемом материале - при хронических осложненных формах, связанных с восходящей и экстрагенитальной локализацией патогена, возбудитель мало доступен для анализа [54]. Это также подтверждено нашими исследованиями и данными других авторов, что свидетельствует, вероятно, о частичной эрадикации возбудителя и ограничении его в очагах фиброза, формирование которых характерно для хламидийной инфекции [55,56,57,58]. Имеющиеся наблюдения говорят о том, что возбудитель, даже без проведения лечения, может при хронизации инфекции периодами не идентифицироваться в половых путях с помощью ПЦР. Однако указанный феномен не является свидетельством самоэрадикации возбудителя из организма хозяина [59, 60]. Так молекулярно- биологическими методами часто можно обнаружить ДНК хламидий в фаллопиевых трубах, при этом достаточно часто при анализе мазков из уретры и цервикального канала в ПЦР получать её отрицательные результаты.

В связи с этим можно представить следующие варианты нахождения хламидий в различных эпитопах в зависимости от хронизации инфекции (рис. 4 и 5)

Эпитопы	Шейка матки	Полость матки	Придатки матки	<i>Примечания</i>
Вариант 1				Чаще острый процесс*
Вариант 2				Чаще хронический процесс*
Вариант 3				Чаще хронический процесс*
Вариант 4				Хронический процесс
Вариант 5				Хронический процесс

* в клинической практике бывает редко

Рисунок 4. Различные варианты нахождения возбудителя в женской репродуктивной системе (заливкой обозначены экониши с патогеном).

Эпитопы	Уретра	Предстательная железа	Семенные пузырьки	Придатки яичек и яички	<i>Примечания</i>
Вариант 1					Чаще острый процесс*
Вариант 2					Чаще хронический процесс*
Вариант 3					Чаще хронический процесс
Вариант 4					Чаще хронический процесс*
Вариант 5					Чаще хронический процесс*
Вариант 6					Хронический процесс
Вариант 7					Хронический процесс
Вариант 8					Хронический процесс

* в клинической практике бывает редко

Рисунок 5. Различные варианты нахождения возбудителя в мужской репродуктивной системе (заливкой обозначены экониши с патогеном).

В случаях нахождения хламидий в первичных половых путях (в шейке матки и мужской уретре) можно реально использовать прямые тесты, основанные на идентификации патогена или его составных компонентов. В случае восходящей инфекции лабораторное подтверждение персистентной хламидийной инфекции практически невозможно.

Сложность лечения хламидийной инфекции связана с особенностями возбудителя и самого инфекционного процесса:

1) уникальный цикл развития возбудителя с возможностью формирования персистентных форм, не чувствительных к антибактериальным препаратам;

2) пребывание и размножение патогена в фагосомах предполагает использование антибиотиков, проникающих внутрь клеток и воздействующих на делящиеся его формы;

3) частое сочетание хламидий с микоплазмами и особенно с трихомонадами, что, как правило, предполагает формирование при этом «феномена резервации», т. е. пребывания хламидий внутри трихомонад и их недоступность (или малодоступность) для многих антибиотиков. В данном случае для успешного лечения хламидиоза ему должно предшествовать лечение трихомониаза;

4) изменения клеточного и гуморального иммунитета, которые выражаются:

– в дисбалансе иммунорегуляторного индекса (как в сторону повышения количества Т-хелперов, так и Т-супрессоров);

– в нарушении В-клеточного звена (снижение как относительного, так и абсолютного числа В-лимфоцитов, снижение иммунорегуляторного индекса);

– в уменьшении количества естественных киллеров;

– в гиперпродукции IgA₂ (основного иммунологического маркера персистирующей хламидийной инфекции) [61];

– в гиперпродукции IgG (показатель менее специфический, но более доступный в наших лабораторных условиях) [62];

– в незавершенности фагоцитоза и снижении активности фагоцитов;

– в повышении количества циркулирующих иммунных комплексов в крови.

