

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 579.61
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-112-124>

Поступила в редакцию 06.03.2018
Received 06.03.2018

Ю. М. Капустина, Л. В. Рубаник

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Аннотация. Проведен обзор литературных данных о молекулярно-генетических методах генотипирования *Chlamydia trachomatis* и оценена возможность их практического использования. Информация, полученная в результате применения этих методов, является основой для эволюционного анализа и эпидемиологического мониторинга за циркуляцией возбудителя, а также для разработки целенаправленной профилактики, создания вакцины, повышения эффективности противохламидийного лечения.

Ключевые слова: уrogenитальный хламидиоз, генотипическое разнообразие, молекулярно-генетическая идентификация

Для цитирования: Капустина, Ю. М. Современные подходы к генотипированию *Chlamydia trachomatis* / Ю. М. Капустина, Л. В. Рубаник // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 112–124. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-112-124>

Yu. M. Kapustina, L. V. Rubanik

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

MODERN APPROACHES TO STUDYING AND GENOTYPING *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Abstract. A descriptive review is provided of the various molecular *Chlamydia trachomatis* typing methods and the estimation of possibility of their practical use has been evaluated. The information obtained as a result of the application of these methods is the basis for the evolutionary analysis and epidemiological monitoring of the circulation of the pathogen, contributes to the development of targeted prevention, the creation of a vaccine, and the effectiveness of antichlamydia treatment.

Keywords: urogenital chlamydia infection, genetic diversity, molecular genetic identification

For citation: Kapustina Yu. M., Rubanik L. V. Modern approaches to studying and genotyping *Chlamydia trachomatis*. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 112–124 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-112-124>

Введение. *Chlamydia trachomatis*, являясь одним из самых распространенных бактериальных возбудителей уrogenитальных инфекций в мире, наносит огромный экономический и демографический ущерб обществу. По некоторым данным, из всех инфекций, передаваемых половым путем, на долю хламидиоза приходится от 40 до 50 % [1].

Вид *C. trachomatis* в настоящее время включает в себя 14 серотипов и 7 подтипов, отличающихся по своим биологическим свойствам, культуральным характеристикам, распространенности и вызываемым заболеваниями. Серотипы от А до С (включая подтип Ва) являются возбудителями трахомы, серовары от D до К (включая подтипы Da, Ga, Ia, Ja) вызывают уrogenитальные

инфекции, а L1–L3 (включая подтипы L2a, L2b) относятся к возбудителям паховой лимфогранулемы [2, 3]. При этом традиционно на протяжении многих лет серотипы определяли с помощью иммунотипирования с использованием поли- или моноклональных антител к главному белку наружной мембраны (Major Outer Membrane Protein, МОМР) [4]. Первая работа по применению моноклональных антител для типирования *C. trachomatis* была опубликована в 1982 г. [5]. В 1985 г. S. P. Wang и С. С. Kuo [6] усовершенствовали ранее предложенную методику за счет создания двухступенчатой системы серотипирования, которая позволила дополнительно выявить подтипы Da, Ia и L2a, а также упростить дифференцировку между сероварами, вызывающими лимфогранулему (L1 и L3), и сероварами, вызывающими урогенитальные инфекции (E и F). Однако серотипирование – достаточно трудоемкий метод, предполагающий многократное пассирование в культуре клеток и последующее использование большого количества моноклональных антител, поэтому в настоящее время он применяется все реже [7]. Кроме того, благодаря бурному развитию молекулярной биологии генотипирование практически вытеснило серотипирование.

С конца 1980-х годов начались масштабные молекулярные исследования в области определения нуклеотидной структуры гена *ompA* *C. trachomatis*. Внимание к данному гену было обусловлено тем, что именно он кодирует основной структурный и наиболее иммуногенный МОМР белок, индуцирующий развитие иммунного ответа в организме человека. В 1989 г. исследователи из Национального института аллергии и инфекционных заболеваний Гамильтона (США) опубликовали работу, в которой впервые описана методика типирования *C. trachomatis* при помощи определения нуклеотидной последовательности гена *ompA*. Эта схема позволила первоначально генотипировать только 14 серотипов и 1 подтип возбудителя [8]. В ходе дальнейших исследований были использованы технологии для генотипирования 14 серотипов и 5 подтипов – А, В/Ва, С, D/Da, Е, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K, L1, L2/L2a и L3 [9–11]. Также с помощью методов молекулярного типирования в 2012 г. были получены данные о методе идентификации двух ранее нетипированных подтипов – Ja и L2b [12].

Определение нуклеотидной структуры гена *ompA* важно для создания эффективной вакцины против *C. trachomatis* [13]. Кроме того, молекулярная характеристика и типирование возбудителя широко используются для разработки новых методов генодиагностики, что обусловлено возникновением различных изменений нуклеотидной структуры его генома и появлением рекомбинантных форм. Только генотипирование дает возможность определить генотипическое разнообразие циркулирующих штаммов патогена, изучить особенности тканевого тропизма генотипов и их взаимосвязь с клиническими проявлениями заболевания. Именно молекулярно-эпидемиологические данные позволяют установить цепочки передачи возбудителя, группы повышенного риска, дифференцировать реинфицирование от случаев неэффективного лечения [2].

Цель настоящей работы – характеристика различных методов генотипирования *C. trachomatis* и анализ мирового опыта их применения.

В настоящее время к числу методов, позволяющих определить генотип *C. trachomatis*, относятся секвенирование гена *ompA*, метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена *ompA*, анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), ПЦР со случайными праймерами (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD), многолокусный анализ варибельного числа tandemных повторов (MLVA), мультилокусное сиквенс-типирование (MLST), а также методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот и полногеномное секвенирование. Рассмотрим каждый из этих методов в отдельности.

Генотипирование *C. trachomatis* на основании секвенирования гена *ompA* осуществляется при помощи ПЦР-амплификации с использованием праймеров, гомологичных участкам последовательности данного гена, и последующим секвенированием продуктов реакции.

Ген *ompA* имеет протяженность около 1200 п. н., содержит в своем составе 4 варибельных (VD I–IV) и 5 константных (CS 1–5) доменов (рис. 1).

