

... ГЕНЕТИКА ... GENETICS ...

УДК: 616.98:579.882.11:616-056.7

Превалирующие генотипы *Chlamydia trachomatis* у больных урогенитальным хламидиозом Харьковской области О.А.Белозорова

ГУ «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины» (Харьков, Украина)
olya_abe@yahoo.com

С помощью рестриктоного анализа проведено генотипирование *Chlamydia trachomatis*, выявленных в 68 клинических образцах, полученных у больных с урогенитальной патологией в Харьковской области. Было обнаружено, что в украинской популяции превалируют генотипы E, F и G, обнаруженные соответственно в 23,5%, 29,4% и 19,1% случаев. Генотип B был выявлен в 14,7% случаев, остальные генотипы встречались значительно реже: I и K – в 4,4%, J – в 2,94%, а D и H – в 1,47% случаев. Полученные результаты сравниваются с данными литературы о частоте встречаемости генотипов *C. trachomatis* в других странах.

Ключевые слова: генотипы *Chlamydia trachomatis*, урогенитальный хламидиоз, полимеразная цепная реакция, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Превалюючі генотипи *Chlamydia trachomatis* у хворих з урогенітальним хламідіозом у Харківській області О.А.Білозорова

За допомогою рестриктоного аналізу проведено генотипування *Chlamydia trachomatis*, виявлених у 68 клінічних зразках, отриманих у хворих з урогенітальною патологією в Харківській області. Було визначено, що в українській популяції превалюють генотипи E, F і G, виявлені відповідно в 23,5%, 29,4% і 19,1% випадків. Генотип B був виявлений у 14,7% випадків, інші генотипи зустрічалися значно рідше: I і K – у 4,4%, J – у 2,94%, а D і H – у 1,47% випадків. Отримані результати порівнюються з даними літератури про частоти розподілу генотипів *Chlamydia trachomatis* в інших країнах.

Ключові слова: генотипи *Chlamydia trachomatis*, урогенітальний хламідіоз, полімеразна ланцюгова реакція, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів.

Prevalent genotypes of *Chlamydia trachomatis* in patients with urogenital chlamydiosis in Kharkiv region O.A.Bilozorova

The genotype distribution of *Chlamydia trachomatis* in patients with urogenital pathology in Kharkiv region of Ukraine was investigated with aid of restriction analysis. The most prevalent genotypes were E, F and G, detected in 23,5%, 29,4% and 19,1%. Genotype B was found in 14,7% of patients, other genotypes were found relatively rare: I and K in 4,4%, J – in 2,94%, D and H – in 1,47% of all cases. Obtained frequencies were compared with literature data on *Chlamydia trachomatis* genotypes distribution in different countries.

Key words: genotypes of *Chlamydia trachomatis*, urogenital chlamydiosis, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism.

Введение

Заболевания, связанные с инфекцией *Chlamydia trachomatis*, имеют значительную распространенность. Ежегодно во всем мире фиксируется 90 миллионов новых случаев заражения. В Украине различные виды хламидиозов также относятся к числу наиболее распространенных инфекционных заболеваний (Мавров, 2002, 2006).

Вид *C. trachomatis* характеризуется значительным полиморфизмом. На основе антигенных свойств были выделены 19 серотипов, отличающихся по своим биологическим свойствам, культуральным характеристикам, распространенности и вызываемым заболеваниями. Серотипы A, B, Ba и C являются возбудителями трахомы, серовары с D до K – вызывают урогенитальные инфекции, а L1–L3 – относятся к возбудителям паховой лимфогранулемы.

Определение серотипа возбудителя представляет большой интерес с точки зрения эпидемиологии. Это дает возможности проследить цепочку передачи инфекции. Важным представляется выявление возможной связи серотипа с клиническими проявлениями заболевания.

Определение серотипов традиционно проводится методом иммунофлюоресценции с использованием специфических моноклональных антител к главному белку внешней мембраны различных серотипов *C. trachomatis* (Banda et al., 2001). В последние годы типирование хламидий стало более доступным в связи с разработкой молекулярно-генетических методов. Определяемые при этом генотипы соответствуют выявляемым с помощью антител серотипам.

Наиболее распространенный метод генотипирования *C. trachomatis* основан на определении полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДФ) гена *omp1*, который кодирует главный белок внешней мембраны (МОР).

