

*На правах рукописи*

**БОНДАРЕВА НАТАЛИЯ ЕВГЕНЬЕВНА**

**МЕХАНИЗМЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ ХЛАМИДИЙ И  
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКИХ  
ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

03.02.03 – микробиология

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Москва-2020**

**Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России)**

**Научные руководители:**

**Зигангирова Наиля Ахатовна** - доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом медицинской микробиологии ФГБУ "НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи" Минздрава России

**Воронина Ольга Львовна** - кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией анализа геномов ФГБУ "НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи" Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Федорова Валентина Анатольевна** - доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», филиал в Саратове

**Дерябин Дмитрий Геннадьевич** - доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом лабораторной диагностики ИПП и дерматозов ФГБУ "Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии" Минздрава России

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Защита диссертации состоится «09» октября 2020 г. в 11-00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.130.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета  
доктор медицинских наук, профессор

Русакова Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Хламидии - таксономически и биологически обособленная группа бактерий, адаптированная к строгому внутриклеточному паразитированию, клиническое значение которых определяется распространением среди широкого круга хозяев и разнообразием клинических проявлений. На примере характеристики представителей порядка Chlamydiales можно проследить, как новые методические подходы способствуют уточнению и совершенствованию классификации, которая вначале основывалась только на описании фенотипических признаков, а затем, по мере открытия новых видов и получения знаний о геноме, изменялась и продолжает корректироваться в настоящее время. Данные полногеномного секвенирования позволяют изучать генетическую основу тропизма, персистенции и адаптационных свойств хламидий в отношении хозяев.

Семейство Chlamydiaceae включает в себя группу грамотрицательных облигатных внутриклеточных паразитов, инфицирующих слизистые оболочки различной локализации и вызывающих заболевания человека и животных. Основными патогенными для человека видами семейства Chlamydiaceae являются *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и *C. psittaci*, которые вызывают тяжелые поражения респираторного и урогенитального тракта с серьезными отсроченными последствиями. Несвоевременная диагностика и лечение приводят к возникновению хронических форм, к которым для *C. trachomatis* относят воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ). Для *C. pneumoniae* показана ее триггерная роль в развитии астмы, первичного билиарного цирроза, атеросклероза, реактивного артрита и злокачественных новообразований [Cheong H. S. et al., 2019]. Инфекции, вызванные *C. psittaci*, могут приводить к возникновению эндокардитов, миокардитов, артритов, кератоконъюнктивитов и энцефалитов [Balsamo G. et al., 2017].

Механизмы адаптации и длительного сохранения хламидий в организме пока еще не до конца изучены, однако известно, что за развитие хронической инфекции могут отвечать персистирующие формы этого патогенного микроорганизма. Так показано, что в условиях стресса, триптофанового голодания и антибиотикотерапии нормальный жизненный цикл развития хламидий прерывается, и образуются персистирующие формы, способные длительно сохраняться в клетке. Становится понятным, что персистирующие формы – это альтернативное физиологическое состояние, которое возникает в генетически однородной популяции клеток, но характеризуется другим фенотипом. Таким образом, бактериальная персистенция является стратегией адаптации хламидий к внешним воздействиям с образованием генетически идентичной популяции персистирующих форм, но отличающихся низким уровнем метаболизма, задержкой формирования инфекционных форм и толерантностью к антибиотикам [Caldwell H. D. et al., 2003].

Сложность обнаружения персистирующих форм хламидий определяется множественным тропизмом патогенной бактерии к различным тканям. Для *S. pneumoniae* тропизм к клеткам гладкой мускулатуры, макрофагам и гепатоцитам показан Gaydos et al. Для *S. psittaci* Wang et al. продемонстрировали тропизм к клеткам гладкой мускулатуры и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Mahony et al. и Balsamo et al. доказали развитие хронической инфекции различной локализации *S. pneumoniae* и *S. psittaci*, соответственно, на основе изучения гематогенного пути их распространения. Для *S. trachomatis* генерализация инфекционного процесса в результате распространения возбудителя гематогенным путем впервые была показана в лаборатории хламидиозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» МЗ России [Пашко Ю. П., 2008]. Именно гематогенный путь распространения объясняет развитие экстрагенитальной патологии с хронизацией инфекции и серьезными осложнениями. В последнее время появились данные о том, что *S. trachomatis*, распространяясь гематогенным путем, может колонизировать органы ЖКТ как у животных, так и у человека [Rank R. G. et al., 2014], что позволяет рассматривать ЖКТ, как возможную благоприятную нишу для длительного сохранения хламидий. Однако в настоящее время отсутствуют сведения о возможной роли длительной колонизации хламидиями органов ЖКТ в развитии патологических изменений в этих органах и о патогенности хламидий в условиях персистенции в тканях ЖКТ. Кроме того, у человека практически не изучены особенности хронической инфекции, вызванной *S. trachomatis* и связанной с длительной персистенцией патогена после перенесенной инфекции с экстрагенитальной локализацией возбудителя. Пока еще мало данных о том, насколько колонизация ЖКТ хламидиями распространена среди людей, является ли длительная колонизация носителем или инфекционным процессом, и к каким последствиям может приводить присутствие этого патогенного микроорганизма в составе микробиоты кишечника человека.

Все вышесказанное определяет значимость проблемы контроля за хроническими хламидийными инфекциями, для которых антибактериальная терапия должна быть адекватной и основанной на точных современных методах диагностики. На современном этапе диагностика острой хламидийной инфекции не вызывает трудностей ввиду наличия возбудителя во входных воротах инфекции, тогда как выявление персистирующих форм хламидий при хронических состояниях до сих пор является большой проблемой. Отсутствие эффективных диагностических тестов, а также недостаточное понимание локализации персистирующих форм, значительно затрудняет не только диагностику, но и проведение исследований, изучающих распространенность хронической хламидийной инфекции, ее связь с другими заболеваниями и оценку эффективности терапии [Puolakkainen M., 2013].

В настоящее время наряду с совершенствованием диагностики хламидийных инфекций все большую актуальность приобретает

характеристика и типирование изолятов *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и *C. psittaci*, направленная на изучение особенностей циркулирующих в популяции вариантов, выявление молекулярных основ тропизма этого патогенного микроорганизма в отношении занимаемых ниш и адаптации к различным хозяевам, а также на изучение эпидемиологических закономерностей распространения различных хламидийных инфекций. Становится очевидным, что механизмы возникновения и поддержания длительных хронических хламидийных инфекций, а также молекулярные основы тропизма этого микроорганизма, является актуальной проблемой, требующей дальнейшего углубленного изучения.

**Целью диссертационной работы** являлось изучение механизмов персистенции патогенных для человека хламидий и совершенствование диагностики при формировании хронических хламидийных инфекций.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Усовершенствовать алгоритм диагностики хронической хламидийной инфекции, вызванной *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и *C. psittaci*, включающий молекулярно-генетические методы и методы выявления серологических маркеров.

2. Выявить генетические особенности формирования эпидемически значимого генотипа возбудителя хламидиоза человека и животных.

3. Изучить роль системного распространения хламидий и колонизации органов ЖКТ в развитии хронических хламидийных инфекций при моделировании на экспериментальных животных.

4. Изучить распространенность хламидийной инфекции у людей с заболеваниями органов ЖКТ.

**Научная новизна работы**

1. На модели заражения мышей показано, что возбудитель урогенитальной инфекции у мышей, *C. muridarum*, обладая тропизмом к эпителию органов желудочно-кишечного тракта, способен формировать длительную колонизацию в этих органах и приводить к возникновению нарушений в репродуктивной сфере и подавлять фертильность. Впервые показано, что колонизация кишечника хламидиями не является бессимптомной, а приводит к возникновению патологических изменений в различных отделах кишечника.

