

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* МЕТОДОМ ДВУХРАУНДОВОЙ ПЦР

Капустин Ю.М., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.,
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии,
Беларусь, Минск

Разработан и впервые применен на территории Республики Беларусь метод двухраундовой ПЦР для генотипирования Chlamydia trachomatis. Предлагаемый метод основан на последовательном использовании группоспецифичных, а затем внутригрупповых праймеров. С помощью этого метода установлено преобладание генотипов E, F и G, а также идентифицированы случаи микст-генотипного варианта инфекции.

Применение более простого и удобного метода генотипирования Chlamydia trachomatis, основанного на двухраундовой ПЦР, представляет возможность его использования в большинстве лабораторий, осуществляющих диагностику урогенитальной хламидийной инфекции. Это позволит наряду с диагностикой определить доминирующие генотипы возбудителя, их патогенетическую значимость и повысить эффективность осуществления молекулярно-эпидемиологического мониторинга за урогенитальной хламидийной инфекцией в стране. Полученная информация будет использована при создании диагностических тест-систем и препаратов для иммунопрофилактики с учетом преобладающих в стране генотипов возбудителя.

Ключевые слова: генотипирование, *Chlamydia trachomatis*; ПЦР.

GENOTYPING OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS BY DUALRAUND PCR METHOD

Kapustina J.M., Rubani L.V., Poleshchuk N. N.
Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology
Belarus, Minsk

The method of double-round PCR for the genotyping of Chlamydia trachomatis was developed and first applied on the territory of the Republic of Belarus. The proposed method is based on the sequential use of group-specific, and then intragroup primers. Using this method, the prevalence of genotypes E, F, and G has been established, and cases of mixed-genotypic infection have been identified.

The use of a simpler and more convenient method of genotyping Chlamydia trachomatis, based on two-round PCR, makes it possible to use it in most laboratories that diagnose urogenital chlamydial infection. This will allow, along with diagnostics, to determine the dominant genotypes of the pathogen, their

pathogenetic significance and to increase the efficiency of molecular and epidemiological monitoring of urogenital chlamydial infection in the country. The obtained information will be used to create diagnostic test systems and preparations for immunoprophylaxis, taking into account the pathogen genotypes prevailing in the country.

Key words: *genotyping; Chlamydia trachomatis; PCR.*

Вид *Chlamydia trachomatis* имеет большое клиническое и эпидемиологическое значение. Возбудитель способен поражать не только урогенитальный тракт и органы зрения, но и десиминировать в организме вызывая заболевания других органов и систем человека.

C. trachomatis представлен тремя биоварами, каждый из которых включает в себя несколько генотипов. Разделение на биовары основано на типе инфекции, ее локализации (тканевой тропизм) и вирулентности: первый биовар, включает в себя генотипы А-С, вызывающие трахому (основная причина предотвратимой слепоты во всем мире и эндемичной трахомы во многих развивающихся странах), второй биовар – генотипы D-К, вызывающие генитальные инфекции (основная причина бактериальных ИППП в мире), и третий – генотипы L1-L3, определяющие развитие хламидийной венерической лимфогранулемы (LGV).

Во многих странах мира для эпидемиологических исследований успешно применяется типирование хламидий на основании изучения вариабельности гена *ompA*, благодаря возможности получения данных о мутационных изменениях в гене. Метод позволяет получать информацию не только о распределении генотипов *C. trachomatis* среди разных популяций и/или выборок, но и способен идентифицировать микст-генотипный вариант хламидийной инфекции при помощи дополнительных реакций амплификации и секвенирования. В настоящее время среди большого числа методов, позволяющих определить генотип *C. trachomatis* в Республике Беларусь применяется только секвенирование гена *ompA*. Однако, их количество ограничено ввиду трудоемкости и высокой стоимости.

Нами разработан метод генотипирования, основанный на применении двухраундовой ПЦР с использованием группоспецифичных и типоспецифических праймеров, комплементарных участкам гена *ompA*. Он не требует дорогостоящего оборудования и значительно сокращает время исследования, имея при этом высокую сопоставимость результатов с секвенированием. Кроме того, с использованием данного метода, основанного на использовании двухраундовой ПЦР, становится возможным обнаружение микст-генотипного варианта хламидийной инфекции уже в результате проведения амплификаций без дополнительных этапов анализа.