Принципы лечения персистентной хламидийной инфекции должны быть следующие:

1) проведение лечения в специализированных медицинских учреждениях подготовленным врачебным персоналом;

2) обязательно лечение обоих половых партнеров при доказанной хламидийной инфекции у обоих или только у одного из них при наличии хотя бы одного полового контакта пары (в анамнезе) без применения презерватива [63];

3) лечение хламидийной инфекции проводится у обоих партнеров независимо от клинической формы инфекции;

4) соотношение удельного веса общего и местного лечения будет зависеть от выраженности клинических проявлений, которая, в свою очередь, зависит от наличия характерных для хламидиоза органных очагов (латентная, инаппарантная и манифестная формы инфекции). Особенно важными в этом отношении являются патологические процессы в органах репродуктивной системы, формирующие бесплодие [64];

5) продолжительность антибактериальной терапии должна зависеть от давности заражения и соответственно от хронизации процесса (острая, т. е. свежая; подострая или хроническая инфекция). При свежем заражении возможно проведение 10-дневного непрерывного курса антибактериальной терапии; при подострой и хронической инфекции - не менее 20 дней непрерывного курса антибактериальной терапии, так как имеется сложность установления и разграничения подострой и хронической инфекции;

6) лечение должно быть комплексным, с применением антибиотиков непрерывным курсом в максимально допустимых дозах;

7) предшествующая антибиотикотерапии иммунотерапия обязательна при доказанной или предполагаемой персистентной инфекции.

Персистенция хламидий требует особого подхода к больному. Применение одних антибиотиков при этой форме инфекции, как правило, недостаточно, поскольку все эффективные в отношении хламидий антибиотики обладают бактериостатическим действием и способны оказывать свое действие только на размножающиеся бактерии. Поскольку при персистенции жизненный цикл хламидий приостанавливается на неопределенное время, использование антибиотиков в этом периоде не способно привести к гибели микроорганизмов, остановившихся в своем развитии. Однако лечение инфекции крайне необходимо, так как сохранение персистирующего патогена предполагает его реверсию в РТ и ЭТ, что, в свою очередь, может сопровождаться различными патоиммунологическими реакциями, приводящими к формированию бесплодия.

При лечении таких состояний обычно рекомендуют сочетанную терапию антибиотиками и иммунокорректорами. Результаты исследования М. А. Гомберга с соавт. [35,36], полученные при лечении более 1000 больных персистирующим хламидиозом, показали, что примерно у 75 % из них встречаются различные нарушения иммунного статуса. Они выражаются в первую очередь в изменении числа CD4+ и CD8+ Т-клеток и нарушении их соотношения примерно у 50 % больных. По сравнению с контрольной группой, у больных наблюдается статистически достоверное снижение относительных и абсолютных показателей клеток CD16+, HLA DR+, CD72+ и CD21+. В связи с этим наиболее оптимальным в таких случаях является комбинированная терапия, основанная

на сочетании антибиотиков и иммунных препаратов. При антибиотикотерапии используют стандартные для осложненной инфекции курсы и дозировки перечисленных антибиотиков. Примеры предшествующей назначению антибиотиков иммунотерапии следующие [35,36]:

1) полиоксидоний по 6 мг внутримышечно 1 раз в сутки; первые 2 инъекции ежедневно, затем 3 инъекции через день; остальные – 2 раза в неделю. Всего на курс 10 инъекций. После 4-й инъекции начинают курс антибактериальной терапии;

2) иммуномакс по 200 МЕ (1 флакон) внутримышечно 1 раз в сутки; 3 инъекции ежедневно, затем перерыв 4 дня и еще 3 ежедневные инъекции. Всего на курс 6 инъекций. После 3-й инъекции начинают курс антибактериальной терапии;

3) виферон (интерферон- $\alpha 2b$) в виде ректальных суппозиторий двумя 5- дневными циклами с интервалом в 2 нед. между ними в суммарной дозе 10 млн МЕ на курс;

4) циклоферон (низкомолекулярный индуктор интерферона) – аналог растительного алкалоида *Citrus Grandis*, обладающий пролонгированным иммуномодулирующим, противовоспалительным и противовирусным действием. Рекомендуется применение антибиотика, начиная со второй инъекции циклоферона.