2. Разработан принципиально новый метод серологической диагностики хламидийной инфекции, вызванной *C. trachomatis*, предполагающий выявление антител к белкам семейства Inc, которые секретируются и встраиваются в мембрану фагосомы на внутриклеточном этапе жизненного цикла хламидий, в отличие от существующих систем, в которых в качестве мишеней используют основной белок наружной мембраны или ЛПС.

3. Усовершенствован алгоритм диагностики острых и хронических хламидийных инфекций, включающий методы прямого выявления возбудителя, вспомогательные серологические методы, а также методы

молекулярно-генетической характеристики хламидий. Применение разработанного алгоритма позволяет не только идентифицировать наличие возбудителя хламидийной инфекции, а также проводить глубокий анализ циркулирующих в популяции изолятов.

4. На основании полногеномного секвенирования установлена принадлежность изолятов *C. psittaci*, выделенных из синовиальной жидкости больных артритом, к эпидемически значимому 24 генотипу, адаптированному к широкому кругу хозяев, который характеризуется наиболее стабильным геномом по сравнению с другими генотипами этого возбудителя.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В результате выполнения исследования был усовершенствован алгоритм комплексной диагностики и молекулярно-генетической характеристики возбудителей хламидийной инфекции человека с использованием молекулярно-генетических методов и методов выявления серологических маркеров. Выявлены генетические особенности формирования эпидемически значимого генотипа возбудителя хламидиоза человека и животных. Изучены некоторые механизмы персистенции патогенных хламидий при формировании хронических форм заболеваний. Показана роль системного распространения хламидий и колонизации органов ЖКТ в развитии хронических хламидийных инфекций при моделировании на экспериментальных животных.

В рамках ГЗ «Разработка тест-системы для диагностики генерализованных форм острых и хронических хламидиозов» разработаны два набора реагентов для идентификации ДНК *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* методом ПЦР в реальном времени на основе комбинированных мишеней.

Разработан оригинальный подход выявления хламидий методом микроиммунофлюоресценции (МИФ) на основе определения антител к белкам Inc *C. trachomatis*, секретируемым на внутриклеточном этапе жизненного цикла хламидий. Метод показал более высокую эффективность на панели положительных и отрицательных сывороток крови по сравнению с классическим методом МИФ, основанном на выявлении антител к белкам наружной мембраны.

**Внедрение полученных результатов в практику.** Разработаны два набора реагентов для диагностики генерализованной хламидийной инфекции на основе выявления и идентификации ДНК методом ПЦР – РВ: ГХИ – Скрин - *C. trachomatis* - РВ и ГХИ – Скрин - *C. pneumoniae* - РВ. К наборам реагентов подготовлены проекты Технических Условий и Инструкции по применению, утвержденные на заседании Совета по внедрению научных достижений в практику ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 2 от 29 декабря 2014 года).

Разработанный алгоритм комплексной диагностики и молекулярно-генетической характеристики возбудителей хламидийной инфекции внедрен

и используется в лаборатории хламидиозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России.

#### **Методология и методы исследования**

Методология исследования включала разработку алгоритма лабораторной диагностики острых и хронических хламидийных инфекций, включающего методы выявления ДНК *S. trachomatis*, *S. pneumoniae* и *S. psittaci* и серологических маркеров с высокой чувствительностью и специфичностью. Методологической основой послужили современные молекулярно-генетические, биоинформационные, гистологические, серологические и иммунологические методы исследования, а также методы работы с культурами клеток и экспериментальными животными.

**Степень достоверности результатов.** Для решения поставленных задач в работе были использованы современные инструментальные методы. Достоверность результатов подтверждена достаточным количеством объектов исследования, достаточным количеством наблюдений, а также современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Обсуждение результатов проведено с учетом современных требований и методических подходов медицинской и биологической науки. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистики. Статистические методы, примененные в работе, адекватны поставленным задачам.

Всё вышесказанное позволяет считать полученные результаты достоверными, сделанные выводы обоснованными и вытекающими из результатов проведенных исследований.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Усовершенствован алгоритм диагностики и молекулярно-генетической характеристики, позволяющий с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять возбудителей хламидиоза и серологические маркеры при остром и хроническом инфекционном процессе.

2. Впервые установлено, что изоляты, выделенные из синовиальной жидкости больных с артритом, относятся к эпидемически значимому, полигостальному 24 генотипу *S. psittaci*.

3. При моделировании хламидийной инфекции у мышей продемонстрировано, что длительная колонизация кишечника *S. muridarum* приводит к развитию хронической хламидийной инфекции и возникновению патологических изменений в слизистой кишечника, а также к нарушению репродуктивной функции.

4. Разработанные высокочувствительные тест-системы на основе ПЦР в реальном времени позволяют в высоком проценте случаев выявить ДНК *S. trachomatis* у пациентов с подтвержденной хронической

хламидийной инфекцией, как в сыворотке крови, так и биоптатах органов ЖКТ.

**Апробация работы.** Апробация диссертации состоялась «10» марта 2020 г. на научной конференции отделов медицинской микробиологии и генетики и молекулярной биологии бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 22 от 10.03.2020).

Результаты диссертационной работы были представлены на XVI Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2016), Национальной ветеринарной конференции (Москва, 2016), II Всероссийской конференции с международным участием "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2017), V Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию и редактированию (Москва, 2017), IV Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2018), VI Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию и редактированию (Москва, 2018), XVIII Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2018), 11 Международной конференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology» (Новосибирск, 2018), XI Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2019), V Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019) и II национальном конгрессе с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2020).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – микробиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, пунктам 1, 2 и 3 паспорта 03.02.03 – микробиология.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, 2 из которых – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России при публикации основных научных результатов диссертации.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 172 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список используемой литературы (164 источника, из которых отечественных публикаций - 18, иностранных публикаций - 146). Работа содержит 16 таблиц и 31 рисунок.

**Личный вклад автора.** Автор непосредственно участвовал в разработке оригинальных методов и адаптации известных, которые были включены в алгоритм диагностики острых и хронических хламидийных инфекций. Проводил сбор образцов биологического материала от людей и животных, и его анализ с помощью разработанного комплексного подхода. Разрабатывал модели хламидийной инфекции на лабораторных животных,



проводил сбор, анализ и интерпретацию полученных результатов. Совместно с сотрудниками лаборатории анализа геномов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России Кунда М.С., Шараповой Н.Е., Рыжовой Н.Н. и Аксеновой Е.И. были проведены молекулярно-генетические исследования изолятов, выделенных из синовиальной жидкости людей с артритами. Сбор сывороток крови и мокроты от пациентов с острой патологией респираторной системы проводили на базе Инфекционной клинической больницы № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы совместно с д.м.н., профессором Колобухиной Л.В. (зав. лаб. респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России). Сбор сывороток крови и биоптатов органов ЖКТ от пациентов с заболеваниями ЖКТ проводили совместно с сотрудниками ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ и МУЗ "Городская клиническая больница № 6 им. академика В.Н. Кошелева" Шапкиным Ю.Г., Чалык Ю. В. и Чалык Р. Ю.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материалы и методы исследования

**Исследуемые клинические и биологические образцы.** Сыворотка крови 15 пациентов репродуктивного возраста с установленным диагнозом урогенитальный хламидиоз; сыворотка крови и образцы мокроты 150 мужчин с острой патологией респираторной системы в возрасте от 18 до 78 лет; сыворотка крови и биоптаты органов ЖКТ 54 пациентов с заболеваниями органов ЖКТ и 43 пациентов группы сравнения; образцы помета 44 синантропных голубей города Москвы; 12 попугаев при вспышке орнитоза в частном питомнике в Московской области и 6 рептилий из Московского зоопарка.

