

**Рубаник Л. В.**  
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
г. Минск, Беларусь

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Заболеваемость урогенитальной хламидийной инфекцией (УГХИ) в Республике Беларусь находится на втором месте после заболеваемости урогенитальным трихомонозом, составив 60,3 случаев на 100 тыс. населения в 2016 г. [1]. При этом именно инфекции, передаваемые половым путем, в том числе УГХИ, признаны основной предотвратимой причиной грозных заболеваний человека, таких как бесплодие и реактивный артрит. Своевременная и эффективная индикация и идентификация патогена является чрезвычайно важной. В то же время только благодаря типированию *C. trachomatis* возможно получение информации о молекулярно-биологических свойствах циркулирующих штаммов возбудителя и совершенствование лабораторной диагностики и контроля за урогенитальной хламидийной инфекцией. В ряде стран мира (Швеции, Нидерландах, Финляндии, Великобритании, США, Германии и др.) проведены молекулярно-эпидемиологические исследования и дана детальная характеристика эндемичных штаммов *C. trachomatis*, усовершенствованы диагностические ПЦР тест-системы, позволяющие выявлять всё генетическое разнообразие патогена. Генотипический пейзаж циркулирующих в Республике Беларусь штаммов *C. trachomatis* остается до настоящего времени недостаточно изученным. Неизвестно идентичны ли они выявляемым в других странах и референс штаммам возбудителя.

**Цель** данной работы — провести молекулярное типирование выделенных клинических штаммов *C. trachomatis* и проанализировать их генотипический пейзаж.

**Материалы и методы.** Исследованы мазки-соскобы из уретры и цервикального канала, полученные от 429 пациентов с различными воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Возраст пациентов варьировал от 16 до 65 лет, соотношение мужчин и женщин 1 : 2,5.

Выделение ДНК из мазков-соскобов осуществляли с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» согласно инструкции производителя. Выявление ДНК хламидий проводили с помощью ПЦР набора «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis-FL*» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Для определения генотипа возбудителя вначале образцы, содержащие геномную ДНК *C. trachomatis* амплифицировали в отношении участка, содержащего фрагменты переменных доменов (VDI-VDIV) *ompA* гена, кодирующего главный белок наружной мембраны. Далее ПЦР-ампликоны очищали и подвергали секвенированию с использованием пар праймеров: P1/OMP2, P1/CT6R, NL-F/NL-R, CT6F/OMP2 [2]. Затем данные о нуклеотидной последовательности *ompA* гена обрабатывались с помощью нуклеотид-нуклеотид BLAST поисковой

системы (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному генотипу возбудителя. Нуклеотидные последовательности *ompA* генов стандартных штаммов всех 19 генотипов (A-L3) были получены из базы данных GenBank. Филогенетический анализ осуществляли с использованием алгоритма *neighbor-joining* посредством программы MEGA6 [3].

**Результаты и обсуждение.** Из 429 проб ПЦР положительными в отношении *orf3* фрагмента плазмидной ДНК *S. trachomatis* были 34 (7,93 %), *ompA* ген идентифицирован в 28 (6,53 %) пробах.

Генотипирование возбудителя удалось осуществить в 27 из 28 (96,43 %) пробах. В виду низкой экспрессии *ompA* гена нетипированным оказался 1 (3,57 %) клинический штамм. Дифференциация штаммов *S. trachomatis* по серогруппам показала следующее распределение: группа В — 51,85 %, группа I — 25,93 %, группа С — 22,22 %. Среди выявленных генотипов возбудителя в порядке убывания были идентифицированы: Е (25,93 %), G и J (по 18,52 % соответственно), В (14,81 %), D (11,11 %), F (7,41 %), К (3,70 %). При этом моногенотипный вариант отмечен в 22 из 27 (81,48 %) образцов, а наличие одновременно нескольких генотипов патогена в одном образце (микстинфекция) обнаружено в 5 (18,52 %) пробах с преобладанием микста генотипов Е+D.