Для секвенирования используются праймеры, охватывающие как всю последовательность гена (1 пара праймеров, одностадийная ПЦР), так и праймеры, амплифицирующие отдельные

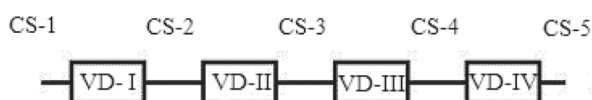


Рис. 1. Схема доменной организации гена *ompA* *C. trachomatis*
 Fig. 1. Scheme domain organization of the *ompA* gene *C. trachomatis*

участки гена, которые впоследствии перекрываются и составляют общую последовательность (3 пары праймеров, гнездовая ПЦР) [2]. Поиск гомологичных последовательностей осуществляется с помощью базы данных GenBank и программы Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для последующего компьютерного анализа последовательностей (множественного выравнивания, определения генетических расстояний, филогенетической реконструкции, установления достоверности топологии) используют программу MEGA (Molecular Evolutionary genetics analysis). Генетические расстояния между последовательностями определяют с помощью двухпараметрической модели эволюции Kimura. Реконструкцию филогенетических древ выполняют на основании полученных эволюционных расстояний с помощью алгоритма neighbor-joining, встроенного в MEGA. Достоверность топологии филограм оценивают методом псевдореплик (анализируют не менее 1000). Вывод о принадлежности анализируемой последовательности к определенному генотипу делают на основании ее встраивания в общий кластер с максимально гомологичными последовательностями, при этом значения бутстреппинга в узлах должны составлять не менее 90 %, что свидетельствует о статистической достоверности топологии.

Использование метода секвенирования *ompA* гена *C. trachomatis* позволяет обнаружить не только незначительные изменения, такие как однонуклеотидные замены, вставки или делеции в исследуемой последовательности гена, но и определить присутствие рекомбинационных изменений [3, 14].

С помощью метода гнездовой ПЦР с использованием комбинаций трех пар праймеров (P1/ST6R, ST6F/OMP2, NLF/NLR) белорусскими исследователями О. С. Полуян с соавт. [15] получены данные о распространенности серотипов *C. trachomatis* (см. таблицу), а также о преобладании моно-серотипного статуса над микст-серотипным вариантом инфекции среди пациентов с воспалительными процессами урогенитального тракта. При использовании аналогичного подхода генотипирования А. Н. Асташонком [16] впервые в Беларуси были идентифицированы В, G, J генотипы *C. trachomatis*.

В Греции в 2011 г. посредством секвенирования гена *ompA* в пробах из урогенитального тракта человека обнаружены уникальный вариант генотипа D/Er6 *C. trachomatis* (GenBank: X77364.2), а также возбудитель хламидиоза животных *Chlamydophila abortus* [21]. В Германии и Испании в 2013–2014 гг. с использованием этого метода выявлен новый мутантный «шведский» вариант *C. trachomatis* (new variant *C. trachomatis*, nvCT) [22, 23].

К основным недостаткам метода относят то, что ген *ompA* представлен одной копией на бактериальную клетку, что составляет 0,1 % от всего генома хламидий, а также то, что он наиболее подвержен давлению со стороны иммунной системы хозяина и рекомбинационным процессам. Кроме того, для получения информации о присутствии в одной биологической пробе нескольких генотипов *C. trachomatis* (например, при микст-серотипной хламидийной инфекции), необходимо проведение нескольких дополнительных реакций амплификации и секвенирования, что значительно увеличивает продолжительность анализа и объем необходимых реактивов [3].

Со временем для повышения разрешающей способности генотипирования и улучшения качества и количества информации, необходимой для молекулярной эпидемиологии, были разработаны методы генотипирования с использованием анализа множества локусов в геноме *C. trachomatis*. Это позволило расширить данные о генетической структуре популяции патогена и определить связь между генотипом и клиническими проявлениями заболевания [3].

Мультилокусный анализ переменного числа тандемных повторов (Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis, MLVA) дает возможность осуществлять генотипирование на основе амплификации тандемных повторов, а также гена *ompA*. Метод позволяет

Используемые методы генотипирования *Chlamydia trachomatis* в ряде стран ЕвропыThe methods used for genotyping *Chlamydia trachomatis* in some European countries

Автор, год	Страна	Генотипы	Метод генотипирования	К-во и вид исследованных образцов
О. С. Полуян с соавт., 2009 [15]	Беларусь	D (65 %), K (50 %), E (38,3 %)	Секвенирование <i>ompA</i>	60 (мазки-соскобы из УГТ)
А. Н. Асташонок, 2016 [16]	Беларусь	D (51,22 %), K (31,72 %), В и G (по 7,31 %), J (2,44 %)	Секвенирование <i>ompA</i>	41 (мазки-соскобы из УГТ)
В. В. Слободенюк с соавт., 2009 [17]	Россия	K (46,2 %), G (23,1 %), E (19,2 %), F (7,7 %), J (3,8 %)	ПДРФ <i>ompA</i>	26 (мазки-соскобы из УГТ)
В. Смелов с соавт., 2009 [18]	Россия	E (33,1 %), G/Ga (24,7 %), J (9,6 %), D/Da и F (по 8,4 %), K (7,8 %), B (4,8 %), H (3 %)	ДНК-зонды	179 (мазки-соскобы из УГТ)
О. А. Белозорова, 2010 [2]	Украина	F (29,4 %), E (23,5 %), G (19,1 %), B (14,7 %), I и K (по 4,4 %), J (2,94 %), D и H (по 1,47 %)	ПДРФ <i>ompA</i>	68 (мазки-соскобы из УГТ)
О. А. Литовченко, 2011 [4]	Украина	E (24,02 %), G (23,46 %), F (21,23 %), B (10,61 %), I (5,59 %), Ba и K (по 3,91 %), D (2,8 %), J и H (по 2,23 %)	ПДРФ <i>ompA</i>	179 (мазки-соскобы из УГТ)
B. Verdtteeg с соавт., 2015 [19]	Нидерланды	E (40,5 %), F (20,7 %), D (12,3 %)	MLST	439 (мазки-соскобы из УГТ)
L. Christerson с соавт., 2012 [20]	Швеция	G (37 %), D (27 %), J (18 %), E (7 %), F (5 %)	MLST	67 (ректальные мазки и моча)
P. Psarrakos с соавт., 2011 [21]	Греция	F (12,28 %), E (12,28 %), D (9,21 %), G (4,9 %), B и K (по 2,5 %), H и I (по 1,2 %)	Секвенирование <i>ompA</i>	51 (мазки-соскобы из УГТ и моча)
N. Fieser с соавт., 2013 [22]	Германия	E (46,5 %), F (20,9 %), K (14,0 %)	Секвенирование <i>ompA</i>	Н/д
L. Pineiro с соавт., 2014 [23]	Испания	E (41 %), D (19 %), F (13 %), G (11 %), J (7 %)	Секвенирование <i>ompA</i>	565 (мазки-соскобы из УГТ и моча)
P. Stefanelli с соавт., 2015 [24]	Италия	E (70 %)	MLST	40 (мазки-соскобы из УГТ и моча)
F. X. Weill с соавт., 2010 [25]	Франция	E (34,3 %), F (23,9 %), Da (13,4 %), I (9 %), Ia (7,5 %)	ПДРФ <i>ompA</i>	102 (мазки-соскобы из УГТ и моча)

Примечание. ПДРФ – полиморфизм длины рестриционных фрагментов, MLST – мультилокусное секвенирование, УГТ – урогенитальный тракт, Н/д – нет данных.