Цель работы – провести генотипирование изолятов *C. trachomatis*, выделенных на территории Республики Беларусь, с помощью разработанного метода двухраундовой ПЦР.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовали 138 проб, полученные в период с 2017-2018 гг. от лиц с лабораторно подтвержденным диагнозом хламидийные болезни, передающиеся половым путем (согласно МКБ-10, А56) и содержащие ДНК *C. trachomatis*. Генотипирование проводили в два раунда с использованием праймеров, комплементарных участкам гена *ompA* *C. trachomatis*. В первом раунде амплификации использовали группоспецифичные праймеры (В группа – F-5'-GCTTAGATCAATCTGTTGTTGA-3', R-5'-TCTAGGCTTATGGATAGTAAAC-3'; С группа – F-5'-AACTTAGTTGGATTATTCGGAA-3', R-5'-TCTGTATAAAGCTCAACCA-3'; промежуточная группа – F-5'-CTGTGGTGGAACTGTATACA-3', R-5'-TGCCACTCATGGTAATCAA-3') для определения принадлежности к одной из трех геногрупп. Во втором раунде проводили внутригрупповое типирование типоспецифичными праймерами с определением генотипа (группа В: генотип Е – F-5'-ACACAGATACTGCSTTCTCTTG-3', R-5'-CTTGCTTGCCACTCATGGTAAT-3', генотип В – F-5'-AGCCGAGACTATCTTTGATGTT-3', R-5'-TCTGCGSTAGTTTTACATCG-3', генотип D/Da – F-5'-GTGCAGTCCATCCACTCT-3', R-5'-ACGCTCCACGCAAAAGTAGT-3'; группа С: генотип С – F-5'-AAGGAAGTGTGGTCTCTGCCG-3', R-5'-AATTATACAAATTAAGAACC-3', генотип J – F-5'-ATCTTTTTTCCSTAACACTGCT-3', R-5'-TTAGGTTTAGATTGAGCAT-3', генотип Ja – F-5'-TACTGTCAGCGATGTAGCAG-3', R-5'-TCCCAGATATTTAATGCCAT-3', генотип H – F-5'-ATCTTCTGATTTTAATACAGC-3', R-5'-ACTTTAGGTTTAGATTGAGCA-3', генотип А – F-5'-AACACAATCTTCTGGCTTTGAT-3', R-5'-TGATTCAAAGCAGTGTTAGGA-3', генотип К – F-5'-TGTTCCSTAACACTGCTTTGGA-3', R-5'-AGGTTTAGATTGAGCATATTGG-3'; промежуточная группа: генотип F – F- 5'-ACGAAACCTGCTGCAGATA-3', R-5'-TTGCCACTCATGGTAATCA-3', генотип G – F-5'-AGTGTAGTCGCAGСТААС-3', R-5'-ACTGТААСТGCGTATTTG-3'). Условия амплификации: 95 °С – 5 мин (1 цикл), 95 °С – 30 сек, 49-62 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек (35 циклов), 72 °С – 5 мин (1 цикл). Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Результаты интерпретировали путем соответствия размера амплифицированного фрагмента, характерного для каждой группы и генотипа *C. trachomatis*, маркеру молекулярной массы.

Результаты и обсуждение Исследовано 138 образцов биологического материала пациентов, из которых 19 (13,77%) поступило от пациентов из Гродненской области, 15 (10,87%) – из Могилевской области, 16 (11,59%) - из Гомельской области, 24 (17,39%) – из Брестской области, 21 (15,22%) – из Витебской области, 18 (13,04%) – из Минской области и 25 (18,12%) – из Минска (рис. 1).

