

Разработка протокола молекулярного типирования *C. Trachomatis* на основе секвенирования генов *ompA*, *pbpb*, *ct046*, *ct058*, *ct144*, *ct172*

Н.В. Фриго, В.С. Соломка, О.С. Кожушная, М.Р. Рахматулина, К.И. Плахова

Development of the molecular typing protocol for *C. Trachomatis* based on the sequencing of *ompA*, *pbpb*, *ct046*, *ct058*, *ct144*, *ct172* genes

N.V. FRIGO, V.S. SOLOMKA, O.S. KOZHUSHNAYA, M.R. RAKHMATULINA, K.I. PLAKHOVA

об авторах: ►

Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК Минздравсоцразвития России», Москва
 В.С. Соломка — к.б.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК Минздравсоцразвития России», Москва
 О.С. Кожушная — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК Минздравсоцразвития России», Москва
 М.Р. Рахматулина — д.м.н., и.о. заведующего отделом инфекций, передаваемых половым путем, ФГБУ «ГНЦДК Минздравсоцразвития России», Москва
 К.И. Плахова — к.м.н., старший научный сотрудник отдела инфекций, передаваемых половым путем, ФГБУ «ГНЦДК Минздравсоцразвития России», Москва

Статья посвящена разработке и апробации стандартной операционной процедуры «Молекулярное типирование *C. trachomatis* для оценки клональной структуры и степени генетического разнообразия штаммов *C. trachomatis*, циркулирующих на территории Российской Федерации». В результате проведенных исследований по типированию штаммов *C. trachomatis*, полученных из регионов Российской Федерации с использованием 6 генов *C. trachomatis* (*ompA*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* и *pbpB*), была установлена их значительная гетерогенность с преобладанием серотипа E. Однако проведение типирования *C. trachomatis* одновременно по шести генам представляется излишне трудоемким, длительным во времени, трудно интерпретируемым, что определяет необходимость разработки других Протоколов типирования с использованием меньшего числа (не более 2—3 — по аналогии с NG-MAST) значимых генов.

Ключевые слова: *C. trachomatis*, молекулярное типирование, серотип.

The article is devoted to the development and validation of a standard operating procedure entitled «Molecular typing of *C. trachomatis* for assessment of the clonal structure and extent of genetic diversity of *C. trachomatis* strains circulating in the territory of the Russian Federation.» The studies that involved the typing of *C. trachomatis* strains obtained from regions of the Russian Federation with the use of six *C. trachomatis* genes (*ompA*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* and *pbpB*) revealed their significant heterogeneity with the prevalence of the E serotype. However, the typing of *C. trachomatis* for six genes at one time seems to be too time-consuming and long-lasting and is hard to be interpreted, which explains the need to develop other typing protocols using a smaller number of relevant genes (not more than two or three — by analogy with NG-MAST).

Keywords: *C. trachomatis*, molecular typing, serotype.

■ Возбудитель урогенитального хламидиоза *Chlamydia trachomatis* относится к облигатным патогенам и передается от человека к человеку преимущественно половым путем. В течение последних лет в Российской Федерации заболеваемость урогенитальной хламидийной инфекцией вышла на первое место среди всех бактериальных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). В нашей стране сегодня урогенитальный хламидиоз — вторая по распространенности регистрируемая ИППП после трихомониаза [1].

Разработка эффективных мероприятий по снижению уровня заболеваемости урогенитальным хламидиозом должна базироваться на четких представлениях об особенностях эпидемиологии. Одним из основных условий для решения этих вопросов является разработка методологии, позволяющей изучать закономерности распространения инфекций, передаваемых половым путем, с созданием стандартизованных протоколов молекулярного типирования возбудителей ИППП (с дальнейшим анализом полученных данных), основанная на выявлении сходства и различия между штаммами бактерий одного биологического вида, выделенных от различных пациентов, то есть осуществление типирования.

