

НОВЫЙ ПАТОГЕН WADDLIA CHONDROPHILA: АКТУАЛЬНОСТЬ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ

УДК: 616.98-022.7-078:579.882.083



Людмила Рубаник,
завлабораторией диагностики
сочетанных бактериально-
вирусных инфекций РНПЦ
эпидемиологии и микробиологии,
кандидат биологических наук,
доцент;
rubaniklv@tut.by



Николай Полещук,
главный научный сотрудник
лаборатории диагностики
сочетанных бактериально-
вирусных инфекций РНПЦ
эпидемиологии и микробиологии,
доктор медицинских наук,
профессор; pnn@belriem.by

Аннотация. Подняты проблемы диагностики и значимости хламидияподобной бактерии *Waddlia chondrophila* в развитии репродуктивных нарушений у человека. Апробирована in-house ПЦР, направленная на детекцию фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК патогена. Представлены результаты пилотного исследования, выявившего положительные случаи в группе женщин с выкидышем (2/49, 4,08%). Акцентируется внимание специалистов медико-биологического профиля на необходимости кооперации усилий с целью дальнейшей разработки и внедрения подходов к индикации и идентификации данного эмерджентного (нового) микроорганизма, расширения знаний о его распространенности и этиопатогенетических механизмах вызываемых им патологических состояний.

Ключевые слова: *Waddlia chondrophila*, диагностика, репродуктивные нарушения, медицинская значимость.

Для цитирования: Рубаник Л., Полещук Н. Новый патоген *Waddlia chondrophila*: актуальность обнаружения и изучения // Наука и инновации. 2022. №3. С. 71-76.
<https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-3-71-76>

Каждая седьмая пара в Республике Беларусь сталкивается с проблемой репродукции. Этим лицам требуется длительное лечение и/или такие вспомогательные технологии, как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) и др. Эффективность ЭКО составляет 40–45%, и во всем мире прилагаются усилия различных специалистов для повышения этого показателя. При этом на первом месте среди причин женского бесплодия стоят послед-

ствия воспалительных процессов репродуктивной системы, обусловленные различными микроорганизмами (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex 1/2 type* и др.), а далее – эндокринные и генетические нарушения. Доля мужского бесплодия в парах с проблемой репродукции доходит до 50%, и его классическими причинами являются генетические аномалии, гипогонадизм, крипторхизм или опухоли, но, к сожалению, практически в половине случаев оно рассматривается как идиопатическое.

Известно, что патогенные бактерии могут отрицательно влиять на фертильность, вызывая эпидидимиты, орхиты, обструкции репродуктивного тракта и поражение сперматозоидов. Наличие бактерий в сперме (бактериоспермия) и лейкоцитоспермия могут напрямую способствовать недостаточности репродуктивной функции или служить дополнительными негативными факторами, ухудшающими прогноз фертильности в естественной или вспомогательной репродукции [1].

Примерно 25% беременностей заканчиваются выкидышами. Около 15% из них происходит до 13 недели беременности, а 60% поздних выкидышей и 40% преждевременных родов связаны с инфекциями [2–3]. Однако причина данного нарушения расшифровывается только в половине случаев [4]. Внутриклеточные бактерии, которые не растут на обычных питательных средах, используемых при выявлении типичных патогенов человека

в клинических образцах, представляют собой потенциальную причину, приводящую к бесплодию, выкидышам и другим репродуктивным потерям неустановленной этиологии [5–8].

Современные геномные технологии, включая полногеномное секвенирование, позволили детектировать и описать новые инфекционные агенты, негативно влияющие на репродуктивное здоровье человека. К таким патогенам относится и облигатная внутриклеточная бактерия *Waddlia chondrophila*, входящая в семейство *Waddliaceae*, порядок *Chlamydiales*.