определить количество tandemных повторов на locus благодаря праймерам, комплементарным высококонсервативным последовательностям, фланкирующим повторы. При использовании MLVA важным является тщательная и неоднократная проверка высокоизменчивых локусов VNTR, выбранных для MLVA, что означает необходимость пассирования возбудителя и повторное типирование. Эти результаты могут использоваться для эпидемиологического анализа только после подтверждения стабильного наследования исследуемых локусов [26].

На первом этапе MLVA-анализа проводят ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами, а затем определяют размер ампликонов методом капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе. Подбор специфичных праймеров для определенного штамма *C. trachomatis* осуществляют на основании информации о количестве и расположении интересующих локусов VNTR (variable number tandem repeats) стандартных штаммов, представленной в открытой базе данных The Microorganisms Tandem Repeats Database (<http://minisatellites-rec.igmors.u-psud.fr/GPMS/>) [27]. Дальнейший анализ и расчет числа повторов ампликона производят исходя из размера фрагмен-

та и его фланкирующей области, числа нуклеотидов в повторе по сравнению с вычисленными для референсных штаммов *C. trachomatis*. Затем рассчитывают показатель полиморфизма VNTR с использованием дискриминационного индекса Hunter-Gaston (HGDI). Полученные данные в виде целых чисел объединяют в строку, и такая комбинация, обозначающая количество повторов для каждого локуса, является индивидуальным аллельным профилем штамма (MLVA-профиль). Биоинформационный анализ результатов MLVA-типирования осуществляют с применением программных комплексов типа Bionumerics v 6.01, благодаря которым визуализируются филогенетические отношения полученного MLVA-профиля и других изолятов и штаммов конкретного генотипа *C. trachomatis* [27].

Первые результаты о применении MLVA-анализа для *C. trachomatis* были опубликованы L. N. Pedersen и др. в 2008 г., согласно которым для типирования использовались ген *ompA* и три высоковариабельных тандемных повтора – CT1291, CT1299 и CT1335 [3]. Данная методика получила название MLVA-3.

Наиболее распространенная модификация MLVA-анализа для идентификации *C. trachomatis* является MLVA-5. Этот метод основан на определении пяти локусов VNTR – CT046 (*htcB*), CT456 (*tarp*), CT-719, CT868, CT872 (*pmrH*) – с помощью мультиплексной ПЦР и капиллярного электрофореза. Сравнительный анализ результатов MLVA-5 метода и трех других методов молекулярного типирования (секвенирование гена *ompA*, мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) и MLVA-3) показал его наивысшую разрешающую способность [27].

В исследовании Л. Н. Икриянниковой с соавт. [28] MLVA-метод имел дискриминационный индекс выше, чем MLST-5, MLST-7 и *ompA*-генотипирование (0,96 против 0,95; 0,81 и 0,82 соответственно). Также было показано, что MLVA может применяться для типирования клинических образцов, содержащих одновременно несколько генотипов возбудителя.

Мультилокусное сиквенс-типирование (Multi Locus Sequence Typing, MLST) основано на установлении нуклеотидной последовательности небольших фрагментов (около 500 п. н.) генов «домашнего хозяйства», которые образуют генетический профиль организма и являются необходимыми для осуществления реакций основного метаболизма. Последовательности, характерные для каждого штамма *C. trachomatis*, представлены в базе данных MLST университета Уппсала (<http://mlstdb.bmc.uu.se>) и используются как эталонные при анализе результатов, полученных в ходе эксперимента.

Известны три схемы MLST, которые с успехом применяются с 2007 г. В двух системах типирования анализу подвергаются 7 генов домашнего хозяйства для определения общей популяционной структуры целого семейства хламидий [26]. Медленно эволюционирующие гены «домашнего хозяйства» являются генетически стабильными за счет обеспечения поддержания жизнедеятельности клеток. Поэтому MLST является наиболее подходящим инструментом для эволюционных исследований [3]. Третья схема для генотипирования, предложенная M. Klint с соавт. [7], основана на анализе точечных мутаций в 5 высоковариабельных генах (*hctB*, *CT058*, *CT144*, *CT172* и *pbpB*). Этот подход успешно используется и для идентификации «шведского» варианта *C. trachomatis* [26, 29].

Более того, MLST позволяет детализировать механизм патогенеза, антибиотикорезистентности и клеточного тропизма, а также подходит для глобальных эпидемиологических исследований [7].

MLVA- и MLST-методы показывают достаточно высокую дискриминационную способность, особенно при совместном использовании. Недостатком этих методов является то, что обе методики базируются на однораундовой ПЦР, однако эту ситуацию можно улучшить, адаптировав методы к гнездовой ПЦР, как показано в работе R. G. Vom с соавт. [30]. Это позволило исключить возможные ошибки секвенирования при анализе участков длиной более 1500 п. н. Другим существенным недостатком методов является обязательное применение секвенирования, что влечет за собой сложности генотипирования при инфицировании более чем одним генотипом *C. trachomatis* из-за наложения пиков на секвенограмме [3].

Метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, или Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) гена *ompA* используют чаще всего для опре-

деления генотипической принадлежности. К преимуществам данного метода, как и метода секвенирования, относится возможность определения генотипа непосредственно в клиническом образце, без предварительного пассирования в культуре клеток [4]. В основе этого подхода лежит гнездовая ПЦР-амплификация с двумя парами специфических праймеров, последующая обработка полученных ампликонов рестриктазами, разделение продуктов реакции с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле и визуализация на трансиллюминаторе [2]. Использование гнездовой ПЦР позволяет исследовать пробы с низкой бактериальной нагрузкой, что имеет большое преимущество по сравнению с обычным секвенированием гена *ompA* [3].

Каждый из генотипов характеризуется определенным специфическим для него набором фрагментов ДНК, которые образуются в результате действия специфических рестриктаз. При проведении ПДРФ-анализа *S. trachomatis* чаще всего используют рестриктазы AluI, HpyF31, HinfI, CfoI, Dde [2, 31]. Для характеристики спектра фрагментов, получаемых при расщеплении ампликонов гена *ompA* различных генотипов *S. trachomatis* рестриктазами, проводится моделирование данного процесса. Для этого необходимо получить нуклеотидные последовательности гена *ompA* всех известных генотипов возбудителя на сайте Национального центра биотехнологической информации США в базе данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), выделить фрагменты последовательности, соответствующие размеру ампликона, а затем на сайте фирмы Rebase (<http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html>) с помощью опции Theoretical digests with all REBASE prototypes получить размеры фрагментов, образующихся при действии рестриктаз [2].