Ген *omp1* состоит из четырех доменов, переменные фрагменты которых кодируют выступающие на поверхности клетки части МОР и во многом определяют антигенные особенности хламидий. Однонуклеотидные замены в этих областях различны у разных генотипов *C. trachomatis* (Lysen et al., 2004).

Задачей настоящего исследования послужила характеристика генотипов хламидий, относящихся к виду *C. trachomatis*, обнаруживаемых в клинических образцах, полученных у больных уrogenітальним хламідіозом в Северо-восточном регионе Украины (Харьковской области).

Объекты и методы исследования

Клинические образцы (соскобы из уретры и цервикса, моча) были получены от 68 больных (жители Харьковской области) с уrogenітальной патологией (уретрит, эндоцервицит). Из них 35 мужчин (51,4%) возрастом от 22 до 56 лет, и 33 (48,5%) женщины, возраст от 25 до 43 лет. ДНК из клинических образцов выделяли с помощью протеиназы К по Sachse (Sachse, Holzel, 2002) или гуанидиновым методом тест-системами фирмы «Литех». Наличие ДНК *C. trachomatis* в образцах было выявлено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на фрагмент гена 16S РНК или криптокислотной плазмиды.

Определение генотипа *C. trachomatis*, выявленных в клинических образцах, проводили модифицированным методом Jurstrand et al. (2001). Для амплификации гена *omp1* длиной 1100 пар нуклеотидов использовали праймеры: прямой 5'-ATGAAAAAАСТСТTGAААТСGG-3' и обратный 5'-АСТGТААСТGСGТАТТТGТСТG-3' при следующем режиме температур: денатурация 95°C 30 секунд, отжиг 55°C 30 секунд и синтез 72°C 1 минута 30 секунд, количество циклов – 35. В связи с незначительным количеством ДНК в образце и сложностью амплификации длинного фрагмента ДНК для получения ампликона в большинстве случаев необходимо было проводить второй раунд амплификации по методике гнездовой ПЦР с внутренними праймерами 5'-ТССТTGCAAGСТСТGССТGTGG-3' и 5'-САAGMTТТТСТАGAYТТТСАТYТТGТТ-3' при таких же режимах амплификации. Объем реакционной смеси одной пробы составлял 25 мкл, использовали амплификатор «Терцик» («ДНК-технология», Россия) и реагенты фирмы Fermentas (Литва). Полученные после ПЦР образцы анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% геле агарозы с 0,001% бромидом этидиума (Sambrook, Russell, 2001). Ампликоны выявляли визуально на трансиллюминаторе («Биоком», Россия) при длине волны возбуждающего света 310 нм.

Полученные ампликоны подвергали действию рестриктаз AluI и, в случае необходимости, HpyF3I (Fermentas, Литва), Hinf I (Takara, Япония) и CfoI (Sigma, США) при температуре 37°C в течение ночи, после чего образованные фрагменты разделяли методом вертикального электрофореза в 10% полиакриламидном геле в камере фирмы Fisherbrand (Англия). После завершения электрофореза гель инкубировали 20 минут в трис-боратном буфере, содержащем 1% бромидом этидиума для окраски фрагментов ДНК, и анализировали на трансиллюминаторе. Оценку результатов проводили путем сравнения фрагментов ампликонов после рестрикции, разделенных в электрическом поле, с маркерами молекулярного веса (Sigma, США), образцы которых разделяли электрофорезом одновременно с исследуемыми образцами.

Результаты и обсуждение

Пример электрофореграммы фрагментов ампликонов гена *omp1* различных генотипов *C. trachomatis* в 10% полиакриламидном геле, представленный на рис. 1, свидетельствует о том, что у различных генотипов существуют значительные отличия в спектре полос. Каждый из генотипов характеризуется определенным специфическим для него набором фрагментов ДНК, образуемых при действии специфических рестриктаз.