В типе *Chlamydia* выделяют порядок *Chlamydiales*, куда до недавнего времени входило только семейство *Chlamydiaceae*. Однако исследования последних лет показали, что оно представляет собой лишь «верхушку айсберга» с точки зрения разнообразия типа, поскольку было описано еще восемь новых семейств, куда вошли облигатные внутриклеточные бакте-

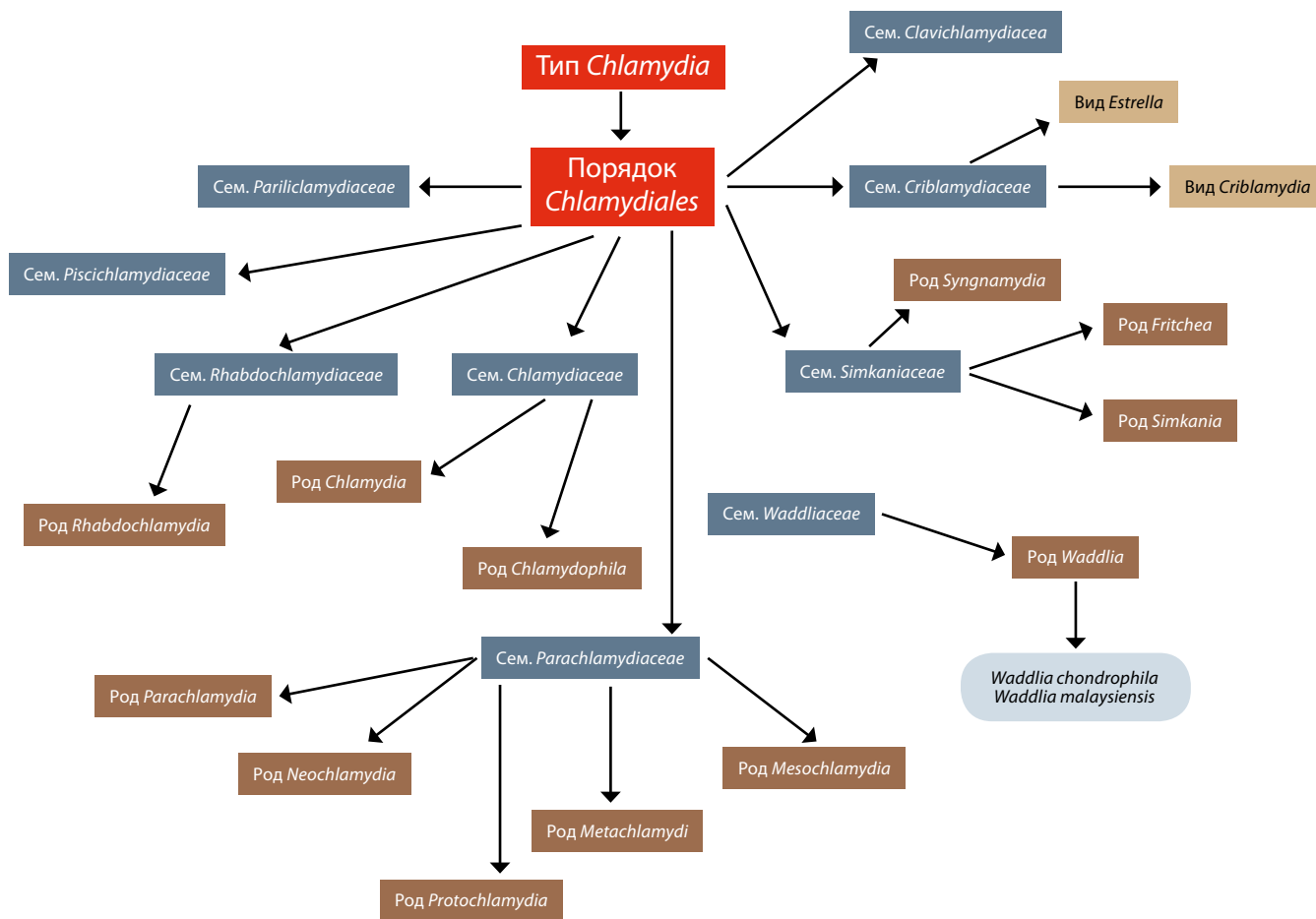


Рис. 1. Современная классификация порядка *Chlamydiales*, включая род *Waddlia* [9]