Доказан хороший эффект после применения препарата «Суперлимф» - активатора ретрансформации aberrantных форм хламидий в репродуктивные. «Суперлимф» назначали перед антибактериальной терапией в виде ректальных свечей по 1 свече перед сном, в течение 5-10 дней [65].

Целесообразно сочетание иммуномодулирующей и антибиотикотерапии с модуляторами процессов клеточной гибели и пролиферации. В этом качестве предлагается препарат «Ресвератрол», который вызывает активацию апоптоза в культуре инфицированных клеток, что приводит к подавлению хламидийной инфекции в условиях *in vitro*. Впервые показано, что ресвератрол подавляет накопление *S. muridarum* в легких экспериментально инфицированных животных и защищает от развития летальной пневмонии у мышей. [4].

Вопрос излеченности от персистентной хламидийной инфекции в мировой научной литературе трактуется скудно, упрощённо и неоднозначно. Всегда необходимо исходить из того, какие изначально были критерии постановки диагноза данной инфекции и о какой излеченности мы ведём разговор: этиологической (причинной) или клинической. Этиологическая излеченность макроорганизма равнозначна его санации от возбудителя, когда имеет место эрадикация патогена. Только в данном случае создаются предпосылки для полной **клинической излеченности** или **выздоровления**.

Структуру исходов при хламидийной инфекции можно представить в следующем виде:

I. Хронизация процесса – сохранение клинических признаков инфекции (фазы обострения сменяются фазами ремиссии) за счёт активации характерных для хламидийной инфекции воспалительных очагов.

II. Клиническое выздоровление (реконвалесценция):

1. Полное

2. Неполное (с остаточными явлениями): 1) с санацией от возбудителя; 2) без санации: а) возможны рецидивы в ближайшем будущем из-за активации старых и/или появления новых воспалительных очагов; б) при отсутствии очагов – формирование латентной формы инфекции.

При этом хотелось бы обратить внимание на такие категории, как клиническое выздоровление в целом, а также полное и неполное клиническое выздоровление.

Клиническое выздоровление (реконвалесценция – от лат. *re* – снова; *convalescentia* – выздоровление) - исчезновение клинических признаков заболевания и восстановление нарушенных функций органов и систем; как правило опережает патоморфологическое восстановление повреждённых органов за счёт значительных компенсаторно-приспособительных возможностей организма. При **полном** клиническом выздоровлении все нарушенные в результате заболевания функции организма восстанавливаются (чаще при наступлении санации организма от патогена).

При **неполном** клиническом выздоровлении сохраняются остаточные (резидуальные) явления в органах репродуктивной системы, в которых изначально был диагностирован воспалительный процесс. Под **остаточными (резидуальными)** явлениями понимают более или менее стабильные изменения тканей и органов, возникающие на месте развития инфекционных воспалительных процессов (склероз, рубцы, деформация).

Если говорить о клиническом выздоровлении при хламидийной инфекции, то разработан целый комплекс клинико-инструментальной и лабораторной оценки наличия или отсутствия воспалительных очагов в органах репродуктивной системы, который достаточно успешно применяется в настоящее время в клинической практике. Даже при отсутствии санации от возбудителя (что бывает, на мой взгляд, чаще всего), формируется вариант неполного выздоровления с восстановлением на достаточно продолжительный период времени функции органов репродуктивной системы с устранением всех репродуктивных проблем, вызванных хламидийной инфекцией. В этом слу-

чае предполагается формирование латентной формы инфекционного процесса за счёт элиминации репродуктивных форм патогена (ЭТ и РТ) при отсутствии элиминации аберрантных телец в результате проведенной адекватной комплексной терапии или дополнительного перевода РТ в аберрантные при неадекватной терапии (неадекватность дозы антибиотиков и длительности их курса).