Современные подходы к типированию бактерий основаны на теоретических представлениях об эволюции микроорганизмов и структуре бактериальных популяций. Методы типирования предполагают выявление у бактерий фенотипических или генотипических признаков, по которым внутри бактериальной популяции можно выявить отдельные группы (субпопуляции или клоны). Такие группы могут обладать селективными преимуществами в сравнении с остальной популяцией, вызывать более тяжелые заболевания, обладать устойчивостью к антибактериальным препаратам или другими практически важными свойствами. Типирование бактерий также необходимо для прослеживания путей распространения инфекции как в пределах ограниченных сообществ людей, так и на глобальном уровне.

Общие принципы и технологические подходы к молекулярному типированию различных микроорганизмов во многом сходны. Они основаны на выявлении у микроорганизмов комплекса признаков, наличие или отсутствие которых у отдельного штамма является его уникальной характеристикой. Чем больше одинаковых признаков у двух или более штаммов, тем ближе их генетическое родство. В качестве признаков, характеризующих свойства отдельных штаммов бактерий, используют структуру генов (их первичную нуклеотидную последовательность).

Основным методом типирования *C. trachomatis* до последнего времени являлся метод серотипирования, основанный на выявлении вариантов антигенной структуры основного белка внешней мембраны микроорганизма (*The Major outer membrane protein* — *MOMP*) [2].

Описано 19 сероваров *C. trachomatis*, и установлено, что серотипы А, В и С вызывают трахому, серотипы от D до К — урогенитальный хламидиоз и три серотипа (L1 — L3) — венерическую лимфогранулему; урогенитальный хламидиоз наиболее часто ассоциируется с сероварами D-F [3]. Вместе с тем серотипирование является достаточно трудоемким и длительным процессом, требующим получения чистой культуры хламидий, высокой квалификации персонала и наличия набора моноклональных антител [4—5]. В связи с указанными фактами традиционное серотипирование в настоящее время вытесняется молекулярными методами, основанными на амплификации гена, кодирующего основной белок внешней мембраны и последующем анализе ампликона.

Молекулярные методы типирования *C. trachomatis* к настоящему времени разработаны недостаточно. Шире всего распространен метод типирования, основанный на секвенировании полного гена основного белка внешней мембраны (*omp1*) или его варибельных областей. Данный метод позволяет получить данные о серотипах хламидий, аналогичные данным, получаемым при традиционном серотипировании, однако его разрешающая способность относительно невелика. Как традиционное, так и молекулярное серотипирование не позволит проводить дифференцировку штаммов хламидий, относящихся к одному и тому же серотипу.

Для амплификации ДНК *C. trachomatis* чаще всего используют гнездную ПЦР. Получаемые ампликоны исследуются методами анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, обратной гибридизации [6—7], олигонуклеотидных чипов [8] и секвенирования [9—11]. Сравнительно недавно для типирования *C. trachomatis* был предложен метод гнездной ПЦР в реальном времени, по разрешающей способности не уступавший секвенированию *omp1* гена [12]. Использование некоторых из современных молекулярных методов типирования позволяет получать результаты, идентичные традиционному серотипированию.

Для решения задачи по установлению возможной взаимосвязи между вариантами генотипа хламидий и характером клинического течения заболевания необходимы новые методы типирования *C. trachomatis* с большей разрешающей способностью, чем традиционное серотипирование, и молекулярные методы, основанные на анализе *omp1* гена, которые бы позволили дифференцировать внутри сероваров группы и подгруппы. Диагностическая значимость таких методов очевидна. Выделение типов (или подтипов) хламидий, вызывающих развитие серьезных осложнений, открывает возможность индивидуализации режимов лечения и наблюдения за пациентами, инфицированными такими микроорганизмами.