Метод нашел широкое применение за счет простоты использования и высокой степени сопоставимости с другими результатами генотипирования. Вместе с тем данный метод не дает полной картины изменчивости, происходящей во всем геноме *S. trachomatis*, что важно для получения более детальной характеристики возбудителя [3].

ПЦР со случайными праймерами (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) – вариант ПЦР со случайной амплификацией неизвестного участка генома. Затравкой для синтеза ПЦР-фрагментов на ДНК-матрице является один короткий праймер (длиной менее 10 п. н.) с низкой температурой отжига (около 40 °С), что в процессе ПЦР приводит к образованию множества фрагментов, длина которых зависит от распределения вдоль ДНК места посадки праймеров, расположенных напротив друг друга [32]. На основании образующихся профилей полос при электрофоретической детекции в агарозном геле делают вывод о принадлежности исследуемого образца ДНК *S. trachomatis* к определенному генотипу. Эффективность RAPD зависит от правильности выбора локуса. Преимуществами этого метода является отсутствие общих профилей для штаммов различных видов хламидий и возможность работы с ДНК неизвестной последовательности. RAPD является альтернативной процедурой молекулярно-генетического исследования возбудителя [31, 32]. На сегодняшний день этот метод не находит широкого применения в исследованиях по генотипированию *S. trachomatis*, что обусловлено возможным образованием идентичных полос на электрофореграмме ампликонов штаммов разных серотипов, а следовательно, и расхождением с результатами серотипирования [31].

Анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) является комбинацией ПДРФ и ПЦР. Для целей AFLP генотипирования также используются эндонуклеазы, которые необходимы на первом этапе для рестрикции геномной ДНК. Затем рестрикты лигируются с адапторами, содержащими «липкие» концы, комплементарные праймеру, после чего следуют две последовательные ПЦР-амплификации: преамплификация для синтеза большого количества копий рестрицированных фрагментов ДНК и селективная (избирательная) ПЦР-амплификация (рис. 2).

Разделение фрагментов ДНК выполняется в полиакриламидном геле при проведении обычного или автоматического электрофореза с радиоактивной или флуоресцентной меткой. Чувствительность автоматической детекции ПЦР-продуктов, техники FAFLP (Fluorescent AFLP) очень высока и позволяет разделить фрагменты с разницей в 1 п. о. Компьютерный анализ числа и размера образующихся фрагментов ДНК дает возможность реконструировать их филогенетические связи [32].

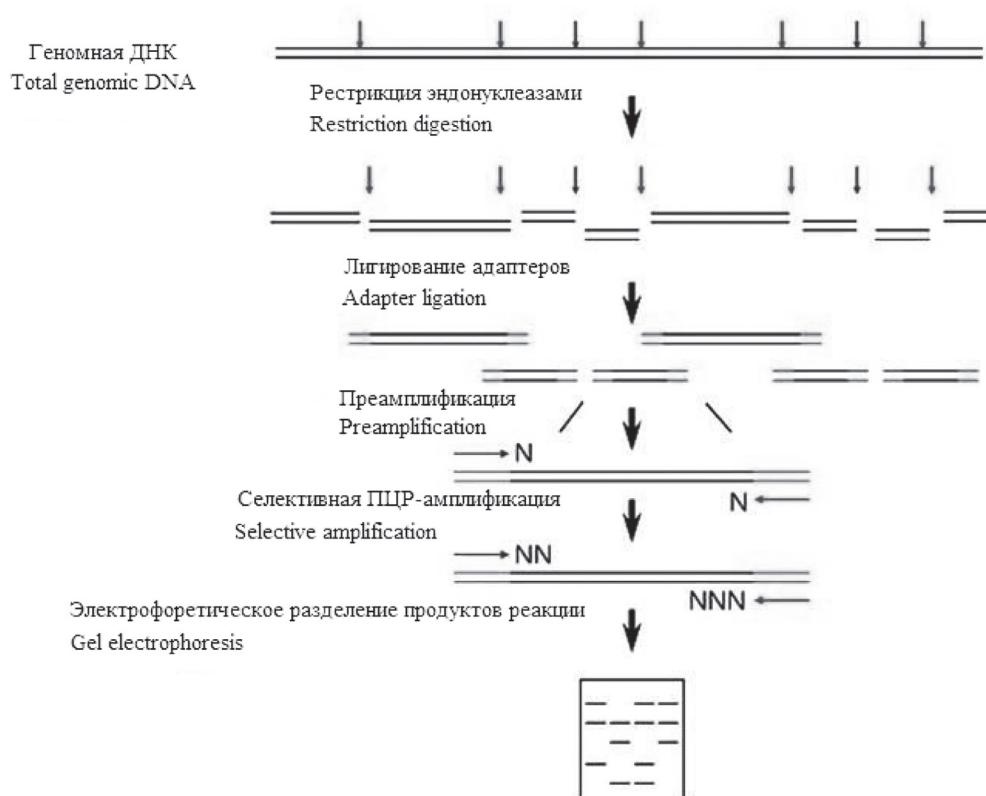


Рис. 2. Последовательная схема AFLP

Fig. 2. Successive scheme of AFLP

При генотипировании с помощью AFLP-анализа для расщепления ДНК *C. trachomatis* чаще всего используют рестриктазы EcoRI и MseI. По паттерну образовавшихся фрагментов определяют генотип, а также различия между штаммами одного генотипа [33].

Конкретным преимуществом AFLP-анализа по сравнению с традиционно применяемыми методами является возможность использования небольших количеств ДНК (от 10 до 50 нг) и ее воспроизводимость за счет анализа стабильных и надежных маркеров AFLP [33].

В литературе показана необходимость учитывать не только информацию о гене *ompA*, но и данные о полиморфизме генов, кодирующих другие белки возбудителя. Показана возможность использования для генотипирования хламидий полиморфизма еще одного белка – транслоцированного актин-рекрутирующего фосфопротеина (Tarp) (одного из эффекторов третьего типа секреции) по количеству тирозиновых доменов (ТД) в его молекуле [34].

Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот. К числу этих методов относят ДНК-гибридизацию RLB-h (reverse line blot hybridization), RDB-h (reverse dot blot hybridization) и MSA-h (microsphere suspension array hybridisation). Эта группа методов основывается на комбинации ПЦР и блоттинга. Применение меченых олигонуклеотидных зондов, сконструированных под каждый генотип, может использоваться как для генотипирования, так и для обнаружения микстгенотипной формы инфекции *C. trachomatis* [3].