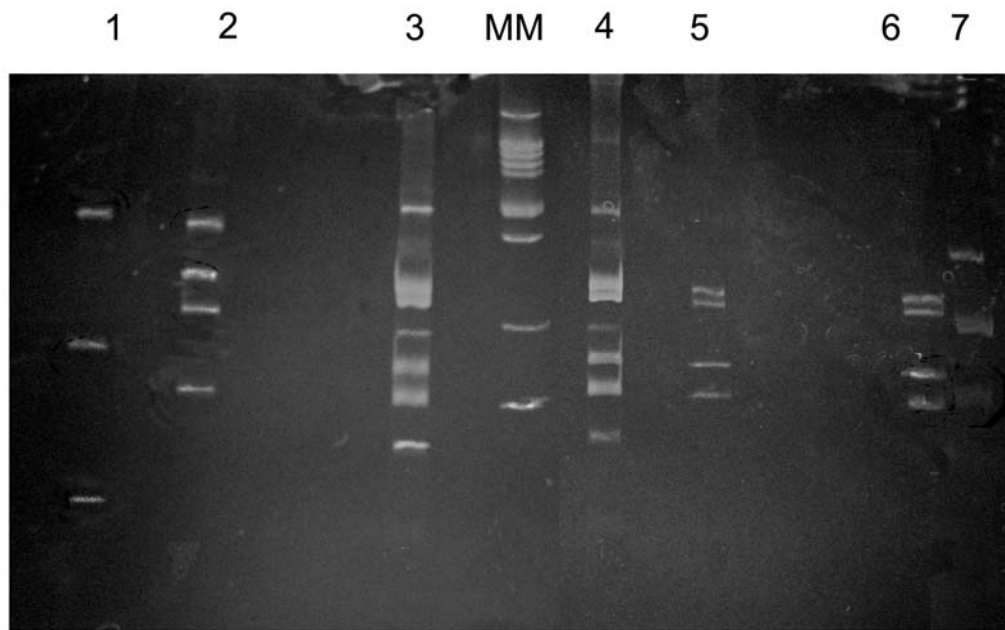


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов эндонуклеазного расщепления ампликонов гена *omp1* *C. trachomatis* рестриктазой AluI

Примечание: трек 1 – генотип K; трек 2 – генотип F; трек 3 – генотип G; MM – лестница молекулярного веса с разницей фрагментов 100 пар нуклеотидов; трек 4 – генотип G; трек 5 – генотип B; трек 6 – генотип B; трек 7 – генотип K.

В связи с тем, что в литературе отсутствует полное перечисление размеров фрагментов, получаемых при действии рестриктаз на ген *omp1*, из базы данных НЦБИ США были получены депонированные там последовательности гена *omp1* различных генотипов, после чего на сайте фирмы «Rebase» (<http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html>) с помощью опции «Theoretical digests with all REBASE prototypes» были получены длины фрагментов, образующихся при расщеплении последовательностей, характерных для различных генотипов, используемыми рестриктазами. Полученные результаты использовали для идентификации генотипов *C. trachomatis*, обнаруженных в клинических образцах.

Выявленные в ходе исследования генотипы *C. trachomatis* распределялись следующим образом. Чаще всего обнаруживались генотипы F (n=20; 29,4%), E (n=16; 23,5%), G (n=13; 19,1%), общая доля этих преобладающих в популяции генотипов *C. trachomatis* составила 72% от всех выявленных образцов. Промежуточное положение занимал генотип B (n=10; 14,7%), остальные генотипы встречались сравнительно редко. Так, генотип I был обнаружен в 3 случаях (4,4%), генотип K – в 3 случаях (4,4%), генотип J – в 2 случаях (2,94%), а генотипы D и H в одном случае каждый (по 1,47%).

Для сравнительного анализа полученные нами результаты и данные литературы о распределении генотипов *C. trachomatis* в различных странах были приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, для Швеции, Голландии, Камеруна и Коста-Рики характерно преобладание *C. trachomatis* с генотипами E и F. Генотип D *C. trachomatis* наиболее характерен для таких стран, как Голландия, Индия, Тайланд, Коста-Рика, Испания. Отличием украинской популяции является то, что значительно чаще, чем в других регионах, были выявлены генотипы B и G.

В настоящее время недостаточно понятны причины различия частоты встречаемости различных генотипов *C. trachomatis* в различных странах, вместе с этим, имеются данные о значительной стабильности этого показателя. Так, в Амстердаме повторные определения распределения генотипов штаммов хламидий через 20 лет показали, что этот показатель практически не изменился (Spaargaren et al., 2004).

Полученные результаты позволяют более полно охарактеризовать возбудителей урогенитального хламидиоза в нашем регионе, что может иметь значение для изучения его эпидемиологии и возможного влияния генотипов на клинику заболевания. В частности, установлено,

что серовары G, I и D ассоциированы с развитием рака шейки матки, а серовар K – с бесплодием (Jialin Yu et al., 2009). К сожалению, большая часть случаев урогенитального хламидиоза протекает скрыто, с незначительной симптоматикой, что затрудняет установления связи между генотипом возбудителя и клиническими особенностям вызываемого ими заболевания.