Наиболее широко распространенным методом, применяемым для молекулярного типирования ря-

да микроорганизмов, является мультилокусное секвенирование (MultiLocus Sequence Typing — MLST). Принцип метода MLST основан на проведении секвенирования и последующего анализа нуклеотидных последовательностей большого числа (от 6 до 16) генов «домашнего хозяйства» микроорганизма. Одними из первых бактерий, к типированию которых был применен метод MLST, были менингококки [13].

При типировании методом MLST *C. trachomatis* [14] в качестве мишеней для типирования были использованы высоковариабельные области: два аннотированных гена (*hctB* и *pbpB*) и три гипотетических гена (*CT058*, *CT144* и *CT172*). Попытки воспроизведения описанного метода MLST в ряде лабораторий оказались неудачными, что, вероятно, связано с неудачным подбором праймеров для амплификации генов и условий реакции. Кроме этого, метод требует выделения хламидий в чистой культуре. Типирование по пяти генам является достаточно дорогостоящим и трудоемким.

Основной целью данной работы явилась разработка протокола молекулярного типирования хламидий, применимого в широкой лабораторной практике, основанного на непосредственном анализе биологического материала, полученного от пациентов (без выделения чистой культуры микроорганизма), характеризующегося высокой разрешающей способностью и производительностью, низкой стоимостью проведения исследований, легкостью интерпретации получаемых результатов, а также повышенной информативностью с точки зрения эпидемиологии и патогенеза урогенитального хламидиоза.

Материалы и методы

Для проведения исследований по молекулярному типированию *C. trachomatis* было использовано 40 образцов биологического материала, полученных от больных с подтвержденной урогенитальной хламидийной инфекцией из различных регионов Российской Федерации. Сбор генетического материала *C. trachomatis* осуществлялся в соответствии с Инструкцией, разработанной сотрудниками ГНЦД, которая была разослана в лечебно-профилактические учреждения дерматовенерологического профиля четырех субъектов Российской Федерации, представлявших три федеральных округа России: Северо-Западный (г. Санкт-Петербург и Архангельск), Приволжский (г. Самара) и Центральный (г. Москва).

В соответствии с Инструкцией по сбору биологического материала от больных урогенитальной хламидийной инфекцией, содержащего *C. trachomatis*, генетический материал *C. trachomatis* получали путем выделения ДНК из клинического материала (соскоб клеток эпителия цервикального канала у женщин и уретры у женщин и у мужчин), полученного от пациентов с подозрением на ИППП, обратившихся на

прием к врачу в лечебно-профилактическое учреждение дерматовенерологического профиля. Наличие в образцах ДНК *C. trachomatis* подтверждалось в субъектах Российской Федерации и в ФГБУ «ГНЦД Росмедтехнологий» путем постановки полимеразной цепной реакции. ПЦР-исследования проводили с использованием набора «ДНК-экспресс» (НПФ «Литех») или «ДНК-сорб-А» (АМ). Наличие ДНК *C. trachomatis* в образце подтверждалось методом ПЦР. Пробирки с надосадочной жидкостью — супернатантом, содержащим ДНК *C. trachomatis*, замораживались и до отправки в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» хранились в условиях низкой температуры (–20, –40, –70 °С).

Транспортировка генетического материала *C. trachomatis* осуществлялась в соответствии со стандартной операционной процедурой «Транспортировка и доставка клинического материала и выделенных культур возбудителя» (СОП № 001/02 ГОН), разработанной ранее сотрудниками ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий». Экспресс-доставка образцов из регионов проводилась курьерской службой «DHL» с соблюдением принципа «холодовой цепи».

Всего для проведения исследований в ГНЦД было получено 40 образцов клинического материала, содержащих ДНК *C. trachomatis*, из 4 субъектов Российской Федерации (табл. 1).