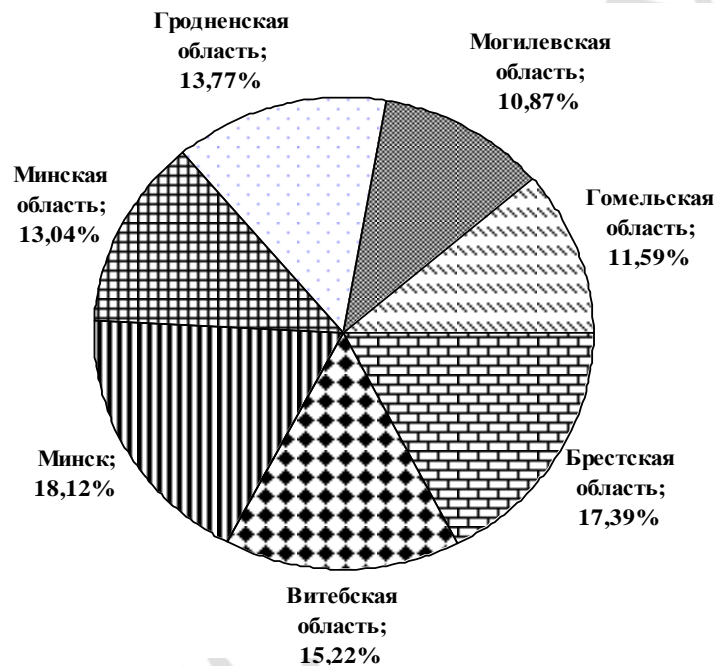


Рисунок 1. Распределение поступивших проб по областям Республики Беларусь

Анализ половозрастной структуры показал, что среди общего количества поступивших на исследование проб, 105 (76 %) получены от обследуемых женского пола, а 33 (24 %) - от мужского. Возраст пациентов варьировал от 17 до 47 лет (27 ± 5 лет). Согласно клинико-anamnestическим данным, хламидийная инфекция у 84 (60,86%) пациентов обнаружена в ходе профилактического обследования, у 49 (35,50%) женщин хламидиоз выявлен при беременности, у 2 (1,45%) пациентов обследование на хламидиоз связано с эрозией шейки матки, у 1 (0,72%) – в связи с сочетанной гонококковой инфекцией, у 1 (0,72%) – с уретритом, и у 1 (0,72%) – с сальпингитом.

Использование генотипирования *S. trachomatis* методом двухраундовой ПЦР позволило установить, как моно-, так и микст-генотипный вариант хламидийной инфекции. В целом, отмечалось преобладание моно-генотипного варианта хламидийной инфекции (81,9%, n=113) над микст-генотипным (18,1 %, n=25). При этом чаще всего встречалась комбинация генотипов E+F (56%, n=14), J+K (12%, n=3), E+G (12%, n=3). По причине определения в 25 образцах двух и более генотипов, их общее количество в 138 образцах составило 162.

Таким образом, в Республике Беларусь, среди всех исследованных проб биологического материала отмечается доминирование генотипов Е (41,36%, n=67), F (24,07%, n=39) и G (19,14%, n=31) *S. trachomatis* (рис. 2).