Трактовка этиологической излеченности от персистентной хламидийной инфекции также сложна, как и при подтверждении диагноза, и зависит от качества лабораторных тестов и доступности патогена для исследования. Серологические тесты (антитела к Chsp60) малоспецифичны, а динамика специфических антител (IgG и IgA) к поверхностным белкам клеточной стенки не является свидетельством эрадикации патогена даже при негативации IgA в течение длительного периода наблюдения (9-12 месяцев) [66-70].

При подтверждении диагноза с помощью ПЦР (а это чаще всего бывает при остром процессе), его негативация через 4-8 нед. после окончания лечения не всегда свидетельствует об эрадикации возбудителя. Возможно превращение последнего в персистентную форму [71] или уменьшение его обсемененности в первичных половых путях и в связи с этим уменьшение вероятности попадания в исследуемый материал.

При отсутствии определения патогена в прямом тесте до проведения терапии из-за его недоступности по причине восходящей инфекции – какие-либо возможности лабораторного контроля этиологической излеченности отсутствуют.

Нами был предложен вариант доказательства реинфекции в паре с помощью ПЦР при её динамическом наблюдении в течение длительного периода времени (6-9 месяцев) при её половой жизни без барьерных методов контрацепции. Он основывается на высокой информативности молекулярно-генетических методов при свежем повторном инфицировании одного из половых партнёров после формирования репродуктивных и инфекционных форм хламидий из аберрантных у другого представителя пары [63,64,72,73].

Таким образом, проблема персистентной хламидийной инфекции в современной инфектологии и репродуктологии является актуальной и нерешённой как в диагностическом, так и в лечебном аспектах. Борьба за выживание в организме хозяина формирует у хламидий различные механизмы адаптации, которые опережают возможности их познания и использования в клинической практике.

Литература

1. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
2. Sussman A.S., Halvorson H.O. Spores. Their dormancy and germination. L.; N. Y., 1966. 203 p.
3. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Гильмутдинова Ф.Г., Гриценко В.А., Карташова О.Л., Кузьмин М.Д., Усвяцов Б.Я., Черкасов С.В. Экология микроорганизмов человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 490 с.
4. Борцов П.А. Антиапоптозные белки – мишени для поиска новых антихламидийных препаратов: Дисс. ... канд. мед. наук. Москва, 2010. 73 с.
5. Брагина Е.Е., Дмитриев Г.А., Кисина В.И. Структурно-функциональные особенности жизненного цикла хламидий in vitro. Вестн. дерматол. и венерол. 1995. Т.6. С.18-22.
6. Шаткин А.А., Бескина С.Р., Мартынова В.Р. Усовершенствование метода культивирования гальпровий (хламидий) в культуре клеток. ЖМЭИ. 1981. №1. С.24-28.
7. Friis R.R. Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development J. Bacteriol. 1972. V.110, №2. P.706-21.
8. Schramm N., Bagnell C.R., Wyrick P.B. Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. Infect. Immun. 1996. V.64, №4. P.1208-14.
9. Moulder J.W., Levy N.J., Zeichner S.L. et al. Attachment defect in mouse fibroblasts (L cells) persistently infected with *Chlamydia psittaci*. Infect. Immun. 1981. V.34, №1. P.285-91.
10. Орлова О.Е., Бескина С.Р., Житова Е.А. и др. Моделирование персистентной хламидийной инфекции в культуре клеток. Хламидии (гальпровии) и хламидиозы. Под ред. А.А. Шаткина. М., 1982. С.17-19.
11. Moulder J.W., Zeichner S.L., Levy N.J. Association between resistance to superinfection and patterns of surface protein labeling in mouse fibroblasts (L cells) persistently infected with *Chlamydia psittaci*. Infect. Immun. 1982. V.35, №3. P.834-9.
12. Moulder J.W. Inhibition of onset of overt multiplication of *Chlamydia psittaci* in persistently infected mouse fibroblasts (L cells). Infect. Immun. 1983. V.39, №2. P.898-907.
13. Beatty W.L., Belanger T.A., Desai A.A. et al. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. Infect. Immun. 1994. V. 62, №9. P.3705-11.
14. Beatty W.L., Morrison R.P., Byrne G.I. Immunoelectron-microscopic quantitation of differential levels of chlamydial proteins in a cell culture model of persistent *Chlamydia trachomatis* infection. Infect. Immun. 1994. V. 62, №9. P.4059-62.
15. Bader J.P., Morgan H.R. Latent viral infection of cells in tissue culture. VII. Role of water-soluble vitamins in psittacosis virus propagation in L cells. J. Exp. Med. 1961. V.113, №1. P.271-81.
16. Coles A.M., Reynolds D.J., Harper A. et al. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? FEMS Microbiol. Lett. 1993. V.106, №2. P.193-200.
17. Мирский В.Е., Рищук С.В. Заболевания репродуктивной системы у детей и подростков (андрологические аспекты): руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2012. С. 479.
18. Schachter J. A *Bordetella* isolated from a patient with clinical lympho-granuloma venereum. Am. J. Ophthalmol. 1967. V.63, №5. P.1049-53.
19. Tribby I.I., Friis R.R., Moulder J.W. Effect of chloramphenicol, rifampicin, and nalidixic acid on *Chlamydia psittaci* growing in L cells. J. Infect. Dis. 1973. V.127, №2.