рии. Наиболее изученными являются: семейство *Parachlamydiaceae*, состоящее из пяти родов, члены которого были обнаружены у различных организмов-хозяев; *Waddliaceae* – монофилетическое семейство, содержащее два вида *Waddlia chondrophila* и *Waddlia malaysiensis*; *Simkaniaceae*, включающее четыре известных в настоящее время вида; *Rhabdochlamydiaceae*, включающее два вида рода *Rhabdochlamydia*, а также еще один вид *Renichlamydia lutjani*; *Criblamydiaceae* – имеет два рода, представители которых были выделены из речной воды; виды семейств *Piscichlamydiaceae*, *Clavichlamydiaceae* и *Parilichlamydiaceae*, обнаруженные исключительно у рыб. На *рис.1* представлена актуальная таксономия порядка *Chlamydiales* [9].

Все эти новые хламидии, или точнее хламидияподобные микроорганизмы (*Chlamydia-like organisms – CLOs*), отличаются на генотипическом и фенотипическом уровнях от семейства *Chlamydiaceae* и широко известных патогенных для человека представителей родов *Chlamydia* и *Chlamydophila*: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae*. Сходством, однако, является то, что все они обладают идентичностью последовательности 16S рРНК не менее чем на 80–90%. Также, несмотря на то что эти микроорганизмы инфицируют разных хозяев, все они имеют аналогичный двухфазный цикл развития, включающий внеклеточное инфекционное элементарное тельце и внутриклеточное вегетативное ретикулярное тельце [10].

Возбудитель *Waddlia chondrophila* впервые был изолирован в 1990 г. из абортированного материала коровы [11]. К настоящему времени выделены, хранятся в международных коллекциях и используются в экспериментальных исследованиях два штамма: WSU86–1044 и 2032/99. Последний был получен в 1999 г. также из абортированного материала коровы [12]. Позднее бактерия была обнаружена не только у животных, но и выявлена у женщин с неблагоприятным исходом беременности (выкидыш, аборт). Другой представитель семейства *Waddliaceae* – *Waddlia malaysiensis* был выделен в 2005 г. из мочи летучих мышей. Этот вид наименее изучен, но известно, что он имеет 94–96%-ное сходство в последовательности 16S рРНК с *Waddlia chondrophila*.

Установлено, что *Waddlia chondrophila* имеет отличия в ростовых характеристиках, включая более короткие сроки репродукции и выра-

женную цитотоксичность, по сравнению с *Chlamydia trachomatis*, и неспособность ингибировать стауроспорин-индуцированный апоптоз [13]. Геном микроорганизма представлен круговой хромосомой размером 2,1 Мб и плазмидой размером 15,6 Кб, с содержанием G и C пар 43,8% и 37,6% соответственно [14]. Это в 2 раза больше, чем геном *Chlamydia trachomatis* (1,0 Мб), что обеспечивает продукцию большего количества аминокислот (*рис. 2*). Плазида является многокопийной – 11 копий на клетку. Тестирование *in vitro* показало, что *Waddlia chondrophila* чувствительна к доксициклину и азитромицину, но устойчива к β-лактамам и фторхинолонам [5].

Наряду с широко известным близкородственным патогеном *Chlamydia trachomatis*, имеющим огромную медицинскую значимость, получены

Аминокислота	<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/CX	<i>Waddlia chondrophila</i> WSU 86-1044
Аланин	■	■
Аргинин	■	■
Аспарагин	■	■
Аспартат	■	■
Цистеин	■	■
Глутамат	■	■
Глутамин	■	■
Глицин	■	■
Гистидин	■	■
Изолейцин	■	■
Лейцин	■	■
Лизин	■	■
Метионин	■	■
Фенилаланин	■	■
Пролин	■	■
Серин	■	■
Треонин	■	■
Триптофан	■	■
Тирозин	■	■
Валин	■	■

Рис. 2. Наличие генов у *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX и *Waddlia chondrophila* WSU86–1044, ответственных за продукцию аминокислот.