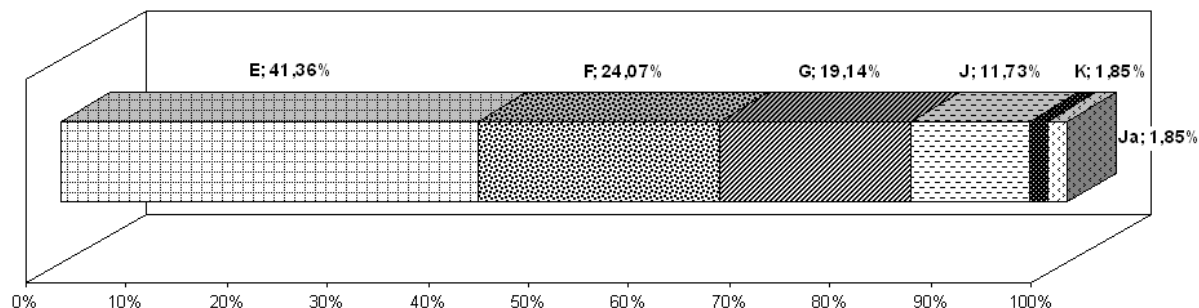


Рисунок 2. Генотипическое разнообразие *S. trachomatis* в Республике Беларусь

Среди материала из Гродненской области отмечено преобладание Е (47,37%, n=9) и J (21,05%, n=4) генотипов, из Могилевской - G (33,33%, n=5) и J (33,33%, n=5). В Гомельской и Брестской областях, а также в г. Минске встречаются преимущественно генотипы Е (38,75%, n=11; 37,50%, n=9; 68,00%, n=17 соответственно) и F (18,75%, n=3; 33,33%, n=8; 56,00%, n=14 соответственно), в Минской области – G (55,56%, n=10) и F (33,33%, n=6). Реже всего встречаются генотипы К (Минская область – 11,11%, n=2 и Гродненская область – 5,26%, n=1) и Ja (Минская область – 11,11%, n=2 и Могилевская область – 6,67%, n=1) (рис. 3).

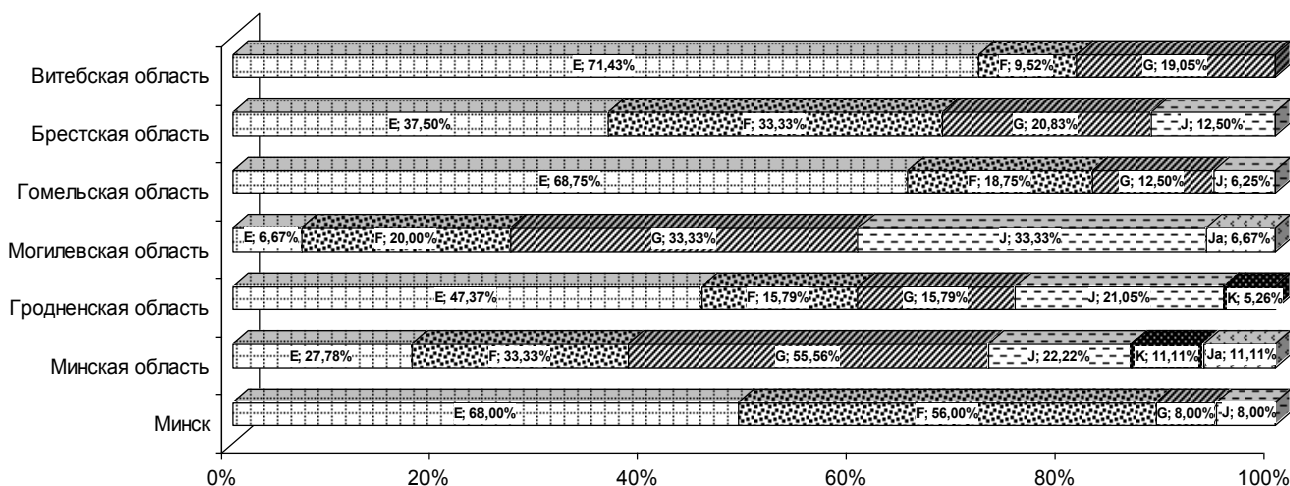


Рисунок 3. Региональный генотипический пейзаж *S. trachomatis* в Республике Беларусь

Полученные нами данные во многом согласуются с результатами зарубежных исследователей о преобладающих и наиболее распространенных генотипах в разных странах мира [2, 4, 5, 6, 7, 8]. Следует отметить, что в Республике Беларусь ранее определение генотипа хламидий проводилось только при помощи секвенирования гена *ompA*. Так, Полуян О.С. и др. в 2009

году опубликованы результаты применения метода гнездовой ПЦР с использованием комбинаций трех пар праймеров к гену *ompA* (P1/CT6R, CT6F/OMP2, NLF/NLR). Полученные данные свидетельствуют о распространенности серотипов D (65,00%), K (50,00%), E (38,30%) *C. trachomatis* среди 60 исследованных образцов, полученных от пациенток с воспалительными процессами урогенитального тракта. Также установлено преобладание моно-генотипного статуса над микст-генотипным вариантом инфекции [3]. Позже, в 2013 году, при использовании аналогичного подхода генотипирования *C. trachomatis* Асташонком А.Н., были идентифицированы генотип D (51,22%), генотип K (31,72%), генотип G (7,31%), генотип B (7,31%) и генотип J (2,44%) в пробах, полученных от 41 пациента с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта [1].