P.155-63.

20. Clark R.B., Schatzki P.F., Dalton H.P. Ultrastructural analysis of the effects of erythromycin on the morphology and developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* HAR-13. Arch. Microbiol. 1982. V.133, № 4. P.278-82.

21. Clark R.B., Schatzki P.F., Dalton H.P. Ultrastructural effect of penicillin and cycloheximide on *Chlamydia trachomatis* strain HAR-13. Med. Microbiol. Immunol. (Berl). 1982. V.171, № 3. P.151-9.

22. Phillips D.M., Swenson C.E., Schachter J. Ultrastructure of *Chlamydia trachomatis* infection of the mouse oviduct. J. Ultrastruct. Res. 1984. V.88, №3. P.244-56.

23. Rothermel C.D., Byrne G.I., Havell E.A. Effect of interferon on the growth of *Chlamydia trachomatis* in mouse fibroblasts (L cells). Infect. Immun. 1983. V.39, №1. P.362-70.

24. Beatty W.L., Byrne G.I., Morrison R.P. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 1993. V. 90, № 9. P.3998-4002.

25. Shemer Y., Sarov I. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. Infect. Immun. 1985. V.48, №2. P. 592-6.

26. Morrison R.P. Belland R.J., Lyng K. et al. Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. J. Exp. Med. 1989. V.170, №4. P.1271-83.

27. Carlin J.M. Weller J.B. Potentiation of interferon-mediated inhibition of Chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. Infect. Immun. 1995. V.63, №5. P.1870-5.

28. Shainkin-Kestenbaum R., Winikoff Y., Kol R. et al. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by the calcium antagonist verapamil. J. Gen. Microbiol. 1989. V.135, Pt 6. P.1619-23.

29. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови. Лаб. медицина, 2001. № 4. С. 47–54.

30. Мазурик В.К. Успехи в изучении механизмов регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптоза при участии белка и гена p53 –первый шаг на пути к предсказываемой революции в лабораторной медицине XXI века. Лаб. медицина, 2001. №4. С. 33–43.

31. Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. Programmed cell death in animal development. Cell, 1997. V. 88. P. 347–354.

32. O'Connor L., Huang D.C., O'Reilly L.A., Strasser A. Apoptosis and cell division. Curr. Opin. Cell Biol., 2000. V. 12. P. 257–263.

33. Fan T., Lu H., Ni H. et al. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation // J. Exp. Med., 1998. V. 187. p. 487–496.

34. Kriill M., Klucken A.C., Wuppermann F.N. et al. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae* // J. Immunol., 1999. V. 162. P. 4834–4841.