■ Присутствующие гены ■ Отсутствующие гены
Адаптировано из De Barys M., Greub G. [34]

убедительные доказательства независимой роли *Waddlia chondrophila* в нарушении фертильности у мужчин и женщин (бесплодии, выкидышах, замерших беременностях, преждевременных родах). Микроорганизм был обнаружен непосредственно в цервикагинальном секрете, плаценте и моче женщины с выкидышем методом ПЦР и при использовании иммуногистохимической окраски образцов биопсийного материала [5–7]. Считают также возможным инфицирование новорожденных при прохождении через родовые пути. В серии экспериментов получены данные, подтверждающие негативное влияние инфекции, обусловленной *Waddlia chondrophila*, на сперматозоиды (снижение жизнеспособности и митохондриального потенциала, нарушающего подвижность) и этиологической роли данного микроорганизма в мужском бесплодии. Исследователи в условиях *in vitro* установили, что заражение сперматозоидов штаммом *Waddlia chondrophila* приводило к 20%-ному увеличению их гибели по сравнению с контролем (интактными сперматозоидами). Следует отметить, что бактерия обнаруживалась как на поверхности сперматозоидов, так и внутри них. Последнее указывает на то, что сперма служит бактериальным вектором для передачи микроорганизма при сексуальных контактах [15].

При этом, согласно накопленным данным, аналогично как и при урогенитальной хламидийной инфекции, вызываемой *Chlamydia trachomatis*, большинство пациентов (60–70%) с *Waddlia chondrophila* имеют асимптомное течение и хроническую форму инфекции [5, 16]. Это свидетельствует о целесообразности тестирования на наличие/отсутствие *Waddlia chondrophila* женщин с проблемами репродуктивной сферы и мужчин в случае нарушения в спермограмме.

Патогенный потенциал возбудителя был доказан и в других исследованиях [17–19]. Показана способность данного микроорганизма проникать и размножаться в моноцитах/макрофагах человека, фибробластах – клетках Vero, McCoу, АН-1 трофобластах, А549 пневмоцитах, вызывая лизис инфицированных клеток. В экспериментах *in vitro* было установлено, что *Waddlia chondrophila* может репродуцироваться и персистировать в клетках эндометрия и плаценты, повреждая ее. Считают, что в механизм патогенеза вероятнее всего вовлечен белок теплового шока-60 бактерии и/или продукция воспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли – α [20].

Моделирование генитальной инфекции, вызванной *Waddlia chondrophila*, на мышах выявило дозозависимый характер инфекции и способность микроорганизма к диссеминации. Установлено, что возбудитель из входных ворот распространялся в поясничные лимфатические узлы, селезенку и печень. Пик патологических проявлений отмечался на 14-й день после инфицирования и характеризовался лейкоцитарной инфильтрацией в рогах матки, печени, селезенке. Распространение патогена из входных ворот по всему организму через кровоток индуцировало системную инфекцию, органный патологический и вызывало Th 1 обусловленный гуморальный иммунный ответ [8].

Проведенные в Великобритании и Швейцарии серологические исследования выявили положительную корреляционную связь с перенесенной инфекцией, вызванной *Waddlia chondrophila*, и выкидышами. Антитела класса G в титре больше 1:64 были обнаружены у 31,9% и 33,0% женщин со спорадическими и повторными выкидышами соответственно, и получены статистически значимые различия с теми, у кого беременность протекала физиологически нормально (7%, $P < 0,001$) [21–23]. В исследовании Verweij S.P. et al., показано, что из 557 пациенток с трубным бесплодием антитела к *Chlamydia trachomatis* выявлены у 12,1%, а к *Waddlia chondrophila* – у 45,5% [24]. При этом следует отметить, что анти-*Waddlia* антитела были видоспецифичными и не давали перекрестной реакции с другими представителями порядка *Chlamydiales* и такими внутриклеточными бактериями, как *Rickettsia*, *Coxiella*, *Wolbachia*, *Anaplasma*. Кроме того, при исследовании образцов сыворотки крови женщин, имеющих повторные выкидыши и с нормально протекающей беременностью, установлено, что серопозитивность к *Chlamydia trachomatis* и *Waddlia chondrophila* была независимо связана с выкидышем. При этом считают, что коинфекция *Waddlia chondrophila* и *Chlamydia trachomatis* может приводить к более тяжелым репродуктивным последствиям и иммунному ответу, чем моноинфекция одним из представителей порядка *Chlamydiales* [21–24].