В работе применены следующие методы исследования:

- методы выделения ДНК *C. trachomatis* с использованием коммерческих сертифицированных наборов реагентов;
- компьютерные программы для конструирования праймеров;
- метод полимеразной цепной реакции для идентификации *C. trachomatis* в образцах биологического материала, амплификации фрагментов исследуемых генов, а также для наработки продуктов для секвенирования;
- модифицированный метод Сенгера определения нуклеотидной последовательности генов *C. trachomatis* (*ompA*, *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144* и *CT172*) с использованием набора d-Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) согласно инструкции фирмы-производителя. Анализ результатов реакции секвенирования проводили на приборе ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer с использованием программного обеспечения («Applied Biosystems», США; «Hitachi» Япония) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Восстановление полноразмерных последовательностей анализируемых генов, выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием модулей ContigExpress и AlignX программного пакета «Vector NT® 9.0» (Informax, Inc). Нуклеотидные последовательности генов анализи-

ТАБЛИЦА 1

Количество образцов биологического материала, содержащего *C. trachomatis*, полученных из различных субъектов Российской Федерации

Федеральный округ	Субъект Российской Федерации	Количество полученных изолятов
Северо-Западный ФО	Архангельская область	10
Северо-Западный ФО	Санкт-Петербург	10
Приволжский ФО	Самарская область	10
Центральный ФО	Москва	10

руемых штаммов сравнивали с последовательностями, представленными в базе данных GeneBank с помощью сервиса BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Результаты и обсуждение

Анализ имеющихся источников научной литературы, касающихся методов молекулярного типирования *C. trachomatis*, показал высокую вариабельность генов *C. trachomatis* и принципиальную возможность использования для типирования *C. trachomatis* генов *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* и ряда других, а также гена основного белка внешней мембраны *ompA* этого микроорганизма [15—18].

На основе полученных данных в ГНЦД разработана стандартная операционная процедура «Молекулярное типирование *C. trachomatis* для оценки клональной структуры и степени генетического разнообразия штаммов *C. trachomatis*, циркулирующих на территории Российской Федерации». В качестве генов-кандидатов для молекулярного типирования *C. trachomatis* были отобраны гены: *ompA*, *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144* и *CT172*.

Стандартная операционная процедура предусматривает проведение молекулярного типирования *C. trachomatis* путем секвенирования шести переменных генов *C. trachomatis*: *ompA*, *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172*, где:

- ген *ompA* — ген, кодирующий основной белок наружной мембраны *C. trachomatis*, определяющий серологическую специфичность отдельных штаммов;
- ген *pbpB* — ген, который кодирует пенициллинсвязывающий белок *C. trachomatis*;
- ген *CT046* кодирует гистон подобный белок (*hctB*);
- гены *CT058*, *CT144*, *CT172* — вариабельные гипотетические гены *C. trachomatis*, кодирующие белки микроорганизма с неизвестной функцией.

Стандартная операционная процедура молекулярного типирования *C. trachomatis* включает:

- выделение ДНК микроорганизма непосредственно из образцов биологического материала (соскоб из уретры и шейки матки, влагилица) с оптимизацией условий выделения ДНК *C. trachomatis* с целью по-

лучения большего выхода продуктов реакции; оптимизация условий выделения ДНК *C. trachomatis* из биоматериала достигалась путем изменения времени инкубации биообразца в лизирующем буфере и путем введения в процедуру выделения ДНК этапа встряхивания на вортексе;

- этапы амплификации и секвенирования исследуемых генов *C. trachomatis* (*ompA*, *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144* и *CT172*); нуклеотидные последовательности исследуемых генов были найдены в базе данных GenBank под номером AE001273. Праймеры к фрагментам генов были подобраны с помощью пакета компьютерных программ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) и Primer, Oligo6.

При создании Стандартной операционной процедуры были опытным путем оптимизированы условия полимеразной цепной реакции для амплификации перечисленных выше генов *C. trachomatis* в сравнении с опубликованными, что позволило повысить выход продуктов реакции амплификации и устранить регистрацию неспецифических продуктов реакции. Оптимизация условий амплификации генов *ompA*, *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* заключалась в изменении профиля и количества циклов амплификации (табл. 2) с применением подхода touchdown PCR.