В случае RLB-h используется нейлоновая мембрана, к которой при помощи амина пришиты ДНК-зонды (их число может достигать 43). С помощью одной такой мембраны можно тестировать 45 образцов. При добавлении амплифицированной, предварительно денатурированной и меченой биотином ДНК *C. trachomatis* происходит гибридизация с ДНК-зондом. Образовавшийся комплекс далее обрабатывается стрептовидин-пероксидазой, в результате чего стрептоavidин связывается с биотином. После промывания мембрану инкубируют в растворе хемолуминесцентного реагента, а затем помещают в экспозиционный картридж в темной комнате с красным

светом, покрывают рентгеновской пленкой и выдерживают в течение 7–10 мин. В случае положительного результата гибридизации происходит образование темного пятна вследствие реакции пероксидазы и хемолюминисцентного реагента.

Большим преимуществом этого метода является возможность использования такой меченой мембраны несколько раз, что весьма экономично. В работе L. Xiong с соавт. [35] описано применение этого метода для генотипирования и идентификации микст-инфекции, обусловленной разными генотипами *C. trachomatis*. Авторами были сконструированы специфические для каждой серогруппы ДНК-зонды, которые гибридизовались с участком гена *ompA*, кодирующим второй вариабельный домен MOMP, или с участком криптической плазмиды. Кроме того, показана 90 %-ная сопоставимость идентификации *C. trachomatis* данным методом с результатами коммерческой тест-системы COBAS AMPLICOR, определено количество случаев с моно- и микст-инфекцией, а также проведено генотипирование [35]. Основным недостатком метода RLB-h считается трудоемкость и долгий процесс (до 2 сут) подготовки компонентов для проведения анализа.

Методы RLB-h и RDB-h в основе своей схожи, однако второй считается более простым и легким [3], поскольку при его применении для анализа одного образца используется только одна нейлоновая мембрана, а детекция результатов не требует вспомогательного оборудования. Реакцию гибридизации регистрируют как положительную в результате образования пятна на мембране после последовательного применения конъюгата (анти-дигоксигенин-щелочной фосфатазы) и субстрата (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат/нитро-синего тетразолия (BCIP/NBT)) [36].

MSA-h представляет собой быструю и простую методику генотипирования и детекции *C. trachomatis*, при которой используются микросферы, соединенные с мишень-специфическими зондами. При связывании зондов со специфическими участками на ДНК благодаря присутствию в среде стрептавидина и фикоэритрина происходит образование конечного компонента реакции, детекция флуоресцентного сигнала которого регистрируется с помощью проточного цитометра [37]. Микросферы могут содержать различные типы и количество зондов, что позволяет выполнять несколько реакций в одной среде. J. J. Zhang с соавт. [37] показана возможность масштабного генотипирования (выборка из 2534 образцов) и определения преобладающих генотипов *C. trachomatis* и их комбинаций.

Существенными недостатками вышеуказанных методов, ограничивающих их широкое применение, является их низкая разрешающая способность по сравнению с методами, основанными на секвенировании ДНК, а также невозможность обнаружения «шведского», бесплазмидного и новых мутантных геновариантов патогена.

К современным методам, основанным на гибридизации нуклеиновых кислот для обнаружения и генотипирования *C. Trachomatis*, относят также метод ДНК-микрочипов. В 2011 г. A. Ruetzger с соавт. [38] описано использование MLT-DNA (multilocus typing DNA) для генотипирования с помощью 61 олигонуклеотидного генотип-специфического биотинилированного зонда. Последние связываются с сайтами ДНК *C. trachomatis* в 1, 2 и 4-м вариабельных доменах *ompA*, отвечающих за полиморфизм. В результате определяется «паттерн гибридизации», специфический для определенного генотипа.

В том же году L. Christerson с соавт. на основе применения ДНК-микрочипов разработали систему MLT-DNA, состоящую из олигонуклеотидных зондов к 4 локусам ДНК, используемым при MLST-анализе, и к гену *ompA* *C. trachomatis*. Метод является менее затратным по сравнению с MLST, имеет упрощенную процедуру регистрации результатов с помощью программного обеспечения и обладает сопоставимой чувствительностью [39].

Полногеномное секвенирование является идеальным методом для генотипирования, а также мощным инструментом эволюционных и эпидемиологических исследований.

Расшифровка нуклеотидной структуры генома *C. trachomatis* активно началась с 2012 г. [40, 41]. Тогда было выдвинуто предположение, что секвенирование гена *ompA* является недостаточным для воссоздания филогенетических отношений циркулирующих штаммов возбудителя. Поэтому для получения достоверной информации об эволюции, рекомбинационных процессах и возможных мутациях необходимо исследовать полный геном возбудителя [41].

Одним из недостатков полногеномного секвенирования до недавнего времени являлась необходимость пассирования возбудителя в культуре клеток. Это препятствие на пути к широкомасштабным геномным исследованиям было устранено с помощью метода иммуномагнитной сепарации, который основан на использовании металлических сфер конъюгированных с антителами к МOMP белку. Такая конструкция, предполагающая концентрацию *C. trachomatis* и их изоляцию от других клеток, присутствующих в биологическом материале человека, предоставляет возможность для прямого секвенирования. Другим методом, позволяющим избежать культивирования, но добиться обогащения целевых последовательностей генома *C. trachomatis*, может быть мультиплексная microdroplet-ПЦР. Подобная методика разработана для участка хламидийного генома протяженностью только 100 кб, но исследователи считают возможным доработать метод для обогащения целого генома *C. trachomatis* и использования подобной технологии для полногеномного секвенирования [3].

Серьезными недостатками, не позволяющими широко использовать полногеномное секвенирование, являются необходимость закупки дорогостоящего оборудования, реагентов и расходных материалов, а также долгий процесс (до 7 сут) постановки реакций и обработки результатов.

Заключение. Методы генотипирования активно развиваются и совершенствуются: разрабатываются и модернизируются биоинформационные базы данных, повышается уровень автоматизации и точность генотипирования. В настоящее время использование методов молекулярного типирования является полезным и незаменимым инструментом для эпидемиологических исследований, обнаружения новых генотипов или геновариантов и понимания роли различных генетических детерминант *C. trachomatis*, лежащих в основе патофизиологических механизмов заболевания. Только молекулярно-эпидемиологические исследования дают детальное представление о динамике и цепочках передачи хламидийной инфекции и, следовательно, позволяют выявить конкретные группы риска.

Полученная уникальная информация может быть использована для разработки программ скрининга и мониторинга хламидийной урогенитальной инфекции, создания вакцины, организации целенаправленной профилактики и повышения эффективности противохламидийного лечения. В ряде стран мира (Швеция, Нидерланды и др.) активно внедряется система молекулярно-эпидемиологического слежения за *C. trachomatis*. В нашей стране проведены только отдельные фрагментарные исследования по изучению генотипического разнообразия популяции патогена. Налаживание единой системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга на национальном уровне позволило бы усовершенствовать эпидемиологический надзор и повысить эффективность контроля над урогенитальной хламидийной инфекцией в Республике Беларусь.