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали лабораторные штаммы *C. trachomatis* 434 серовар L2 (ATCC VR-902), UW-3 серовар D (ATCC VR-885), VR-347 серовар Ba (ATCC VR-347); *C. pneumoniae* TW-183 (ATCC VR-2282); *C. muridarum* Nigg (ATCC VR-123) и ДНК штаммов *C. psittaci* PL-62 (Storz, 1969), 25SM (Schachter, 1968), а также AP-23 и CP-1 - из коллекции лаборатории хламидиозов.

**Клеточные линии.** В работе использовали линию клеток McCoу В (гибридная клеточная линия из человеческих синовиальных клеток и мышинных фибробластов).

**Лабораторные животные.** Эксперименты проводили на двух линиях мышей: инбредной линии DBA/2: самки в возрасте 6 – 8 недель, весом 14 - 16 г, и аутбредной линии ICR (CD-1): самки и самцы в возрасте 6 - 8 недель, весом 16 - 18 г.

**Выделение ДНК.** Выделение ДНК производили из 1 мл исходного образца с использованием наборов «ГХИ – Скрин - *C. trachomatis* - РВ» и «ГХИ – Скрин - *C. pneumoniae* - РВ» или с помощью автоматизированной

системы NucliSENS easyMAG (BioMérieux Inc., The Netherlands) по протоколу.

**ПЦР-РВ и генотипирование.** Для выявления вида хламидий методом ПЦР-РВ были выбраны новые мишени: в тест-системе для обнаружения ДНК *C. trachomatis* использовали последовательности 23S рРНК и криптической плазмиды, для *C. pneumoniae* - 16S рРНК, для *C. psittaci* - ген *incA*.

В работе были адаптированы методы генотипирования *C. trachomatis* по гену *ompA* [Banda C. I. et al., 2001], а также схемы мультилокусного секвенирования (MultiLocus Sequence Typing, MLST) Chlamydiales [[https://pubmlst.org/chlamydiales/info/MLST\\_primers\\_2012.pdf](https://pubmlst.org/chlamydiales/info/MLST_primers_2012.pdf)].

**Получение антигена к белкам Inc *C. trachomatis*.** Для получения антигена к белкам Inc, использовали монослой клеток McCoy B, инфицированных *C. trachomatis* серовара D в формате 96-луночных планшетов. После 40 ч инкубации монослой инфицированных клеток дважды промывали ФСБР, планшеты высушивали на воздухе, фиксировали 20 мин охлаждённым метиловым спиртом при 4°C, отбирали спирт и высушивали на воздухе.

**Определение антител к белкам Inc *C. trachomatis* в образцах сыворотки.** К полученному антигену белков Inc добавляли исследуемые сыворотки крови. Детекцию антител к *C. trachomatis* проводили непрямым методом с помощью вторичных антител к иммуноглобулинам человека (IgG, IgM и IgA), конъюгированных с ФИТЦ (флуоресцина изотиоцианатом). Результаты оценивали с помощью люминесцентной микроскопии при увеличении ×20 (Nikon Eclipse 50i). В случае специфического связывания антител с антигеном наблюдали ярко-зеленое свечение хламидийных включений.

**Определение антител к *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* в сыворотке крови методом МИФ к корпускулярному антигену.** Титры антител классов IgG, IgM и IgA к *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* определяли с помощью метода МИФ с иммобилизованными антигенами *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* по стандартному протоколу [Persson K. et al., 2000]. Детекцию связавшихся антител с антигенами проводили с помощью вторичных антител к иммуноглобулинам человека (IgG, IgM и IgA), конъюгированных с ФИТЦ. Результаты оценивали с помощью люминесцентной микроскопии при увеличении ×1500 (Nikon Eclipse 50i).

**Культивирование хламидий в культуре клеток.** Для получения культуры *C. muridarum* Nigg и *C. trachomatis* D/UW-3 использовали суточный монослой клеток McCoy B, выращенный в культуральных флаконах. Заражение клеток проводили в транспортной среде (среда DMEM с 5% фетальной сывороткой). Для стимуляции взаимодействия инфекции с клетками флаконы центрифугировали и инкубировали 48 ч при 37°C. Инфицированные клетки снимали с помощью стеклянных бус в 5 мл SPG (сахарозно-фосфатно-глутаминового буфера) и хранили при -70°C.

**Определение антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *C. trachomatis* в сыворотках крови методом ИФА.** Выявление антител класса IgG к Hsp60 (белок теплового шока) *C. trachomatis* проводили с использованием набора Вектор-Бест (Россия).

**Внутривенное и интрагастральное заражение лабораторных животных *C. muridarum*.** Культуру штамма *C. muridarum* Nigg титровали на клетках McCoу В для определения числа включения образующих единиц (ВОЕ). Эксперименты проводили на двух линиях мышей: инбредной линии DBA/2 (самки в возрасте 6-8 недель, весом 14-16 г) и аутбредной линии ICR (CD-1) (самки и самцы в возрасте 6-8 недель, весом 16-18 г). Мышей заражали *C. muridarum* посредством интрагастрального введения (доза  $10^6$  ВОЕ/мышь), а также инокуляции в хвостовую вену ( $5 \times 10^5$  ВОЕ/мышь).

**Культуральное выявление *C. muridarum*** проводили на линии клеток McCoу В по стандартной методике [Campbell L.A. et al., 2009]. Идентификацию и количественную оценку содержания хламидий в инфицированных культурах осуществляли методом иммунофлуоресцентной микроскопии после инкубации с моноклональными антителами, специфичными к ЛПС (липополисахариду) и мечеными ФИТЦ.

**Анализ иммунного ответа у мышей после заражения *C. muridarum*.** Для оценки иммунологического состояния мышей на 30 день после внутривенного заражения *C. muridarum* использовали метод ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot). В селезенке и лимфатических узлах мышей определяли количество клеток, продуцирующих ИФγ (интерферон-γ), ИЛ-4 (интерлейкин), ИЛ-6, ИЛ-10- и ФНО-α (фактор некроза опухоли). Использовали стандартный протокол [Ji N. et al., 2016].

**Гистологические исследования.** Для светооптического исследования образцы кишечника фиксировали в нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин и готовили серийные гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали в световом микроскопе Axiostar plus (Zeiss) [Наровлянский А. Н. с соавт., 2015].

**Полногеномное секвенирование.** Приготовление библиотек проводили по протоколу Nextera XT (Illumina). Секвенирование выполняли на приборе MiSeq (Illumina). Для сборки полученных прочтений (ридов) использовали пакета программ CLC Genomics Workbench v. 8.5.1, 9.5.2.

**Построение филогенетических деревьев.** Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 6.0 с использованием алгоритма MUSCLE (Bootstrap method). Генетические расстояния между видами микроорганизмов оценивались с использованием 3-параметрической модели Tamura [Kimura M. A., 1980], которая была выбрана в качестве оптимальной дистанционной модели эволюции, полученной из Modeltest на основе информационного критерия Акаике [Posada D. et al., 1998].

Поиск максимально правдоподобных деревьев (ML) выполняли с использованием оптимальной модели GTR+G+I с пропорцией инвариабельных сайтов ( $I=0,52$ ) и параметром гамма ( $G=0,55$ ).