Разработанная Стандартная операционная процедура молекулярного типирования *C. trachomatis* была апробирована на выборке из 40 образцов биологического материала, содержащего ДНК *C. trachomatis*.

Хламидийную ДНК для проведения типирования получали из образцов биологического материала (мазок из цервикального канала или соскоб из уретры), показавшего положительный результат при диагностических исследованиях (в полимеразной цепной реакции) в лабораториях лечебно-профилактических учреждений Москвы, Санкт-Петербурга, Самары и Архангельска, а также использовали полученные из этих регионов образцы ДНК-проб *C. trachomatis* от больных людей (по 10 образцов из каждого региона).

Следует отметить, что некоторые образцы ДНК-проб, полученные из регионов, содержали недостаточное количество ДНК для постановки ПЦР. Это

ТАБЛИЦА 2

 Условия амплификации *ompA*, *pbpB*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* — генов *C. trachomatis* при проведении реакции амплификации

Ген	<i>ompA</i>	<i>CT058</i>	<i>CT144</i>	<i>CT172</i>	<i>pbpB</i>	<i>CT046</i>
Рекомендованные условия	30 циклов	30 циклов	30 циклов	30 циклов	30 циклов	30 циклов
	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.
	65 °C — 30 сек.	68 °C — 30 сек.	68 °C — 30 сек.	65 °C — 30 сек.	65 °C — 30 сек.	68 °C — 30 сек.
	72 °C — 30 сек.	72 °C — 30 сек.	72 °C — 30 сек.	72 °C — 30 сек.	72 °C — 30 сек.	72 °C — 30 сек.
Оптимизация условий амплификации	95 °C — 3 мин.	95 °C — 3 мин.	95 °C — 3 мин.	95 °C — 3 мин.	95 °C — 3 мин.	95 °C — 3 мин.
	5 циклов	5 циклов	5 циклов	5 циклов	5 циклов	5 циклов
	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.
	72 °C — 10 сек.	72 °C — 10 сек.	72 °C — 10 сек.	72 °C — 10 сек.	72 °C — 10 сек.	72 °C — 10 сек.
	72 °C — 30 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.
	5 циклов	5 циклов	5 циклов	5 циклов	5 циклов	5 циклов
	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.
	64 °C — 10 сек.	68 °C — 10 сек.	68 °C — 10 сек.	68 °C — 10 сек.	68 °C — 10 сек.	68 °C — 10 сек.
	72 °C — 30 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.
	30 циклов	30 циклов	30 циклов	30 циклов	30 циклов	30 циклов
	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.	95 °C — 20 сек.
	55 °C — 10 сек.	64 °C — 10 сек.	64 °C — 10 сек.	64 °C — 10 сек.	62 °C — 10 сек.	64 °C — 10 сек.
	72 °C — 30 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.	72 °C — 40 сек.
72 °C — 5 мин.	72 °C — 3 мин.	72 °C — 3 мин.	72 °C — 3 мин.	72 °C — 3 мин.	72 °C — 3 мин.	

могло быть связано либо с недостаточно полным выделением ДНК *C. trachomatis* из биологического материала, либо с неправильной транспортировкой ДНК-проб, связанной, возможно, с нарушением системы холодной цепи и разрушением ДНК *C. trachomatis* во время транспортировки. Из общего числа полученных образцов непригодными для исследований оказались 13 образцов, в том числе 4 образца из Мурманска, 6 из Архангельска и 3 из Санкт-Петербурга.