Таблица 1.

Распределение генотипов *C. trachomatis* в различных странах (%)

Страна	Генотипы <i>C. trachomatis</i>								
	B	D	E	F	G	H	I	J	K
Украина, Харьковская обл.	14,7*	1,47*	23,5*	29,4*	19,1*	1,47*	4,4*	2,94*	4,4*
Швеция (Lysen et al., 2004)	1,3	8,84	38,9	16,3	11,3	2,3	1	7	8,55
Голландия (Quint et al., 2007)	1,2	20,1	30,4	20,5	0,8	3,5	15	3,7	
Индия (Singh et al., 2003)		48	34	12				6	
Тайланд (Banda et al., 2001)	3,7	22,6	9,3	25	2,3	11,7	3,7	4,5	11,7
Камерун (Ngandnijo et al., 2003)		8,6	40	20	14,3			5,7	
Коста-Рика (Porras et al., 2008)		20,4	30,1	20,6	<1		15		
Испания (Piñeiro et al., 2009)	0,6	15,3	45,7	9,6	10,2	1,9	7,6	7,6	1,3

Примечание: * – результаты собственных исследований.

Полученные данные могут в дальнейшем использоваться для разработки диагностических систем и препаратов для иммунопрофилактики и терапии, учитывающих спектр наиболее распространенных у нас генотипов хламидий и их антигенные особенности. Это кажется особенно важным в свете данных литературы о преобладающем значении варибельных антигенных детерминант возбудителя для формирования иммунитета.

Список литературы

- Мавров Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. – К., 2006. – 524с.
- Мавров И.И. Половые болезни. – М.: АСТ-Пресс Книга, 2002. – 786с.
- Banda 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*) // Sexually Transmitted Infections. – 2001. – Vol.77. – P. 419–422.
- Jialin Yu, Shixiao Wu, Fang Li, Linyah Hu Vertical transmission of *Chlamydia trachomatis* in Chongqing China // Curr. microbial. – 2009. – Vol.58. – P. 315–320.
- Justrand M., Falk L., Fredlund H. et al. Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 Genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden // J. Clin. Microbiol. 2001. – Vol.39, №11. – P. 3915–3919.
- Lysen M., Österlund A., Rubin C. et al. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish Country // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol.42, №4. – P. 1641–1647.
- Ngandnijo A., Clere M., Foncoua M.C. et al. Screening of volunteer students in Yaounde (Cameroon, Africa) for *Chlamydia trachomatis* infection and genotyping of isolated *Chlamydia trachomatis* strains // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol.41, №9. – P. 4404–4407.
- Piñeiro L., Montes M., Gil-Setas A. et al. Genotipado de *Chlamydia trachomatis* en un area del norte de España // Enfermedades infecciosas y microbiología clinica. – 2009. – Vol.27, №8. – P. 462–464.
- Porras C., Safaeian M., González P. et al. Epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young women in Costa Rica // Sexually Transmitted Diseases. – 2008. – Vol.35, №5. – P. 461–468.

Quint K., Porras C., Safaeian M. et al. Evaluation of a novel PCR-based assay for detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical specimens // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol.45, №12. – P. 3986–3991.

Sachse K., Holzel H. Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR // In: Methods in molecular biology. Vol.216: PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols / Ed. by K.Sachse and J.Frey. – Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002. – P. 123–136.

Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual, the third edition. – Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. – 2222p.

Singh V., Salhan S., Das B.C., Mittal A. Predominance of *Chlamydia trachomatis* serovars associated with urogenital infections in females in New Delhi, India // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol.41, №6. – P. 2700–2702.

Spaargaren J., Verhaest I., Mooij S. Analysis of *Chlamydia trachomatis* serovar distribution changes in the Netherlands (1986–2002) // Sex. Transm. Infect. – 2004. – Vol.80. – P. 154–156.

Представлено: Г.К.Кондаковою / Presented by: G.K.Kondakova

Рекомендовано до друку: А.В.Некрасовою / Recommended for publishing by: A.V.Nekrasova

Подано до редакції / Received: 28.12.2009.

© О.А.Білозорова, 2010

© O.A.Bilozorova, 2010