Для оценки устойчивости топологии ML-деревьев провели бутстрэп - анализ в 1000 репликах. Узлы ветвления, имеющие бутстрэп - оценки  $\geq 70\%$ , определялись, как достоверные. В качестве внешней группы выбрали последовательность гена 16S *Simkania negevensis*.

**Биоинформационный анализ.** Аннотацию геномов осуществляли с использованием сервера RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). Дополнительную аннотацию и поиск консервативных доменов проводили с помощью программной базы BLAST NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Локализацию белков и поиск сигнальных пептидов выполняли с помощью TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) и PSORTb (<http://www.psort.org/>). Для выявления последовательностей профагов использовали PHASTER (PHAge Search Tool Enhanced Release, <https://phaster.ca>). Аннотацию геномов стандартизовали согласно требованиям UniProt (Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org>).

Для анализа пангенома использовали BPGA (Bacterial Pan Genome Analysis Pipeline) [Chaudhari N.M. et al., 2016]. Для выравнивания 21 генома *S. psittaci* - алгоритм прогрессивного выравнивания MAUVE, для кластеризации - USEARCH (cut-off для выровненных аминокислотных последовательностей составил 90%).

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS 22.0 (США). Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных величин в виде процентных долей, для количественных – в виде медиан (Me) и квартилей ( $Q_{25}$ ,  $Q_{75}$ ). Для оценки статистической значимости различий между группами по количественным признакам, проводили сравнения по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Статистическую значимость различий качественных признаков в сравниваемых группах оценивали при помощи точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Разработка методов выявления и молекулярной характеристики патогенных для человека видов хламидий

Для совершенствования диагностики хламидийной инфекции, вызванной *S. trachomatis*, *S. pneumoniae* и *S. psittaci*, был разработан комплексный подход, включающий методы прямого выявления возбудителя и его серологических маркеров, а также методы генотипирования. Для специфической видовой идентификации возбудителей хламидиоза на основе ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени), были выбраны новые мишени,

позволяющие строго специфично и с высокой чувствительностью выявлять ДНК хламидий в различных образцах от человека и животных.

Преимуществом разработанной тест-системы ПЦР-РВ для *S. trachomatis* является одновременное выявление в одной пробе нескольких мишеней - 23S рРНК и криптической плазмиды. Благодаря многокопийности криптической плазмиды *S. trachomatis* ее использование в качестве мишени позволило увеличить чувствительность тест-системы в несколько раз, в сравнении с другими системами, направленными только на гены хромосомы *S. trachomatis*. Предел чувствительности ПЦР-РВ для выявления *S. trachomatis* составил  $10^3$  ГЭ/мл, или 10 ГЭ/проба.

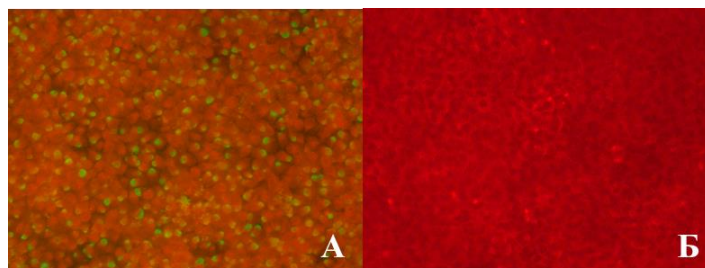
В ходе создания тест-системы ПЦР-РВ для *S. pneumoniae* были выбраны и синтезированы три пары праймеров. Экспериментальная проверка выявила наилучшие показатели чувствительности и специфичности при использовании праймеров к последовательности 16S рРНК. Предел чувствительности ПЦР-РВ для выявления *S. pneumoniae* составил  $10^3$  ГЭ/мл, или 10 ГЭ/проба. Тест-системы для диагностики *S. trachomatis* и *S. pneumoniae* показали высокую диагностическую эффективность. Для них подготовлены проекты ТУ и инструкции.

В тест-системе для выявления ДНК *S. psittaci*, предложенной Ménard et al. и адаптированной в нашей работе, в качестве мишени используется ген *incA*, кодирующий белок, секретирующийся на мембране включения. Отличительной особенностью этого гена является его высокая видоспецифичность, что было подтверждено экспериментально. Апробация метода была проведена на ДНК коллекционного штамма *S. psittaci*. Эффективность тест-системы для выявления ДНК *S. psittaci* была показана при анализе образцов помета от птиц и рептилий. Так, ДНК *S. psittaci* была выявлена в 4.5% образцов помета городских голубей, а анализ образцов от попугаев из питомника в Московской области позволил подтвердить вспышку пситтакоза.

Таким образом, разработанные тест-системы ПЦР-РВ для выявления ДНК *S. trachomatis*, *S. pneumoniae* и *S. psittaci*, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, эффективны для использования при выявлении ДНК в образцах с небольшим количеством хламидий, таких как сыворотка крови и клинические образцы от людей с хронической хламидийной инфекцией, а их применение направлено на улучшение диагностики хронических хламидийных инфекций.

С целью проведения генотипирования коллекционных изолятов лаборатории, а также изолятов от людей и животных, были адаптированы методы, в которых в качестве мишени используется на ген *ompA* *S. trachomatis*, а также схемы MLST для Chlamydiales. Было показано, что результаты генотипирования *S. trachomatis* на основе гена *ompA* коррелируют с подходом серотипирования хламидий, широко используемым до сих пор. Однако применение *ompA* - генотипирования целесообразно совместно с MLST, что позволяет проводить более глубокий анализ

эволюционных изменений в геноме хламидий. Проведение MLST *S. pneumoniae* и *S. psittaci* позволяет идентифицировать штаммы и изучать эпидемическое распространение штаммов определенных генотипов.



**Рисунок 1.** Метод выявления антител к белкам Inc: А – специфическое ярко-зеленое свечение хламидийных включений в клетках McCoу В, при выявлении антител к белкам Inc методом МИФ в положительном образце сыворотки крови (разведение 1:16); Б – отсутствие специфического свечения в отрицательном образце сыворотки (разведение 1:16) ( $\times 20$ ).

Идентификация серологических маркеров хронической хламидийной инфекции до сих пор является актуальной задачей [Posada D. et al., 1998]. Это связано с тем, что хламидии при хроническом течении инфекции, во-первых, локализуются преимущественно внутри эукариотических клеток, что приводит к снижению выраженности иммунного ответа, а во-вторых, для персистирующих форм хламидий, которые ответственны за возникновение хронического инфекционного процесса, показано подавление экспрессии основных антигенных детерминант.

Для улучшения серологической диагностики хламидийной инфекции, вызванной *S. trachomatis*, был разработан оригинальный метод выявления антител к белкам семейства Inc, которые секретируются и встраиваются в мембрану фагосомы на внутриклеточном этапе жизненного цикла и при персистентной хламидийной инфекции. Выявление антител к этим антигенам проводили в формате МИФ при использовании антигена, который обозначен как антиген к белкам Inc, т.е. хламидийных фагосом в культуре клеток. (Рисунок 1).

При применении этого метода для анализа сывороток крови больных с хламидийной инфекцией антитела к белкам семейства Inc выявляли в 2.5 раза чаще по сравнению с классическим методом МИФ к корпускулярному антигену.

Все вышеописанные методы включены в комплексный подход, и различные их комбинации позволяют проводить направленную диагностику, как острой, так и хронической хламидийной инфекции (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Алгоритм диагностики острой и хронической хламидийной инфекции.