На первом этапе проведения молекулярного типирования *C. trachomatis* с целью определения генотипов изученных изолятов *C. trachomatis* и определения принадлежности каждого штамма *C. trachomatis* к тому или иному серотипу были использованы нуклеотидные последовательности фрагмента *ompA* гена. Для этого полученные нуклеотидные последовательности изученных штаммов *C. trachomatis* сравнивали с последовательностями генов референсных штаммов хламидий различных серотипов:

- серотип В/TW-5 (номер по GenBank M17342),
- серотип В/ИU-1226 (номер по GenBank AF063208),
- серотип С/TW3 (номер по GenBank M17343),
- серотип D/B-120 (номер по GenBank X62918),
- серотип D/IC-Cal8 (номер по GenBank X62920),
- серотип E/Bour (номер по GenBank X52557),
- серотип F/ICCal3 (номер по GenBank X52080),
- серотип G/UW57 (номер по GenBank AF063199),
- серотип H/Wash (номер по GenBank X16007),
- серотип I/UW-12 (номер по GenBank AF063200),
- серотип Ia/IU-4168 (номер по GenBank AF063201),
- серотип J/UW36 (номер по GenBank AF063202),
- серотип Ja/IU-A795 (номер по GenBank AF063203),
- серотип K/UW31 (номер по GenBank AF063204),

- серотип L1/440 (номер по GenBank M36533),
- серотип L2/434 (номер по GenBank M14738),
- серотип L3/404 (номер по GenBank X55700).

В результате проведенного сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей штаммов *C. trachomatis*, полученных от больных урогенитальным хламидиозом, с референсными последовательностями фрагментов *ompA* гена было установлено, что 4 штамма *C. trachomatis* принадлежали к серотипу D, 2 штамма — к серотипу G, 2 штамма — к серотипу K и преобладающее количество штаммов относилось к серотипу E ($n = 19$).

На следующем этапе молекулярного типирования штаммов *C. trachomatis* была оценена вариабельность *C. trachomatis*, полученных из регионов Российской Федерации, по генам *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172*, *pbpB*. На рисунке 1 представлен результат амплификации фрагментов генома *C. trachomatis* (*CT058*, *CT144*, *CT172* и *CT046*).

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов, полученные в результате секвенирования, сравнивались с референсными последовательностями соответствующих генов. Результаты оценки вариабельности изученных генов суммированы в таблице 3.

Как следует из таблицы 3, среди исследованных штаммов *C. trachomatis* была установлена значительная вариабельность нуклеотидных последовательностей всех изучаемых генов. При этом среди штаммов *C. trachomatis* серотипа D отмечено: 3 генетических варианта гена *ompA*, по 2 варианта генов *CT046*, *CT058* и *CT144* и по одному варианту генов *CT172* и *pbpB*. Среди штаммов *C. trachomatis* серотипа E отмечено: 9 генетических вариантов гена *ompA*, по