35. Гомберг М.А., Соловьев А.М., Ерёмкина О.Ф. Иммунологические подходы к лечению больных хронической персистирующей хламидийной урогенитальной инфекцией. ЗППП. 1996. Т.4. С.32-37.

36. Гомберг М.А. Персистенция хламидийной инфекции. Клинико-морфологическая характеристика, иммунные механизмы развития, терапия: Дисс. ... доктора мед. наук. Москва, 2003. 249 с.

37. Глазкова Л.К., Акилов О.Е. Синдром Фитца–Хью–Куртиса: венерический перигепатит. ЗППП. 1998. №4. С.32-39.

38. Битти В. Л. Персистенция хламидий: от клеточных культур до патогенеза хламидийной инфекции. ЗППП. 1995. № 6. С. 3-18.
39. Koehler L. et al. Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb. Pathog.* 1997. V.22. P.133-142.
40. Брагина Е.Е., Орлова О.Е., Дмитриев Г.А. Некоторые особенности жизненного цикла хламидий. Атипичные формы существования. ЗППП. 1998. №1. С.3-9.
41. Patton D.L., Kuo C.C., Wang S.P. et al. Chlamydial infection of subcutaneous fimbrial transplants in cynomolgus and rhesus monkeys. *J. Infect. Dis.* 1987. V.155. P.229-35.
42. Askienazy-Elbar M. Immune consequences of *Chlamydia* infections in pregnancy and in vitro fertilization outcome. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 1996. № 4. P.143-148.
43. Gaston J. S. H. Immunological basis of chlamydia induced reactive arthritis. *Sex. Transm. Inf.* 2000. V.76. P.156-161.
44. Brauns LA., Hudson M.C., Oliver J.D. Use of polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991. V. 57. P. 2651–2655.
45. Bej A.K., Mahbubani M.H. Application of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. *PCR Methods Appl.*, 1992. V. 1. P. 151–159.
46. Четина Е.В., Гинцбург А. Л., Грижебовский Г.М. и др. Исследование эпидемической значимости некультивируемых форм холерных вибрионов методом полимеразной цепной реакции. *ЖМЭИ*, 1992. № 3. С. 21–25.
47. Четина Е.В., Грижебовский Г.М., Брюханов А.Ф. и др. О возможном механизме эндемичности современной холеры (роль некультивируемых форм *Vibrio cholerae* 01). Молекул, генетика, микробиол., вирусол., 1993. № 6. С. 18–22.
48. Josephson K.L., Gerba CP., Pepper I.L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 3513–3515.
49. Аксенов М.Ю., Гаровникова Ю.С., Левина Г.А. и др. Использование полимеразной цепной реакции для изучения перехода клеток *Salmonella typhimurium* в некультивируемое состояние. Молекул, генетика, 1994. № 2. С. 17–21.
50. Аксенов М.Ю., Мисуренко Е.Н., Шустрова ИМ. и др. Выявление и изучение динамики численности некультивируемых форм *Yersinia pseudotuberculosis* во внешней среде при использовании полимеразной цепной реакции. *ЖМЭИ*, 1995. № 2. С. 80–84.
51. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. of Molecular Endocrinology.* 2000. V. 25. P.169-193.
52. Storm M., Gustafsson I., Herrmann B. et al. Real-time PCR for pharmacodynamic studies of *Chlamydia trachomatis*. *J. Microbiol. Methods.* 2005. V.61, №3. P.361-7.
53. Аляпкина Ю.С., Романова Ю.М., Алексеева Н.В. и др. Разработка количественного варианта ПЦР и применение его для оценки экспрессии генов // *Генетика*, 2000. Т. 36, № 7. С. 994–999.
54. Пашко Ю.П. Гематогенный путь распространения *C.trachomatis* у пациентов с урогенитальным хламидиозом: Дисс. ... канд. мед. наук. Москва, 2010. 102 с.
55. Lucisano A. Morandotti G., Marana R. et al. Chlamydial genital infections and laparoscopic findings in infertile women. *Eur. J. Epidemiol.* 1992. V.8, №5. P.645-9.
56. Arena B., Casares M., Valentine B.H. et al. Evaluation of laparoscopy and endocervical swab in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection of the female genital tract. *Arch. Gynecol. Obstet.* 1993. V. 253, № 1. P. 5-7.
57. Dieterle S. Mesrogli M., Triebler B. et al. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Tubenverschlüssen bei chronischer Salpingitis und urogenitalen Chlamydieninfektionen? [Is there a correlation between tubal occlusions in chronic salpingitis and urogenital chlamydia