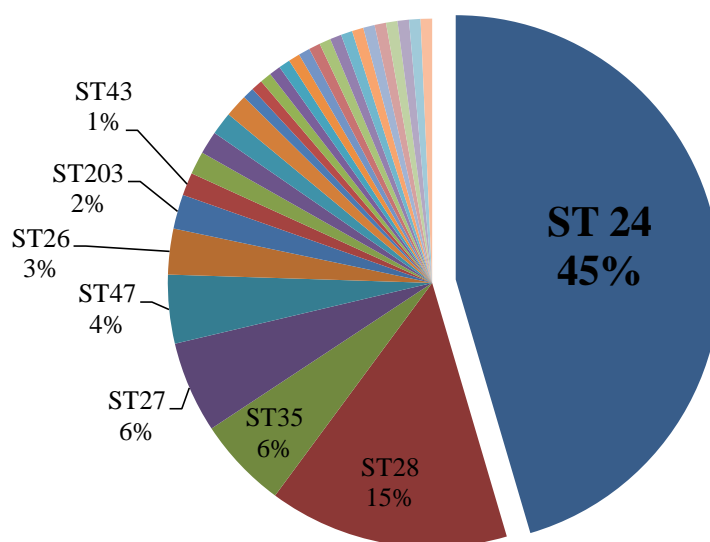
Так, при острой инфекции и при работе с материалом от животных целесообразно использовать метод ПЦР-РВ для видовой идентификации, а затем, для более глубокого анализа проводить *ompA* - генотипирование, MLST и полногеномное секвенирование. В то время как при хронической хламидийной инфекции, когда возбудитель циркулирует в организме в количествах, недостаточных для проведения генотипирования, на первый план выходят методы прямого выявления, а также идентификация серологических маркеров методами ИФА и МИФ с детекцией антител к антигенам, присутствующим на мембране фагосомы.

### **Применение комплексного подхода для диагностики и молекулярно-генетической характеристики возбудителей хламидиоза**

Коллекция изолятов рода *Chlamydia*, собранных в лаборатории хламидиозов с 1970 года и выделенных от пациентов с различными нозологиями, была проанализирована с помощью разработанного комплексного подхода. Методом ПЦР-РВ была показана принадлежность к виду *C. psittaci* трех изолятов, выделенных из синовиальной жидкости больных с артритом. Два изолята AP-23 и CP-1 были выделены Шаткиным в 1971 г. [Колкова Н. И. с соавт., 2014], изолят 25SM получен от Schachter в 1968 г. [Ostler В. Н. et al., 1970]. Для всех трех изолятов была показана высокая патогенность на лабораторных животных.

Для изучения генетических особенностей множественного тропизма *C. psittaci* совместно с сотрудниками лаборатории анализа геномов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Кунда М.С., Шараповой Н.Е., Рыжовой Н.Н. и Аксеновой Е.И. было выполнено MLST и полногеномное секвенирование. На основе MLST для изолятов определили аллельный профиль, позволивший отнести их к 24 генотипу. Ретроспективный анализ базы данных Chlamydiales

PubMLST показал, что 24 генотип широко распространен по всему миру и его доля составляет 45% от всех зарегистрированных к 2019 году изолятов *C. psittaci* (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Частота встречаемости генотипов (ST) *C. psittaci*, зарегистрированных в базе данных Chlamydiales PubMLST.

В дальнейшем для анализа изменчивости геномов при адаптации к широко не озвученной ранее для *C. psittaci* локализации в организме человека было проведено полногеномное секвенирование. Все три полных генома были зарегистрированы в GenBank: GIMC2005:Cps25SM (CP024453.1, CP024454.1), GIMC2004:CpsAP23 (CP024455.1, CP024456.1) и GIMC2005:CpsCP1 (CP024451.1, CP024452.1). Сходство геномов составило более 99%. По сравнению с геномом типового штамма *C. psittaci* 6BC (CP002549.1) геномы штаммов 25SM, CP1 и AP23 имели 93, 72, 71 однонуклеотидную замену (SNV); 8, 14, 12 инделей. Множественные нуклеотидные замены (MNV) обнаружены только в геноме 25SM. MNV, индели и ряд SNV, особенно отличающие 25SM от CP1 и AP23, были сосредоточены в областях полиморфных мембранных белков (pmp), которые были изучены дополнительно. В зоне пластичности отличие 25SM от CP1 и AP23 затронуло ген цитотоксина. Рамка считывания цитотоксина оказалась короче, но содержала все домены, необходимые для функциональной активности белка. Такую же рамку считывания обнаружили у типового штамма 6BC. Заметим, что 25SM и 6BC были изолированы в США, но с разницей в четверть века.

Для выявления корового генома к 3-м секвенированным геномам добавили из GenBank 18 собранных геномов изолятов, выделенных из разных источников. Коровый геном в выборке составил 974 гена. Уникальные гены в геномах ST24 были обнаружены для двух изолятов: 1) выделенного от



дикого попугая и 2) авирулетного штамма, полученного из типового штамма бВС при длительном лабораторном культивировании. Полученные данные свидетельствуют о стабильности геномов штаммов ST24.

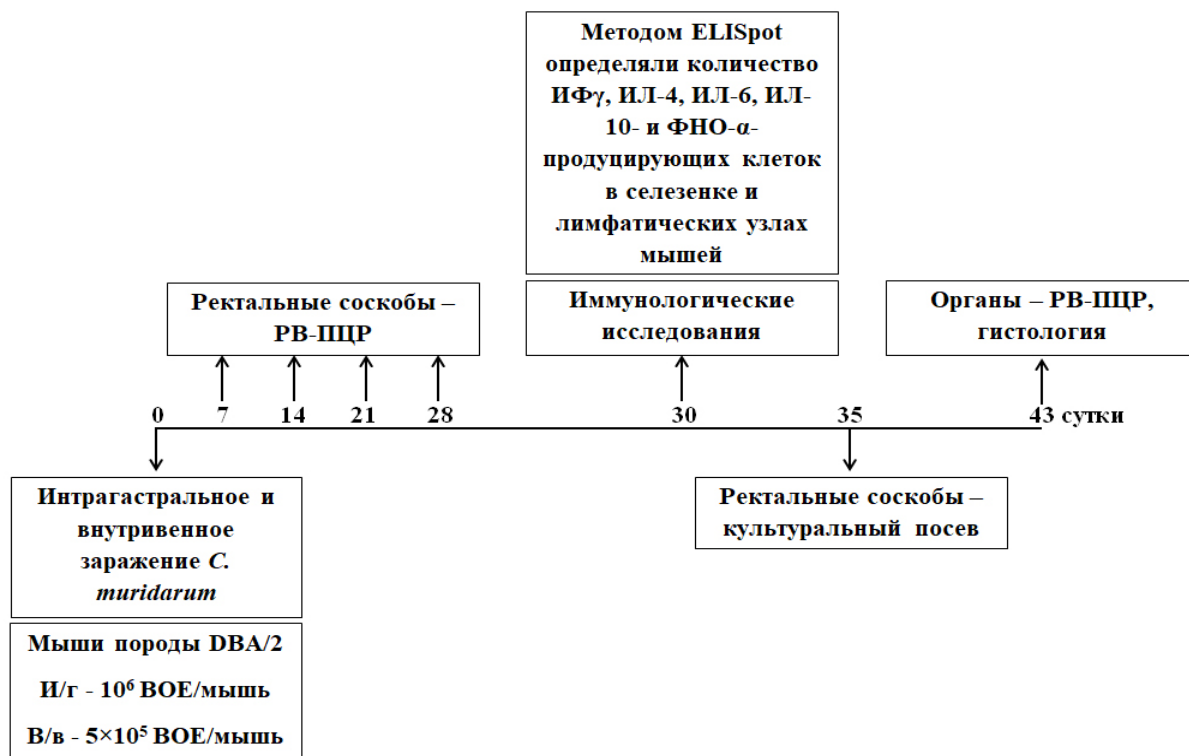
Высокая частота встречаемости *C. psittaci* ST24, адаптация к широкому кругу хозяев при стабильном геноме свидетельствует о потенциальной опасности штаммов этого генотипа и необходимости мониторинга эпидемиологической обстановки в отношении *C. psittaci* ST24.