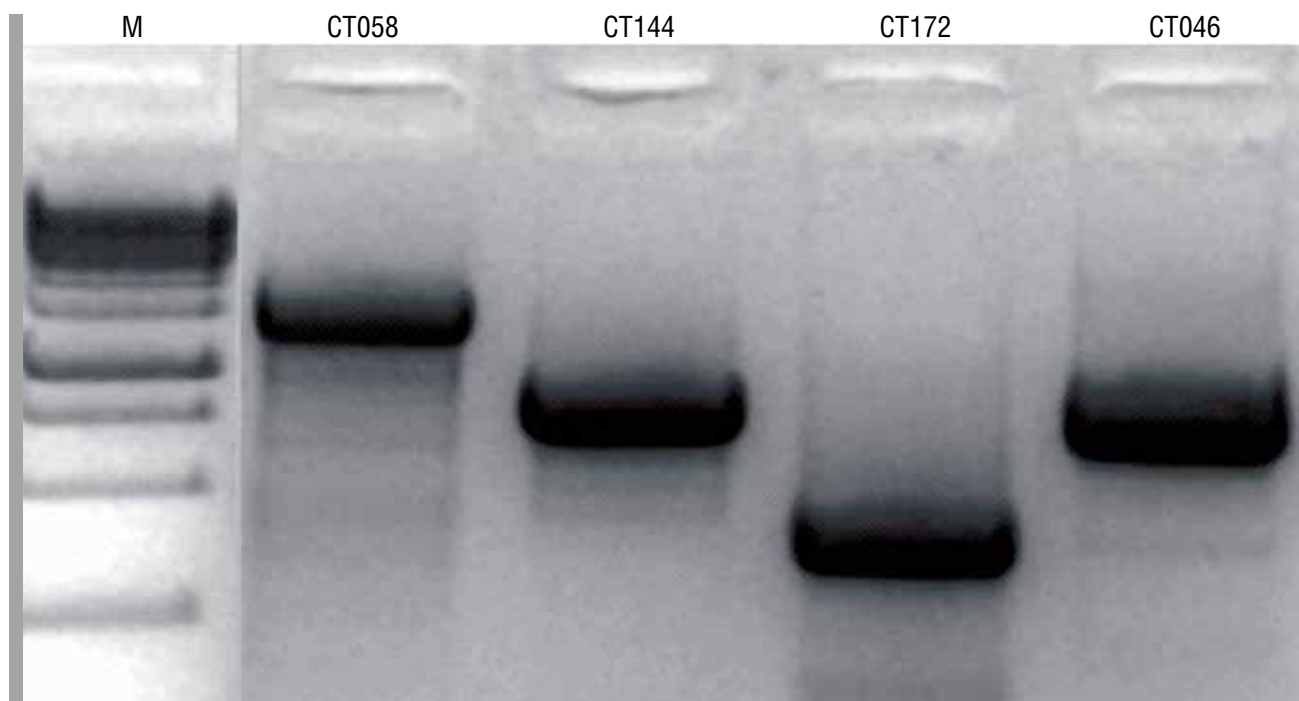


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР — продуктов амплификации фрагментов генома *C. trachomatis*: *CT058*, *CT144*, *CT172* и *CT046* гены размером в 1499, 799, 378 и 700 нуклеотидов соответственно, *M* — маркер молекулярного веса ДНК

5 вариантов генов *CT046* и *CT144* и по 4 варианта остальных генов. Среди штаммов *C. trachomatis* серотипа G отмечено по 1 варианту генов *ompA*, *CT046* и *pbpB* и по 2 варианта остальных генов; среди штаммов *C. trachomatis* серотипа К отмечено по 1 варианту генов *ompA*, *CT144* и *pbpB*, по 2 варианта генов *CT046* и *CT058* и 3 варианта гена *CT172*. Существенных различий в степени вариабельности между представителями отдельных серотипов *C. trachomatis* выявлено не было. Наличие существенной вариабельности выбранных для молекулярного типирования генов *C. trachomatis* свидетельствует о возможности использования генов *ompA*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* и *pbpB* в качестве мишеней для молекулярного типирования *C. trachomatis*. Вместе с тем оценка вариабельности *C. trachomatis* одновременно по 6 генам является довольно трудной для интерпретации

получаемых результатов и длительной во времени, что может явиться предпосылкой для разработки методов типирования *C. trachomatis* с использованием меньшего числа генов (не более 2—3).

Таким образом, в результате исследований по типированию штаммов *C. trachomatis*, полученных из регионов Российской Федерации, с использованием генов *C. trachomatis*: *ompA*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172* и *pbpB* была установлена их значительная гетерогенность с преобладанием серотипа E, а также возможность типирования штаммов *C. trachomatis* с использованием 6 генов (с учетом их значительной вариабельности).