Показана также высокая серопревалентность (8,3%, 45,0% и 58,3%) антител к *Waddlia chondrophila* у мужчин с бесплодием в независимых серологических исследованиях [24–26].

Однако, несмотря на имеющиеся знания, путь передачи микроорганизма, так же, как и механизм патогенеза, окончательно не уста-

новлены. Исследования воды указывают, что она может быть потенциальным резервуаром возбудителя [16, 22, 27]. Другие авторы склонны к признанию полового пути передачи, воздушно-капельного и диссеминации патогена через кровотоки по организму. Рассматривается также зоонозный путь в результате контакта с инфицированным животным [9, 28, 29].

Следует отметить, что поскольку это облигатный внутриклеточный микроорганизм, классическими микробиологическими методами с использованием жидких или плотных питательных сред его обнаружить невозможно. Микроорганизм трудно выделить из клинических образцов, и для культивирования он нуждается в селективных средах роста и перевиваемых клеточных линиях или культурах амёб (*Acanthamoeba spp.*). Это трудоёмко, требует специальных навыков и длительного времени (до 5–7 дней) [6, 30]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является методом выбора для детекции данного патогена в биологических образцах ввиду высокой чувствительности, специфичности, стандартизации и экспрессности. Подобный подход для детекции *Waddlia chondrophila* применяется за рубежом и доступен пока только в виде *in-house* протоколов ПЦР [31–36]. Идентификация данного патогена в нашей стране до настоящего исследования не проводилась.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии выполнено тестирование образцов мазков-соскобов из урогенитального тракта 203 женщин с репродуктивными нарушениями: бесплодие (n=154), выкидыш (n=49); средний возраст пациенток – 29±6 лет, на предмет обнаружения ДНК *Waddlia chondrophila* методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ). Для амплификации искомого фрагмента консервативного участка гена 16S рРНК размером 123 п.н. использовали праймеры, описанные в статье Zezekalo V.K. [et al.], WADCHOF: GAACGAAGTGTGCTCTTGAGT и WADCHOR: CCTCTTAGCACCATATCCGG [37]. Амплификация проводилась с использованием аппарата Gradient Palm Cycler в объёме 25 мкл реакционной смеси, содержащей праймеры по 1,0 мкл каждый (20 мкМ), 2,5 мкл 10xTaq-реакционного буфера, 0,2 мкл Taq полимеразы (5 ед/мкл) (ArtStart, АртБиоТех, РБ), 1,5 мкл MgCl₂ (50 мМ),

0,5 мкл дНТФ (10 мМ), 5 мкл ДНК образца и деионизованной воды до конечного объёма. Режим амплификации включал предденатурацию при 95 °С – 2 мин., с последующими 35 циклами, состоящими из стадии денатурации 95 °С – 15 с, отжига 60 °С – 1 мин. и элонгации 72 °С – 45 с, финальной элонгации при 72 °С – 1 мин. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Оценку размеров фрагментов ДНК определяли, ориентируясь на маркер молекулярных масс нуклеиновых кислот (маркер длин 100+bp DNA Ladder, Евроген, РФ).