### **Создание экспериментальной модели животных для изучения возможной колонизации хламидиями эпителия ЖКТ**

Создание экспериментальной модели позволило ответить на 3 основных вопроса: 1) могут ли хламидии в случае генерализации инфекции колонизировать органы ЖКТ, 2) насколько длительно могут там сохраняться, 3) является ли колонизация кишечника бессимптомной или вызывает патологические изменения.

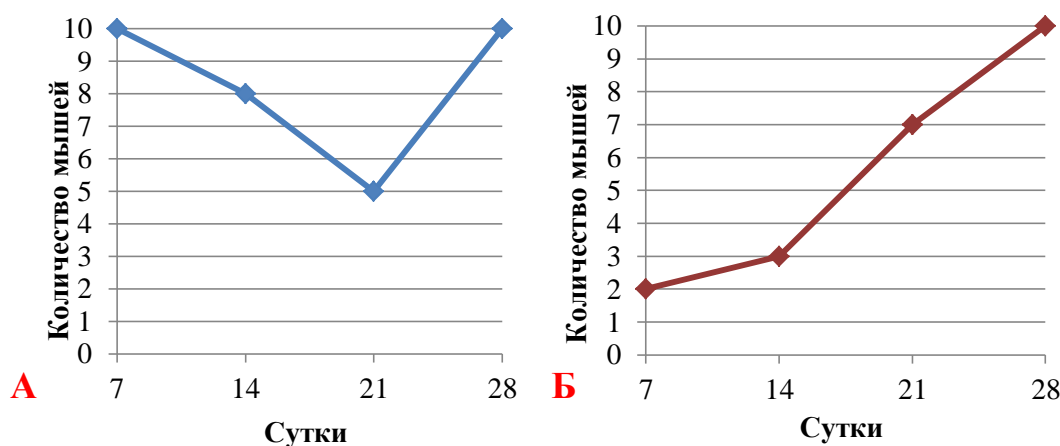
Для того чтобы понять, могут ли жизнеспособные формы хламидий циркулировать в кровяном русле и насколько длительно, было проведено внутривенное заражение мышей и исследование сывороток крови культуральным методом и ПЦР-РВ. Было показано, что жизнеспособные формы хламидий циркулируют в крови до 8 суток после заражения.

Для изучения возможности колонизации хламидиями ЖКТ были использованы 2 способа заражения мышей – интрагастральное и внутривенное. Наступление колонизации после заражения контролировали посредством забора ректальных соскобов на 7, 14, 21 и 28 сутки и их исследования методом количественного ПЦР-РВ. На 30 сутки были исследованы маркеры воспаления. На 35 сутки проводили культивирование материала из ректальных соскобов. Эксперимент был остановлен на 43 сутки, и произведен забор тонкого кишечника, толстого кишечника и аппендикса с последующим исследованием методом ПЦР-РВ и проведением гистологических исследований (Рисунок 4).

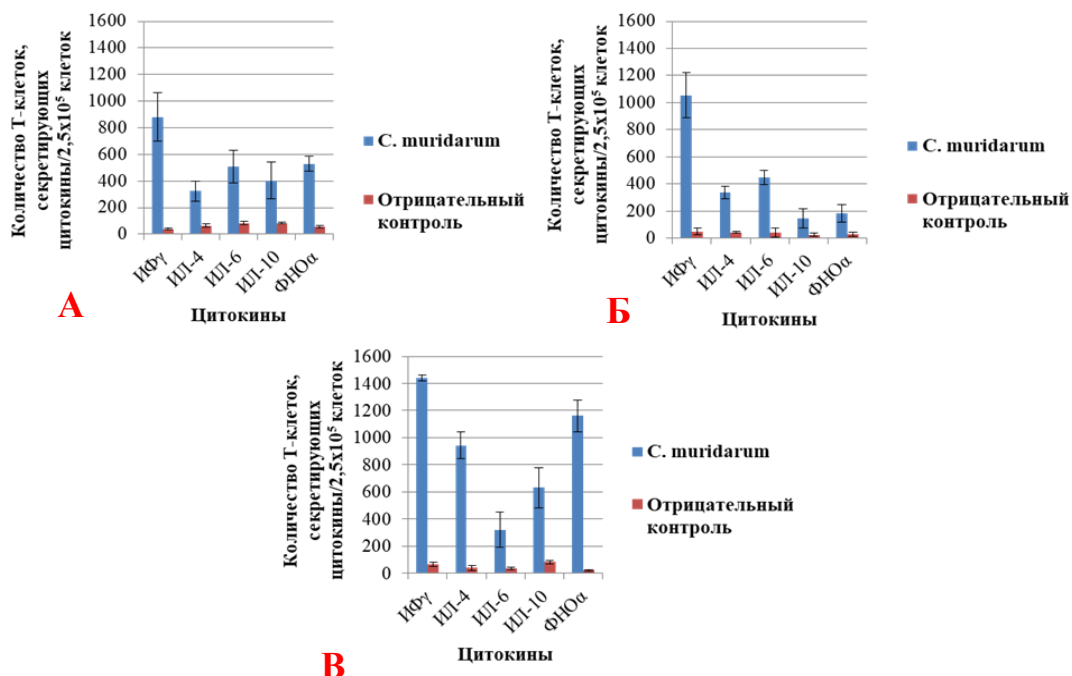


**Рисунок 4.** Дизайн эксперимента по заражению мышей *C. muridarum*.

У всех мышей в группе устойчивая колонизация была установлена к 28 суткам, при этом у 6 из 10 мышей на 35 сутки выявили жизнеспособные формы хламидий (Рисунок 5). Исследование органов на наличие ДНК *C. muridarum* показало, что в большей степени бактерии колонизировали толстый кишечник и аппендикс.



**Рисунок 5.** Динамика выявления ДНК *C. muridarum* в ректальных соскобах при: А – интрагастральном заражении; Б – внутривенном заражении.