Исходя из изложенного выше, широко используемые для генотипирования *C. trachomatis* MLVA и MLST методы и их модификации являются более предпочтительными.

Список использованных источников

1. Identification of proteins differentially expressed by *Chlamydia trachomatis* treated with chlamydia phage capsid protein VP1 during intracellular growth / J. Ma [et al.] // Arch. Microbiol. – 2017. – Vol. 199, N 8. – P. 1121–1131. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1381-2>
2. Белозорова, О. А. Превалирующие генотипы *Chlamydia trachomatis* у больных урогенитальным хламидиозом Харьковской области / О. А. Белозорова // Вісн. Харків. нац. університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2010. – Вип. 11. – С. 55–59.
3. Rawre, J. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis*: an overview / J. Rawre, D. Juyal, B. Dhawan // Indian J. Med. Microbiol. – 2017. – Vol. 35, N 1. – P. 17–26. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_341
4. Литовченко, О. А. Генотипирование *Chlamydia trachomatis*, выявленных в образцах, полученных у больных с урогенитальной патологией в северо-восточном регионе Украины / О. А. Литовченко // Ann. Mechnikov Institute. – 2011. – Т. 4. – С. 314–315.
5. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization / R. S. Stephens [et al.] // J. Immunol. – 1982. – Vol. 128. – P. 1083–1089.
6. Simplified microimmunofluorescence test with trachoma-lymphogranuloma venereum (*Chlamydia trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody / S. P. Wang [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1975. – Vol. 1, N 3. – P. 250–255.
7. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis / M. Klint [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, N 5. – P. 1410–1414. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-06>

8. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars / Y. Yuan [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1989. – Vol. 57, N 4. – P. 1040–1049.
9. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new *18S rRNA* gene sequence types / D. R. Stothard [et al.] // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 1998. – Vol. 45, N 1. – P. 45–54. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x>
10. Genetic variability among *Chlamydia trachomatis* reference and clinical strains analyzed by pulsed-field gel electrophoresis / P. Rodriguez [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – Vol. 32, N 12. – P. 2921–2928.
11. 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 County / M. Lysen [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, N 4. – P. 1641–1647. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.4.1641-1647.2004>
12. The first case record of a female patient with bubonic lymphogranuloma venereum (LGV), serovariant L2b / S. P. Verweij [et al.] // *Sexually Transmitted Infections*. – 2012. – Vol. 88, N 5. – P. 346–347. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050298>
13. A multi-component prime-boost vaccination regimen with a consensus MOMP antigen enhances *Chlamydia trachomatis* clearance / A. Badamchi-Zadeh [et al.] // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – Art. 162. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00162>
14. Characterization of *Chlamydia trachomatis omp1* genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden / M. Jurstrand [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39, N 11. – P. 3915–3919. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3915-3919.2001>
15. Изучение распределения различных серотипов *C. trachomatis* и молекулярно-биологических свойств возбудителей / О. С. Полуян [и др.] // *Мед. новости*. – 2009. – № 8. – С. 82–86.
16. 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 л.
17. ПЦР-детекция и идентификация возбудителей хламидийных инфекций человека и обезьян / В. В. Слободенюк [и др.] // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. – 2009. – № 3. – С. 54–62.
18. *Chlamydia trachomatis* serovar distributions in Russian men and women: a comparison with dutch serovar distributions / V. Smelov [et al.] // *Drugs Today*. – 2009. – Vol. 45, suppl. B. – P. 33–38.
19. Urogenital *Chlamydia trachomatis* strain types, defined by high-resolution multilocus sequence typing, in relation to ethnicity and urogenital symptoms among a young screening population in Amsterdam, The Netherlands / B. Versteeg [et al.] // *Sexually Transmitted Infections*. – 2015. – Vol. 91, N 6. – P. 415–422. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2014-051790>
20. *Chlamydia trachomatis* strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in Sweden, the Netherlands, and the United States / L. Christerson [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, N 11. – P. 3548–3555. <https://doi.org/10.1128/JCM.01713-12>
21. *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes in male patients with urethritis in Greece: conservation of the serovar distribution and evidence for mixed infections with *Chlamydia abortus* / P. Psarracos [et al.] // *Mol. Cell. Probes*. – 2011. – Vol. 25, N 4. – P. 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.04.003>
22. *Chlamydia trachomatis* prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany / N. Fieser [et al.] // *Infection*. – 2013. – Vol. 41, N 1. – P. 159–166. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0301-2>
23. 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, N 5. – P. 905–912. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0665-6>
24. *Chlamydia trachomatis* genotypes in school adolescents, Italy / P. Stefanelli [et al.] // *Infection*. – 2015. – Vol. 43, N 6. – P. 739–741. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0787-5>
25. Serological reactivity and bacterial genotypes in *Chlamydia trachomatis* urogenital infections in Guadeloupe, French West Indies / F.-X. Weill [et al.] // *Sexually Transmitted Infections*. – 2010. – Vol. 86, N 5. – P. 101–105. <https://doi.org/10.1136/sti.2009.037036>
26. Genotyping markers used for multilocus VNTR analysis with *ompA* (MLVA-*ompA*) and multi sequence typing (MST) retain stability in *Chlamydia trachomatis* / C. Labiran [et al.] // *Cell. Infect. Microbiol.* – 2012. – Vol. 2. – Art. 68. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00068>
27. MLVA subtyping of genovar E *Chlamydia trachomatis* individualizes the Swedish variant and anorectal isolates from men who have sex with men [Electronic resource] / O. Peuchant [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 2. – P. e31538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031538>
28. Comparative evaluation of new typing schemes for urogenital *Chlamydia trachomatis* isolates / L. N. Ikryannikova [et al.] // *Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59, N 2. – P. 188–196. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00678.x>
29. Ten years transmission of the new variant of *Chlamydia trachomatis* in Sweden: prevalence of infections and associated complications / J. Dahlberg [et al.] // *Sexually Transmitted Infections*. – 2018. – Vol. 94, N 2. – P. 100–104. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2016-052992>
30. Evaluation of high-resolution typing methods for *Chlamydia trachomatis* in samples from heterosexual couples / R. J. Bom [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49, N 8. – P. 2844–2853. <https://doi.org/10.1128/JCM.00128-11>
31. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis* by random amplification of polymorphic DNA / C. Scieux [et al.] // *Res. Microbiol.* – 1993. – Vol. 144, N 5. – P. 395–404.
32. Методы генотипирования бактерий: фрагментный анализ / Е. С. Сколотнева [и др.] / *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2014. – № 2. – С. 13–21.
33. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? / S. A. Morré [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38, N 6. – P. 2292–2296.