infections?]. Geburtshilfe Frauenheilkd. 1994. V.54, № 8. P.455-9.

58. Meijer C.J. *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy: retrospective analysis of salpingectomy specimens, endometrial biopsies, and cervical smears. J. Clin. Pathol. 1995. V.48, №9. P.815-9.

59. Chemesky M. et al. Serological studies on women with pelvic pain, with or without chlamydial plasmid DNA in endometrial biopsy tissue. Int. Congr. STD 12 th Meet IS-STD & 14 th Reg Meet IUSTI: Abstr. N.-Y.,1997. P.104.

60. Joyner J. L. Douglas J.M., Judson F.N. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. 13th Meeting of ISSTD : Abstract Guide. Denver,1999. P.36.

61. Ward M.E. An update on the immunology of chlamydial infection. Proc. 3rd Meet Eur. Soc. Chlam. Res. Vienna, Austria, 11-14 Sept 1996. P.58-62.

62. Ghaem-Maghamy S., Lewis D.J., Hay P.E. Characterization of immune responses to human genital chlamydial infections. Proc. 3lh Meet Eur. Soc. Chlam. Res. Vienna, Austria,1996. P.81.

63. Рищук С.В. Смирнова Т.С., Костючек Д.Ф. и др. Диагностика и установление излеченности половых пар по урогенитальному хламидиозу и микоплазмозу. Методические рекомендации для врачей по Северо-Западному Региону России. СПб., 2006. 25 с.

64. Рищук С. В., Костючек Д. Ф. Половые пары и половые инфекции. СПб.: Медицинская пресса. 2005. 272 с.

65. Кашеваров Д.Ф. Патогенетический подход к антибактериальной иммуномодулирующей терапии урогенитального хламидиоза: Дисс. ... канд. мед. наук. Москва, 2005. 88 с.

66. Maruta N. Study of *Chlamydia trachomatis* in chronic prostatitis. Hinyokika-Kiyo. 1992. V.38. P.297-304.

67. Piura B., Sarov B., Sarov I. Persistence of antichlamydial antibodies after treatment of acute salpingitis with doxycycline. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1993. V.48. P.117-121.

68. Workowski K.A., Lampe M.F., Wong K.G. et al. Long-term eradication of *Chlamydia trachomatis* genital infection after antimicrobial therapy. Evidence against persistent infection. JAMA. 1993. V.270. P.2071-2075.

69. Henry-Suchet J., Askienazy-Elbhar M., Thibon M. et al. Post-therapeutic evolution of serum chlamydial antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertil. Steril. 1994. V.62. P.296-304.

70. Есипов А.С., Костючек Д.Ф., Рищук С.В. Диагностическая значимость определения IgA к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке крови при хроническом урогенитальном хламидиозе. Вестник Санкт-Петербургской Медицинской академии им. И.И. Мечникова. 2004. №2 (5) С.126-130.

71. Raum E., Zeidler H. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T-cells: a potential mechanism for persistent infection. Infect. Immun. 2000. V.68. P.6704-6711.

72. Рищук С.В., Костючек Д.Ф. Способ диагностики манифестной и латентной форм хронического урогенитального хламидиоза у мужчин. Патент на изобретение № 2222018 RU МКИ G01 N33/3. 2004.

73. Рищук С.В. Клинико-лабораторные аспекты хронических воспалительных заболеваний и дисбиозов у половых партнёров: Дисс. ... доктора мед. наук. Санкт-Петербург, 2006. 400 с.