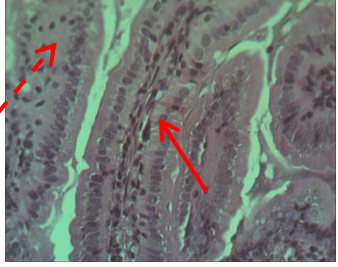
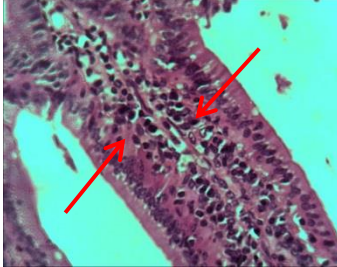
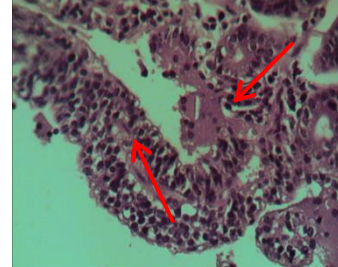
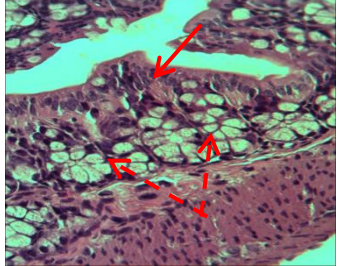
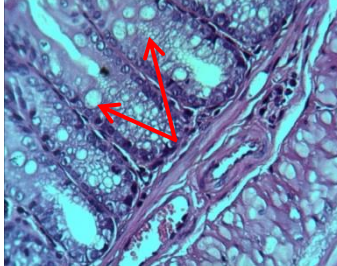
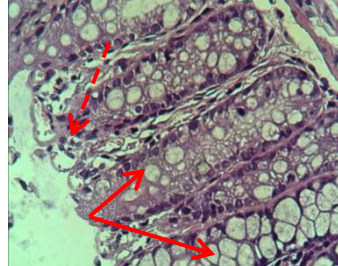
**Рисунок 6.** Определение количества Т-клеток, отвечающих секрецией цитокинов (ИФγ, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНОα): А – при интрагастральном, Б – внутривенном, В - интравагинальном заражении.

Оценка воспалительных маркеров на 30 сутки после заражения в селезенке и лимфатических узлах мышей показала, что при воспроизведении инфекции урогенитального тракта (УГТ) путем интравагинального заражения наблюдали повышение продукции всех исследуемых цитокинов, в том числе и ИФγ, который является ключевым в защите от хламидийной инфекции. Цитокиновый профиль при интрагастральном и внутривенном заражении в целом коррелировал с восходящей урогенитальной хламидийной инфекцией и отличался только большей продукцией ИЛ-4 и ФНОα при интравагинальном заражении (Рисунок 6).

Повышение продукции как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов свидетельствует о системном воспалительном ответе.

Для того чтобы ответить на вопрос, приводит ли колонизация хламидиями кишечника к патологическим изменениям, было проведено гистологическое исследование, которое показало наличие изменений кишечных ворсинок в тонкой кишке и переполнение слизью клеток кишечных крипт в толстой кишке. При интрагастральном заражении изменения были более выраженными.

Отличительными признаками слизистой оболочки тонкой кишки при интрагастральном заражении, являлось то, что, наряду с деструктивными изменениями кишечных ворсинок, присутствовали признаки деструкции клеток крипт, в которых также было уменьшено содержание секреторных гранул.

Норма	Интрагастральное заражение	Внутривенное заражение	
 <p>40×10  <b>→</b> - снаружи ворсинки покрыты столбчатыми эпителиоцитами, по апикальной поверхности эпителия четко контурируется щеточная каемка.  <b>- - - →</b> - строма кишечной ворсинки представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью.</p>	 <p>40×10  <b>→</b> - отек и лимфоцитарная инфильтрация стромы ворсинок.</p>	 <p>40×10  <b>→</b> - деструктивные изменения в строме кишечных ворсинок, присутствие лимфоцитов в строме и деструкция эпителия ворсинок.</p>	<b>Тонкий кишечник</b>
 <p>40×10  <b>→</b> - поверхность слизистой оболочки выстлана однослойным столбчатым эпителием.  <b>- - - →</b> - клетки кишечных крипт заполнены слизистым секретом</p>	 <p>40×10  <b>→</b> - пенистый секрет в полости крипты, крупные секреторные вакуоли со слизистым секретом.</p>	 <p>40×10  <b>→</b> - клетки крипт на разных стадиях синтеза слизистого секрета.  <b>- - - →</b> - деструкция покровного эпителия.</p>	<b>Толстый кишечник</b>

**Рисунок 7.** Патологические изменения толстого кишечника после интрагастрального и внутривенного заражения мышей *S. muridarum*.

В то время как в просвете толстой кишки при интрагастральном заражении присутствовало большое количество слизи, инфильтрированной лимфоцитами, а клетки кишечных крипт находились на разных стадиях синтеза и накопления слизи (Рисунок 7).

Таким образом, при колонизации хламидиями органов ЖКТ на 43 сутки наблюдались выраженные патологические нарушения в кишечнике, свидетельствующие о наличии воспалительного процесса.

Изучение влияния колонизации кишечника на возникновение нарушений со стороны репродуктивной сферы показало, что эти состояния приводили к серьезной задержке размножения у мышей. Если в группе контроля первый приплод был отмечен на 14 сутки после начала эксперимента, то в опытной группе только на 38 сутки. Более того, до окончания эксперимента в опытной группе беременность наступила только у половины мышей. У половины самцов в опытной группе было отмечено возникновение тяжелых уретритов, что косвенно может свидетельствовать об участии хламидий в возникновении мужского бесплодия (Рисунок 8).

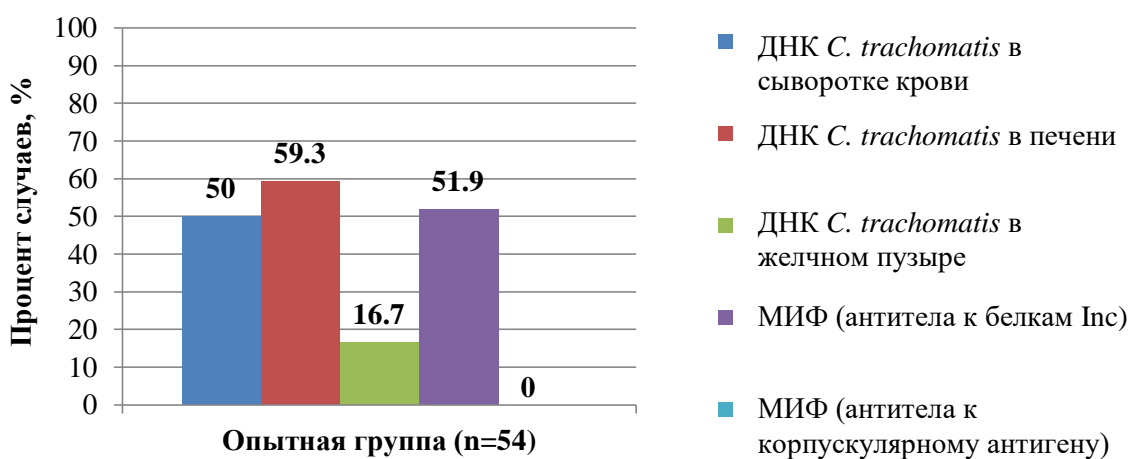


**Рисунок 8.** Макроскопические признаки уретрита у самцов мышей породы ICR (CD-1) на 10 сутки после внутривенного заражения *S.muridarum*.

Таким образом, было доказано, что при системном распространении устанавливается устойчивая колонизация кишечника хламидиями. Изучение маркеров воспаления показало наличие воспалительного ответа. Патологические изменения в кишечнике показывают, что колонизация не является бессимптомной. Точнее охарактеризовать это состояние можно как хроническую хламидийную инфекцию, локализирующуюся в ЖКТ. Изменения в репродуктивной функции мышей и возникновение заболеваний у самцов говорит об участии этого состояния в нарушении фертильности.

### Выявление маркеров инфекции, обусловленной *C. trachomatis*, у больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта

С целью определения возможной роли хламидийной инфекции в патологиях, связанных с ЖКТ, была исследована группа (54 пациента) с острыми и хроническими заболеваниями органов ЖКТ и подтвержденной хламидийной инфекцией в анамнезе. В исследуемой группе анализировали сыворотку крови и биоптаты печени и желчного пузыря, полученные при проведении плановых оперативных вмешательств. ДНК *C. trachomatis* в 50% случаев выявили в сыворотке крови, в 59.3% - в образцах печени и в 16.7% - в образцах желчного пузыря. В то время как антитела к белкам Inc детектировали у 51.9% пациентов (Рисунок 9).