Вместе с тем проведение типирования *C. trachomatis*, получаемых из регионов Российской Федерации, связано с рядом затруднений, обусловленных неразвитой в достаточной мере системой

ТАБЛИЦА 3

Вариабельность исследованных генов *C. trachomatis* (*ompA*, *CT046*, *CT058*, *CT144*, *CT172*, *pbpB*) при проведении молекулярного типирования

Серотип (количество штаммов <i>C. trachomatis</i>)	Количество вариантов генов					
	<i>ompA</i>	<i>CT046</i>	<i>CT058</i>	<i>CT144</i>	<i>CT172</i>	<i>pbpB</i>
D (n = 4)	3	2	2	2	1	1
E (n = 19)	9	5	4	5	4	4
G (n = 2)	1	1	2	2	2	1
K (n = 2)	1	2	2	1	3	1

выделения ДНК из образцов и системой доставки образцов биологического материала, содержащего *C. trachomatis*. Кроме того, проведение типирования *C. trachomatis* одновременно по шести генам представляется излишне трудоемким, длительным во времени, трудно интерпретируемым, что определяет необходимость разработки других протоколов типирования с использованием меньшего числа (не более 2—3 — по аналогии с NG-MAST) значимых генов.

Основными направлениями дальнейших исследований клональной структуры *C. trachomatis* должны быть совершенствование методов амплификации хламидийной ДНК непосредственно из образцов биологического материала, сравнительная оценка вариабельности широкого круга генов — потенциальных мишеней молекулярного для типирования в образцах микроорганизма, выделенных в различных регионах, и разработка метода типирования. ■

Литература

1. Заболеваемость, ресурсы и деятельность дерматовенерологических учреждений в 2008 году (статистические материалы). Москва: Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Департамент развития медицинской помощи и организации здравоохранения ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения», 2009.
2. Stothard D. R. Use of a reverse dot blot procedure to identify the presence of multiple serovars in *Chlamydia trachomatis* urogenital infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2655—2659.
3. Spaargaren J., Verhaest I., Mooi J.S. et al. Analysis of *Chlamydia trachomatis*. Serovar distribution changes in the Netherlands (1986—2002). *Sex Transm Infect* 2004; 80: 151—152.
4. Wang S.P., Kuo C.C., Barnes R.C. et al. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985; 152: 791—800.
5. Osserwarde J.M., Rieffe M. De Vries., Derksen-Navrocki R.P. et al. Comparison of two panels of monoclonal antibodies for determination of *Chlamydia trachomatis* serovars. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2968—2974.
6. Stothard D.R. Use of a reverse dot blot procedure to identify the presence of multiple serovars in *Chlamydia trachomatis* urogenital infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2655—2659.
7. Xiong L., Kong F., Zhou H., Gilbert G.L. Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1413—1418.
8. Zheng H.P., Jiang L.F., Fang D.Y. et al. Application of an oligonucleotide array assay for rapid detecting and genotyping of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 1—6.
9. Bandea C.I., Kubota K., Brown T.M. et al. Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (*omp1*). *Sex Transm Infect* 2001; 77: 419—422.
10. Klint M., Lofdahl M., Ek C. et al. Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4066—4071.
11. Stothard D.R., Boguslawski G., Jones R.B. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect Immun* 1998; 66: 3618—3625.
12. Jalal H., Stephen H., Alexander S. et al. Development of real-time PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2649—2653.
13. Feavers I.M., Gray S.J., Urwin R. et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3883—3887.
14. Klint M., Fuxelius H.H., Goldkuhl R.R. et al. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1410—1414.
15. Zhang Y., Tao J., Zhou M. et al. Elongation factor Ts of *C. trachomatis*: structure of the gene and properties of the protein. *Arch Biochem Biophys* 1997; 344: 43—52.
16. Gomes J.P., Nunes A., Bruno W.J. et al. Polymorphisms in the Nine Polymorphic Membrane Proteins of *C. trachomatis* across All Serovars: Evidence for Serovar Da recombination and Correlation with Tissue Tropism. *J Bacteriol* 2006; 188: 1: 275—286.
17. Klint M., Fuxelius H.H., Goldkuhl R.R. et al. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1410—1414.
18. Pannekoek Y., Morelli G., Kusecek B. et al. Multilocus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. *BMC Microbiol* 2008; 8: 42.