В результате исследований было обнаружено 2 положительных образца (рис. 3). Оба случая (2/49, 4,08%) выявлены в группе женщин с выкидышем, что на фоне отрицательных результатов тестов на другие патогенные микроорганизмы и отсутствии иных отягощающих факторов свидетельствует о патогенетической значимости *Waddlia chondrophila* для этого контингента лиц. В настоящее время проводится дальнейшее молекулярно-генетическое исследование образцов, которое позволит установить филогенетическую связь с известными штаммами патогена. При этом очевидно, что требуется продолжение исследований, включая увеличение выборки обследуемых лиц, анализ других целевых групп, применение более чувствительного метода ПЦР в режиме реального времени. Также следует апробировать и внедрить другой метод – иммуноферментный анализ. Разработанные на его основе диагностические тест-системы позволили бы оценить серопозитивность населения в отношении *Waddlia chondrophila*. Однако, так как

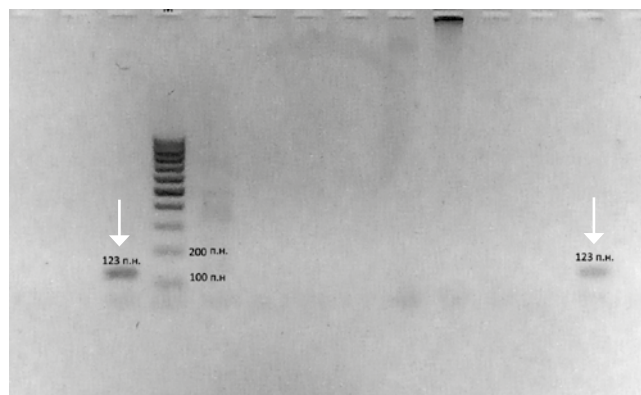


Рис. 3. Результат постановки ПЦР. Выявление фрагмента гена 16S рРНК *Waddlia chondrophila* размером 123 п.н. в анализируемых пробах (указаны стрелками)

они недоступны в качестве коммерческих наборов, необходимо создание отечественной технологической платформы для их производства.

Анализ литературы и итоги проведенного пилотного исследования дают основание для реализации более широкомасштабных исследований и необходимости кооперации специалистов медицинского и биологического профиля с целью дальнейшего изучения патогена и вызываемых им состояний.

Можно констатировать, что *Waddlia chondrophila* является эмерджентным микроорганизмом, оказывающим негативное влияние на здоровье человека. До сих пор он остается недостаточно изученным, в связи с чем необходимы дальнейшие всесторонние исследования с привлечением микробиологов, акушеров-гинекологов, урологов, ревматологов и т.д. Разработка технологии и внедрение молекулярно-биологического метода обнаружения *Waddlia chondrophila* имеет важное фундаментальное и практическое значение для нашей страны. Актуально и создание тест-систем на основе иммуноферментного метода для установления серологического статуса лиц. Налаживание системы идентификации патогена позволит определить его распространенность, расширить знания о патогенетическом потенциале и клеточном тропизме, факторах вирулентности и чувствительности к лекарственным средствам. Уточнение этиологической структуры репродуктивно значимых микроорганизмов будет способствовать повышению диагностической помощи населению и назначению адекватной антибиотикотерапии, снижению риска возникновения бесплодия и выкидышей, решению проблемы сохранения репродуктивного здоровья населения страны. ■

■ **Summary.** The problems of diagnosis and significance of the Chlamydia-like bacterium *Waddlia chondrophila* in the development of human reproductive disorders are highlighted. In-house PCR aimed to detect the 16S rRNA gene fragment of the pathogen was tested. A pilot study was carried out that allowed to detect positive cases in the group of women with miscarriage (2/49, 4.08%). The attention of biomedical specialists is focused on the need for cooperation of efforts in order to develop and implement approaches to the indication and identification of this emerging microorganism, to expand knowledge about its prevalence and etiopathogenetic mechanisms of pathological conditions caused by it.