34. Литовченко, О. А. Генотипирование *Chlamydia trachomatis* на основе полиморфизма главного белка наружной мембраны и транслоцированного актин-рекрутирующего фосфопротеина / О. А. Литовченко // Имунология та алергологія: наука і практика. – 2012. – № 3. – С. 66–68.

35. Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis* / L. Xiong [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, N 4. – P. 1413–1418. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1413-1418.2006>

36. Stothard, D. R. Use of a reverse dot blot procedure to identify the presence of multiple serovars in *Chlamydia trachomatis* urogenital infection / D. R. Stothard // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, N 7. – P. 2655–2659. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2655-2659.2001>

37. Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Shenzhen, China / J.-J. Zhang [et al.] // Sexually Transmitted Infections. – 2012. – Vol. 88, N 4. – P. 272–277. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050163>

38. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains from culture and clinical samples using an *ompA*-based DNA microarray assay / A. Ruettinger [et al.] // Mol. Cell. Probes. – 2011. – Vol. 25, N 1. – P. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.09.004>

39. Christerson, L. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* by use of a novel multilocus typing DNA microarray / L. Christerson [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49, N 8. – P. 2838–2843. <https://doi.org/10.1128/JCM.00883-11>

40. Population genomics of *Chlamydia trachomatis*: insights on drift, selection, recombination, and population structure / S. J. Joseph [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2012. – Vol. 29, N 12. – P. 3933–3946. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss198>

41. Whole genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing / S. R. Harris [et al.] // Nat. Genet. – 2012. – Vol. 44, N 4. – P. 413–419. <https://doi.org/10.1038/ng.2214>

References

1. Ma J., Sun Y., Sun C., Zhou Q., Qi M., Kong J., Wang J., Liu Y., Liu Q. Identification of proteins differentially expressed by *Chlamydia trachomatis* treated with chlamydia phage capsid protein VP1 during intracellular growth. *Archives of Microbiology*, 2017, vol. 199, no. 8, pp. 1121–1131. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1381-2>

2. Belozorova O. A. Prevalent genotypes of *Chlamydia trachomatis* in patients with urogenital chlamydiosis in Kharkiv region. *Visnik Kharkivs'kogo natsional'nogo universitetu imeni V. N. Karazina. Seriya «Biologiya»* [Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series “Biology”], 2010, iss. 11, pp. 55–59 (in Russian).

3. Rawre J., Juyal D., Dhawan B. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis*: an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2017, vol. 35, no. 1, pp. 17–26. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_341

4. Litovchenko O. A. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* obtained from patients with urogenital pathology in north-west region of Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*, 2011, vol. 4, pp. 314–315 (in Russian).

5. Stephens R. S., Tam M. R., Kuo C. C., Nowinski R. C. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *Journal of Immunology*, 1982, vol. 128, pp. 1083–1089.

6. Wang S. P., Grayston J. T., Alexander E. R., Holmes K. K. Simplified microimmunofluorescence test with trachoma-lymphogranuloma venereum (*Chlamydia trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 1975, vol. 1, no. 3, pp. 250–255.

7. Klint M., Fuxelius H.-H., Goldkuhl R. R., Skarin H., Rutemark C., Andersson S. G., Persson K., Herrmann B. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, vol. 45, no. 5, pp. 1410–1414. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-06>

8. Yuan Y., Zhang Y. X., Watkins N. G., Caldwell H. D. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infection and Immunity*, 1989, vol. 57, no. 4, pp. 1040–1049.

9. Stothard D. R., Schroeder-Diedrich J. M., Awwad M. H., Gast R. J., Ledee D. R., Rodriguez-Zaragoza S., Dean C. L., Fuerst P. A., Byers T. J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new *18S rRNA* gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1998, vol. 45, no. 1, pp. 45–54. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x>

10. Rodriguez P., Allardet-Servent A., de Barbeyrac B., Ramuz M., Bebear C. Genetic variability among *Chlamydia trachomatis* reference and clinical strains analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, vol. 32, no. 12, pp. 2921–2928.

11. Lysen M., Osterlund A., Rubin C. J., Persson T., Persson I., Herrmann B. 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 County. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, no. 4, pp. 1641–1647. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.4.1641-1647.2004>

12. Verweij S. P., Ouburg S., de Vries H., Morré S. A., van Ginkel C. J., Bos H., Sebens F. W. The first case record of a female patient with bubonic lymphogranuloma venereum (LGV), serovariant L2b. *Sexually Transmitted Infections*, 2012, vol. 88, no. 5, pp. 346–347. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050298>

13. Badamchi-Zadeh A., McKay P. F., Korber B. T., Barinaga G., Walters A. A., Nunes A., Gomes J. P., Follmann F., Trengoning J. S., Shattock R. J. A multi-component prime-boost vaccination regimen with a consensus MOMP antigen enhances *Chlamydia trachomatis* clearance. *Frontiers in Immunology*, 2016, vol. 7, art. 162. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00162>

14. Jurstrand M., Falk L., Fredlund H., Lindberg M., Olcen P., Andersson S., Persson K., Albert J., Backman A. Characterization of *Chlamydia trachomatis omp1* genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, vol. 39, no. 11, pp. 3915–3919. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3915-3919.2001>