**Рисунок 9.** Сравнение эффективности методов выявления хронической хламидийной инфекции.

Таким образом, впервые было показано, что *C. trachomatis*, циркулируя в кровяном русле, способна диссеминировать в органы ЖКТ и длительно там сохраняться. Это явление требует дальнейшего детального изучения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы персистенции хламидий и диагностика хронических хламидийных инфекций к настоящему времени являются актуальной проблемой. Для совершенствования диагностики хламидийной инфекции разработан алгоритм, направленный на идентификацию маркеров как острой, так и хронической хламидийной инфекции. Разработанный комплексный подход включает высокочувствительные методы детекции хламидий, проведения их молекулярно-генетического анализа и выявления новых мишеней для серологической диагностики. С использованием разработанного алгоритма показан множественный тропизм *C. psittaci* как в отношении занимаемых ниш в организме, так и хозяев. Также доказана широкая распространенность эпидемически значимого генотипа этого возбудителя. В результате моделирования колонизации хламидиями ЖКТ на

мышцах впервые показано, что она не является бессимптомной, и эти состояния приводят к патологическим изменениям в стенке кишечника, а в отношении репродуктивной сферы – к серьезным задержкам размножения. При анализе материала от людей продемонстрировано, что хламидии могут колонизировать органы ЖКТ и длительно там сохраняться.

## **ВЫВОДЫ**

1. На основе новых специфических мишеней разработан алгоритм лабораторной диагностики острых и хронических хламидийных инфекций, включающий методы выявления ДНК *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и *C. psittaci* и серологических маркеров с высокой чувствительностью и специфичностью.

2. Применение разработанного алгоритма диагностики хронической хламидийной инфекции позволило впервые продемонстрировать, что после перенесенной урогенитальной хламидийной инфекции у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта выявляются специфические серологические маркеры и ДНК *C. trachomatis* как в сыворотке крови, так и в биоптатах органов ЖКТ.

3. Впервые показано, что возбудитель зоонозного респираторного заболевания *C. psittaci* выявляется в синовиальной жидкости больных с артритом. На основе генотипирования и полногеномного секвенирования выделенных изолятов установлена их принадлежность к эпидемически значимому 24 генотипу *C. psittaci*.

4. При моделировании гематогенного распространения хламидий у лабораторных животных показано, что циркуляция возбудителя в кровяном русле приводила к длительной колонизации органов ЖКТ и УГТ, вследствие чего развивалась хроническая хламидийная инфекция в этих органах, приводящая к подавлению репродуктивной функции.

5. Показано, что *C. muridarum* обладает тропизмом к эпителию ЖКТ мышей и способна длительно там сохраняться, приводя к возникновению хронической хламидийной инфекции, которая характеризуется морфологическими нарушениями в тканях кишечника и системным воспалительным ответом

**Практические рекомендации.** Разработанный алгоритм может применяться в практической медицине для диагностики острой и хронической хламидийной инфекции что позволит существенно уменьшить количество недиагностированных случаев хламидийной инфекции.



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в журналах из перечня ВАК РФ:

1. **Бондарева Н. Е.** Выявление маркеров инфекции, обусловленной *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*, у больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта / **Н. Е. Бондарева**, Е. Ю. Моргунова, Н. А. Зигангирова, Ю. Г. Шапкин, Ю. В. Чалык, Р. Ю. Чалык // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, №. 3. – С. 316-324.

2. **Бондарева Н. Е.** Роль колонизации хламидиями органов желудочно-кишечного тракта в развитии и поддержании хронических хламидийных инфекций / **Н. Е. Бондарева**, Е. А. Королева, Н. А. Зигангирова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – Т. 36, №. 4. – С. 177-181.

### Публикации в материалах конференций:

1. **Бондарева Н. Е.** Молекулярная характеристика возбудителя урогенитальных хламидиозов / **Н. Е. Бондарева**, Н. А. Зигангирова // VI Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» – 2014. – Москва - Звенигород. – С. 16.

2. Зигангирова Н. А. Гематогенный путь распространения *Chlamydia trachomatis* и возможность выявления возбудителя молекулярно-биологическими методами / Н. А. Зигангирова, **Н. Е. Бондарева**, Е. Ю. Моргунова // XVI Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов – 2016. – Москва. – С. 13.

3. Воронина О. Л. Реконструкция этапов адаптации генома *Chlamydia psittaci* – возбудителя реактивного артрита / О. Л. Воронина, Е. И. Аксенова, М. С. Кунда, А. Н. Семенов, **Н. Е. Бондарева**, Н. Н. Рыжова, Н. Е. Шарапова, Н. А. Зигангирова // Геномное секвенирование и редактирование – 2017. – Москва. – С. 9.

4. Voronina O. L. Peculiarities of gram-negative and gram-positive bacteria adaptation to the host organism / O. L. Voronina, E. I. Aksenova, M. S. Kunda, A. N. Semenov, **N. E. Bondareva**, N. E. Sharapova, N. N. Ryzhova, N. A. Zigangirova // II Всероссийская конференция с международным участием "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" – Новосибирск, 18-23 июня 2017 г. – Acta Naturae. – 2017:9. – Спецвыпуск N1. – С. 53.

5. **Бондарева Н.Е.** Причины хронического течения урогенитальной инфекции и перспективы ее эффективного лечения / **Н. Е. Бондарева**, Е. А. Королева, Е. Ю. Моргунова, Н. А. Зигангирова // XVIII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов – 2018. – Москва. – С. 6-7.

6. Воронина О.Л. *Chlamydia psittaci* эпидемического генотипа 24. Условия для эволюции / О. Л. Воронина, М. С. Кунда, Н. Е. Шарапова, Н. Н. Рыжова, Е. И. Аксенова, **Н. Е. Бондарева**, Н. А. Зигангирова // Геномное секвенирование и редактирование – 2018. – Москва. – С. 27.



**Список сокращений:**

- ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза  
 ВОЕ – включения образующие единицы  
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
 ИЛ - интерлейкин  
 ИФА – иммуноферментный анализ  
 ИФγ – интерферон-γ  
 ЛПС – липополисахарид  
 МИФ – микроиммунофлуоресценция  
 ПЦР - РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени  
 ПЦР – РВ – ГХИ – Скрин - *C. trachomatis* - РВ и ГХИ – Скрин - *C. pneumoniae* - РВ - тест-системы для диагностики генерализованных форм острых и хронических хламидиозов  
 рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота  
 УГТ – урогенитальный тракт  
 ФИТЦ (флуоресцина изотиоцианатом) - гидроксисантеновый краситель, флуорохром  
 ФНО (TNF) - фактор некроза опухоли  
 ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор  
 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – среда для культивирования клеток  
 Hsp60 (heat shock protein) – белок теплового шока  
 IgG, IgM и IgA – иммуноглобулины  
 McCoу - клеточная линия фибробластов мыши  
 MLST (Multilocus sequence typing) - мультилокусное секвенирование  
 ompA (Outer membrane protein A) – ген, кодирующий MOMP  
 Pmp (polymorphic membrane protein) - полиморфный мембранный белок  
 PZ (plastic zone) – зона пластичности  
 SPG - сахарозно-фосфатно-глутаминовый буфер  
 ST (sequence type) – генотип.