■ **Keywords:** *Waddlia chondrophila*, diagnostics, reproductive disorders, medical relevance.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-3-71-76>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Roles of bovine *Waddlia chondrophila* and *Chlamydia trachomatis* in human preterm birth / D. Baud [et al.] // *New Microbes New Infect.* 2015. Vol. 3. P. 41–45.
2. *Waddlia chondrophila*: from bovine abortion to human miscarriage / D. Baud [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* 2011. Vol. 52. P. 1469–1470.
3. C.J. Lokwood. Predicting premature delivery – no easy task / C.J. Lokwood // *N. Engl. J. Med.* 2002. Vol. 346. P. 282–284.
4. D. Baud. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes / D. Baud, L. Regan, G. Greub // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008. Vol. 21. P. 70–76.
5. G. Goy. Antibiotic susceptibility of *Waddlia chondrophila* in *Acanthamoeba castellanii* amoebae / G. Goy, G. Greub // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol. 53. P. 2663–2666.
6. *Waddlia chondrophila* and male infertility / D. Baud [et al.] // *Microorganisms.* 2020. Vol. 8. P. 136.
7. D. Baud. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes / D. Baud, G. Greub // *Clin. Microbiol. Infect.* 2011. Vol. 17. P. 1312–1322.
8. Identification of immunogenic proteins of *Waddlia chondrophila* / C. Kebbi-Beghdadi [et al.] // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. e28605.
9. Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae* / A. Taylor-Brown [et al.] // *Pathog. Dis.* 2015. Vol. 73. P. 1–15.
10. *Waddlia chondrophila* infects and multiplies in ovine trophoblast cells stimulating an inflammatory immune response / N. Wheelhouse [et al.] // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. e102386.
11. Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus / P.M. Dilbeck [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 1990. Vol. 28. P. 814–816.
12. Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU86–1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. / F.R. Rurangirwa [et al.] // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. Vol. 49, Pt. 2. P. 577–581.
13. In contrast to *Chlamydia trachomatis*, *Waddlia chondrophila* grows in human cells without inhibiting apoptosis, fragmenting the golgi apparatus, or diverting post-golgi sphingomyelin transport / S. Dille [et al.] // *Infect. Immun.* 2015. Vol. 83, No. 8. P. 3268–3280.
14. The *Waddlia* genome: a window into chlamydial biology / C. Bertelli [et al.] // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. e10890.
15. M.M. Fraczek. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen / M. Fraczek, M. Kurpisz // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2015. Vol. 53, No. 3. P. 201–217.
16. *Chlamydia* related bacteria (*Chlamydiales*) in early pregnancy: community-based cohort study / F. Reid [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* 2017. Vol. 23. P. 119.e9–119.e14.
17. Role of *Waddlia chondrophila* placental infection in miscarriage / D. Baud [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. Vol. 20. P. 460–464.
18. G. Goy. *Waddlia chondrophila* enters and multiplies within human macrophages / G. Goy, A. Croxatto, G. Greub // *Microbes Infect.* 2008. Vol. 10. P. 556–562.
19. A. Croxatto. Early intracellular trafficking of *Waddlia chondrophila* in human macrophages / A. Croxatto, G. Greub // *Microbiology.* 2010. Vol. 156. P. 340–355.
20. C. Kebbi-Beghdadi. Permissivity of Vero cells, human pneumocytes and human endometrial cells to *Waddlia chondrophila* / C. Kebbi-Beghdadi, O. Cisse, G. Greub // *Microbes Infect.* 2011. Vol. 13. P. 566–574.
21. Prevalence and diversity of *Chlamydiales* and other amoeba-resisting bacteria in domestic drinking water systems / J. Lienar [et al.] // *New Microbes New Infect.* 2017. Vol. 15. P. 107–116.
22. Role of *Chlamydia trachomatis* and emerging *Chlamydia*-related bacteria in ectopic pregnancy in Vietnam / S. Hornung [et al.] // *Epidemiol. Infect.* 2015. Vol. 143. P. 2635–2638.

Полный список использованных источников размещен

 http://innosfera.by/2022/03/waddlia_chondrophila

Статья поступила в редакцию 06.07.2021 г.