15. Poluyan O. S., Kostyuk S. A., Kolomiets N. D., Poleshchuk N. N., Rudenkova T. V. A study of the distribution of various *C. trachomatis* serotypes and the molecular-biological properties of pathogens. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2009, no. 8, pp. 82–86 (in Russian).
16. Astashonok A. N. *Pheno- and genotypic characteristics of Chlamydia trachomatis and detection of the pathogen using fluorescent immunomagnetic nanoparticles*. Ph. D. Thesis. Minsk, 2016. 123 p. (in Russian).
17. Slobodenyuk V. V., Aleshkin V. A., Lapin B. A., Afanas'ev S. S., Kokushkov D. V., Grechishnikova O. G [et al.]. PCR-detection and identification of chlamydia infections pathogens of human and monkeys. *Immunopatologija, allergologija, infekciologija* [Immunopathology, allergology, infectology], 2009, no. 3, pp. 54–62 (in Russian).
18. Smelov V., Quint K. D., Pleijster J., Savelkoul P. H., Shalepo K., Shipitsyna E. [et al.]. *Chlamydia trachomatis* serovar distributions in russian men and women: a comparison with dutch serovar distributions. *Drugs of Today*, 2009, vol. 45, suppl. B, pp. 33–38.
19. Versteeg B., Himschoot M., van den Broek I. V., Bom R. J. M., Speksnijder A. G., Schim van der Loeff M. F., Bruisten S. M. Urogenital *Chlamydia trachomatis* strain types, defined by high-resolution multilocus sequence typing, in relation to ethnicity and urogenital symptoms among a young screening population in Amsterdam, The Netherlands. *Sexually Transmitted Infections*, 2015, vol. 91, no. 6, pp. 415–422. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2014-051790>
20. Christerson L., Bom R. J. M., Bruisten S. M., Yass R., Hardick J., Bratt G., Gaydos C. A., Morre S. A., Herrmann B. *Chlamydia trachomatis* strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in Sweden, the Netherlands, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, vol. 50, no. 11, pp. 3548–3555. <https://doi.org/10.1128/JCM.01713-12>
21. Psarrakos P., Papadogeorgakis E., Sachse K., Vretou E. *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes in male patients with urethritis in Greece: conservation of the serovar distribution and evidence for mixed infections with *Chlamydothrix abortus*. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, vol. 25, no. 4, pp. 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.04.003>
22. Fieser N., Simnacher U., Tausch Y., Werner-Belak S., Ladenburger-Strauss S., von Baum H., Reischl U., Essig A. *Chlamydia trachomatis* prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany. *Infection*, 2013, vol. 41, no. 1, pp. 159–166. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0301-2>
23. Piñeiro L., Bernal S., Bordes A., Palomares J.C., Gilarranz R., von Wichmann M. A., Cilla G. 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. *Infection*, 2014, vol. 42, no. 5, pp. 905–912. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0665-6>
24. Stefanelli P., Sulis G., Renna G., Gargiulo F., Zanotti P., Capelli M., De Francesco M. A., Donato F., Pecorelli S., Matteelli A. *Chlamydia trachomatis* genotypes in school adolescents, Italy. *Infection*, 2015, vol. 43, no. 6, pp. 739–741. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0787-5>
25. Weill F.-X., le Hello S., Clerc M., Scribans C., de Barbeyrac B. Serological reactivity and bacterial genotypes in *Chlamydia trachomatis* urogenital infections in Guadeloupe, French West Indies. *Sexually Transmitted Infections*, 2010, vol. 86, no. 5, pp. 101–105. <https://doi.org/10.1136/sti.2009.037036>
26. Labiran C., Clarke I. N., Cutcliffe L. T., Wang Y., Skilton R. J., Persson K., Bjartling C., Herrmann B., Christerson L., Marsh P. Genotyping markers used for multilocus VNTR analysis with *ompA* (MLVA-*ompA*) and multi sequence typing (MST) retain stability in *Chlamydia trachomatis*. *Cellular and Infection Microbiology*, 2012, vol. 2, art. 68. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00068>
27. Peuchant O., le Roy C., Herrmann B., Clerc M., Bebear C., de Barbeyrac B. MLVA subtyping of genovar E *Chlamydia trachomatis* individualizes the Swedish variant and anoctal isolates from men who have sex with men. *PLoS One*, 2016, vol. 7, no. 2, p. e31538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031538>
28. Ikryannikova L. N., Shkarupeta M. M., Shitikov E. A., Il'ina E. N., Govorun V. M. Comparative evaluation of new typing schemes for urogenital *Chlamydia trachomatis* isolates. *Immunology and Medical Microbiology*, 2010, vol. 59, no. 2, pp. 188–196. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00678>
29. Dahlberg J., Hadad R., Elfving K., Larsson I., Isaksson J., Magnuson A., Fredlund H., Unemo M., Herrmann B. Ten years transmission of the new variant of *Chlamydia trachomatis* in Sweden: prevalence of infections and associated complications. *Sexually Transmitted Infections*, 2018, vol. 94, no. 2, pp. 100–104. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2016-052992>
30. Bom R. J., Christerson L., Schim van der Loeff M. F., Coutinho R. A., Herrmann B., Bruisten S. M. Evaluation of high-resolution typing methods for *Chlamydia trachomatis* in samples from heterosexual couples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 8, pp. 2844–2853. <https://doi.org/10.1128/JCM.00128-11>
31. Scieux C., Grimont F., Regnault B., Bianchi A., Kowalski S., Grimont P. A. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis* by random amplification of polymorphic DNA. *Research in Microbiology*, 1993, vol. 144, no. 5, pp. 395–404.
32. Skolotneva E. S., Volkova R. A., El'bert E. V., Mironov A. N., Merkulov V. A., Bondarev V. P., Borisevich I. V. Bacterial genotyping methods: banding pattern-based analysis. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [BIOPreparations. prevention, diagnosis, treatment], 2014, no. 2, pp. 13–21 (in Russian).
33. Morré S. A., Rozendaal L., van Valkengoed I. G., Boeke A. J., van Voorst Vader P. C., Schirm J. [et al.]. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, vol. 38, no. 6, pp. 2292–2296.
34. Litovchenko O. A. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* based on polymorphism of major outer membrane protein and translocated actinrecruiting phosphoprotein. *Imunologiya ta alergologiya: nauka i praktika* [Immunology and allergology: science and practice], 2012, no. 3, pp. 66–68 (in Russian).
35. 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*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, vol. 44, no. 4, pp. 1413–1418. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1413-1418.2006>

36. Stothard D. R. Use of a reverse dot blot procedure to identify the presence of multiple serovars in *Chlamydia trachomatis* urogenital infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, vol. 39, no. 7, pp. 2655–2659. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2655-2659.2001>

37. Zhang J.-J., Zhao G.-L., Wang F., Hong F.-C., Luo Z.-Z., Lan L.-N. [et al.]. Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Shenzhen, China. *Sexually Transmitted Infections*, 2012, vol. 88, no. 4, pp. 272–277. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050163>

38. Ruettger A., Feige J., Slickers P., Schubert E., Morre S. A., Pannekoek Y., Herrmann B., de Vries H. J., Ehricht R., Sachse K. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains from culture and clinical samples using an *ompA*-based DNA microarray assay. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, vol. 25, no. 1, pp. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.09.004>

39. Christerson L., Ruettger A., Gravningen K., Ehricht R., Sachse K., Herrmann B. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* by use of a novel multilocus typing DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 8, pp. 2837–2843. <https://doi.org/10.1128/JCM.00883-11>

40. Joseph S. J., Didelot X., Rothschild J., de Vries H. J., Morre S. A., Read T. D., Dean D. Population genomics of *Chlamydia trachomatis*: insights on drift, selection, recombination, and population structure. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, vol. 29, no. 12, pp. 3933–3946. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss198>

41. Harris S. R., Clarke I. N., Seth-Smith H. M., Solomon A. W., Cutcliffe L. T., Marsh P. [et al.]. Whole genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nature Genetics*, 2012, vol. 44, no. 4, pp. 413–419. <https://doi.org/10.1038/ng.2214>

Информация об авторах

Капустина Юлия Михайловна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kapystinaj@gmail.com

Рубаник Людмила Владимировна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubaniklv@tut.by

Information about the authors

Yuliya M. Kapustina – Junior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kapystinaj@gmail.com

Lyudmila V. Rubanik – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rubaniklv@tut.by