По результатам проведенных нами исследований отмечается иной генотипический пейзаж *C. trachomatis*. Это может быть обусловлено разным контингентом обследуемых, объемом выборки и временными характеристиками, что в конечном итоге повлияло на полученное распределение доминирующих генотипов возбудителя.

Важно отметить, что генотипирование методом двухраундовой ПЦР позволяет без существенных затруднений обнаруживать микс-генотипный вариант хламидийной инфекции. В то же время метод является менее материало- и времязатратным, по сравнению с секвенированием гена *ompA*. Согласно расчетным данным, стоимость 1 исследования методом секвенирования составляет 26 бел. руб., и получение результата возможно через 2-3 дня. Генотипирование 1 образца методом двухраундовой ПЦР возможно провести за 1-1,5 дня и общая стоимость анализа примерно в 3 раза меньше (9 бел. руб). Кроме того, предлагаемый метод не требует дорогостоящего оборудования, такого как нано-спектрофотометр и секвенатор, специализированных программных комплексов и специально обученного персонала для работы с ним. Все это влияет на сокращение времени исследования, характеризуясь при этом высокой сопоставимостью результатов с секвенированием (90,9%).

Среди 138 образцов биологического материала, поступивших из областей Республики Беларусь при помощи разработанного метода двухраундовой ПЦР для генотипирования *Chlamydia trachomatis* установлено доминирование генотипов E (41,36%, n=67), F (24,07%, n=39) и G (19,14%, n=31). Выявлено преобладание моно-генотипного варианта хламидийной инфекции (81,9%, n=113) над микст-генотипным (18,1 %, n=25). При этом чаще всего встречалась комбинация генотипов E+F (56%, n=14), J+K (12%, n=3), E+G (12%, n=3).

Широкое внедрение предлагаемого метода позволит проводить идентификацию генотипа *C. trachomatis* и осуществлять молекулярно-эпидемиологический мониторинг за урогенитальной хламидийной инфекцией в стране. Полученная информация будет использоваться для разработки

диагностических тест-систем и создания препаратов для иммунопрофилактики и терапии хламидиоза.

Список литературы

1. Асташонок, А.Н. Фено- и генотипическая характеристика *Chlamydia trachomatis* и детекция возбудителя с использованием флуоресцентных иммуномагнитных наночастиц: дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / А.Н. Асташонок. – М., 2016. – 123 с.

2. Литовченко, О.А. Генотипирование *Chlamydia trachomatis*, выявленных в образцах, полученных у больных с урогенитальной патологией в северо-восточном регионе Украины / О.А. Литовченко // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. – Т. 4. – С. 314-315.

3. Полуян, О.С. Изучение распределения различных серотипов *C. trachomatis* и молекулярно-биологических свойств возбудителей / О.С. Полуян [и др.]. // Медицинские новости. – 2009. – № 8. – С. 82-86.

4. Charsallah, H. Comparison of reverse hybridization and *ompA* sequencing methods applied on *Chlamydia trachomatis* strains from Tunisia [Electronic resource] / H. Charsallah [et al.] // Microbiology open. – 2018. – Vol. 7, №2. Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.549> – Date of access: 20.02.2019.

5. Feodorova, .A. Urogenital *Chlamydia trachomatis* multilocus sequence types and genovar distribution in chlamydia infected patients in a multi-ethnic region of Saratov, Russia [Electronic resource] / V.A. Feodorova [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, №4. – 2018. – Mode of access: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195386>. – Date of access: 25.03.2019.

6. Fieser, N. *Chlamydia trachomatis* prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany / N. Fieser [et al.] // Infection. – 2013. – Vol. 41, №1. – P. 159-166.

7. Pineiro, L. Minimum spread of the new Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* and distribution of *C.trachomatis ompA* genotypes in three geographically distant areas of Spain, 2011-2012 / L. Pineiro [et al.] // Infection. – 2014. – Vol. 42, №5. – P. 905-912.

8. Psarrakos, P. *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes in male patients with urethritis in Greece: conservation of the serovar distribution and evidence for mixed infections with *Chlamydophila abortus* / P. Psarracos [et al.] // Molecular and cellular probes. – 2011. – Vol. 25, №4. – P.168-173.