При филогенетической реконструкции, выделенные клинические штаммы *S. trachomatis*, относящиеся к генотипу Е, образовывали общий кластер с референс штаммом E-Boag и штаммами, циркулирующими как в странах Европы (Швеция, Дания, Великобритания, Португалия, Нидерланды), США, так и в странах СНГ (Россия, Украина). Вместе с тем штамм E-385/Zhodino/Belarus/2017 на дендрограмме располагался отдельно, что свидетельствует о необходимости его дополнительного молекулярно-биологического изучения, включая другие маркерные гены. Штамм G-449/Zhodino/Belarus/2017, относящийся к генотипу G, кластеризовался обособленно от штаммов, выделенных как в европейских странах (Дании, Швеции и др.), так и ранее изолированных нами на территории нашей страны (G-1181/Minsk/Belarus/2012 и G-220/Minsk/Belarus/2013). Три выделенные штамма, относящиеся к генотипу J, на филогенетическом древе образовывали общий кластер, не только с таковыми циркулирующими в других странах (Швеция, США), но и с выделенным в 2012 г. и депонированным нами в Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека штаммом J-57/Minsk/Belarus/2012. В отличие от них штамм J-330/Zhodino/Belarus/2017 формировал на дендрограмме отдельную ветвь, что требует дальнейшего изучения как его происхождения, так и масштабы распространения на территории Республики Беларусь. Примечательно, что так же как и другими исследователями, из урогенитального тракта были идентифицированы 4 штамма трахома-ассоциированного генотипа В [4–6]. При этом два из них В-866/Minsk/Belarus/2011 и В-867/Minsk/Belarus/2011 имели 100 % гомологию с последовательностью *ompA* гена бесплазмидного штамма В/Alpha-95. Среди идентифицированных штаммов, относящихся к генотипу D, у двух имела место 95 % гомология с последовательностью референс штамма D/B185 и у одного отмечалась 94 % соответствие штамму

D/B120. Выделенные 2 штамма, относящиеся к генотипу F, группировались на филогенетическом дереве в один кластер вместе со стандартным штаммом F-IC-Cal3 и штаммами, циркулирующими в Европе и России. Единственный идентифицированный штамм K-242/Zhodino/Belarus/2017 имел 95 % гомологию с референс штаммом K/UW-31 и образовывал один монофилетический кластер со штаммами циркулирующими в других регионах мира.

По результатам работы впервые последовательности фрагмента *ompA* гена выделенных на территории Республики Беларусь штаммов *C. trachomatis* представлены в Международную базу данных GenBank (MG545269–MG545285, MG733342–MG733347).

**Выводы.** Полученные в данном исследовании результаты распространенности *C. trachomatis* (7,93 % при детекции фрагмента *orf3* и 6,53 % *ompA* гена) согласуются с данными по Европейскому региону, где этот показатель варьирует от 5 % до 10 %. Генотипический пейзаж проанализированных клинических штаммов *C. trachomatis* характеризуется доминированием генотипа E, что соответствует общемировым данным о его преимущественной экспансии. Большинство изученных клинических штаммов на 94–100 % сходны с референс и штаммами, регистрируемыми в странах Европы, США, СНГ. Отличием белорусской популяции является более частое, по сравнению с другими европейскими странами, выделение из урогенитального тракта генотипов B и G.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Здравоохранение* в Республике Беларусь : офиц. стат. сб. за 2016 г. Минск : ГУ РНМБ, 2017. 277 с.
2. *Characterization of Chlamydia trachomatis omp1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden* / Jurstrand [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. Vol. 39, № 11. P. 3915–3919.
3. *Tamura, K. MEGA6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0* / K. Tamura // *Molecular biology and evolution*. 2013, Т. 30, № 12. С. 2725–2729.
4. *Lister, N. A. C. trachomatis serovars causing urogenital infections in women in Melbourne, Australia* / N. A. Lister, C. K. Faightley // *J. Clin. Microbiol.* 2005. Vol. 43. P. 2546–2547.
5. *Phylogenetic analysis of Chlamydia trachomatis Tarp and correlation with clinical phenotype* / E. I. Lutter [et al.] // *Infect. Immun.* 2010. Vol.78 (9). P. 3678–3688.
6. *Chlamydia trachomatis genovar distribution in clinical urogenital specimens from Tunisian patients : high prevalence of C. trachomatis genovar E and mixed infection* / H. Gharsallah [et al.] // *BMC Infect. Dis.* 2012. Vol.12. P. 333–340.