



УДК 579. 61; 571. 27

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

В. А. Федорова, С. С. Коннова<sup>1</sup>, Т. И. Полянина,  
И. Н. Дружкин<sup>2</sup>, Э. А. Федотов<sup>2</sup>, V. L. Motin<sup>3</sup>

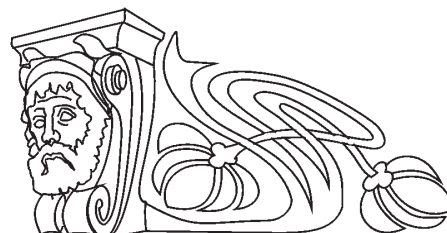
ГНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет

<sup>2</sup>Медицинский Di-центр, г. Энгельс

<sup>3</sup>University of Texas Medical Branch, Galveston, USA

E-mail: feodorovav@mail.ru



Проведено сравнение диагностической значимости плазмидных и хромосомных маркеров для детекции *Chlamydia trachomatis* в клинических образцах пациентов с хламидийной инфекцией урогенитального тракта. В качестве плазмидных мишеней использовали нуклеотидные последовательности *orf3* и *orf8*, присутствие которых определяли с помощью ПЦР. Продукт гена *omp1* (MOMP), кодируемого хромосомой, выявляли специфическими моноклональными антителами. Показано, что по сравнению с плазмидными мишенями диагностическая значимость MOMP оказалась выше в 4,91–6,98 раза. Значение полученных результатов для совершенствования лабораторной диагностики хламидиоза в стадии обсуждения.

**Ключевые слова:** *Chlamydia trachomatis*, криптическая плазмида, диагностика хламидиоза, клинические изоляты.

### Use of Different Target for Detection of *Chlamydia trachomatis*

V. A. Feodorova, S. S. Konnova, T. I. Polyagina,  
I. N. Druzhkin, E. A. Fedotov, V. L. Motin

A comparative diagnostic value of plasmid and chromosome-encoded markers for detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens from patients with *Chlamydia* infection of urogenital tract was conducted. The nucleotide sequences of the plasmid genes *orf3* and *orf8* were used as targets in the PCR analysis. The MOMP, a product of the chromosomal gene *omp1*, was detected by specific monoclonal antibodies. It was shown that the diagnostic value of MOMP was significantly (in 4,91–6,98 times) higher in comparison with the plasmid targets. A significance of obtained data for the improvement of laboratory diagnostics of *Chlamydia* is discussed.

**Key words:** *Chlamydia trachomatis*, cryptic plasmid, diagnostics of chlamydia infection, clinical samples.

*Chlamydia trachomatis* – облигатный внутриклеточный патоген относительно небольшого размера (~0.2–1.5 μm) [1].

В настоящее время представителей вида *C. trachomatis* подразделяют, по крайней мере, на 15 сероваров, или серотипов, различающихся по вариабельным последовательностям в основном белке внешней мембраны MOMP1, экспрессируемом геном *omp1* [2]. В зависимости от принадлежности к конкретному сероварианту

штаммы *C. trachomatis* могут вызывать у людей различные заболевания. Так, серотипы А, В, Ва и С ассоциированы с трахомой, а серотипы D – К обуславливают инфекции, передаваемые половым путем [3, 4]. Хламидии имеют относительно небольшой высококонсервативный геном размером примерно в 1 Mb и криптическую плазмиду около 7 Kb [5]. Плазмида мультикопийна (4–8 копий) [6], состоит из 8 генов (*orf1–orf8*) и имеет высокую диагностическую значимость.

В литературе встречаются сведения и о наличии бесплазмидных штаммов *C. trachomatis*. Ранее такие варианты выявлялись достаточно редко, однако в последние годы зарубежными учеными установлено, что они составляют около половины клинических изолятов. Подобно плазмидсодержащим бесплазмидные штаммы обладают вирулентностью и способностью вызывать хламидийную инфекцию. Как правило, такие варианты хламидий относятся к серотипам L2, D и E [7–10].

В октябре 2006 г. в Швеции был обнаружен новый вариант *C. trachomatis* с делецией в 377 bp в криптической плазмиде. Данная мутация захватывала участок гена *orf3*, который наиболее широко используется в качестве мишени в коммерческих тестах, применяемых в большинстве диагностических лабораторий [11,12]. В настоящее время в европейских странах такие штаммы выявляются у 20–64% пациентов с хламидийной инфекцией [13]. Сообщалось также и о полиморфизме в других участках плазмидного репликаона хламидий [14]. Очевидно, что вышеизложенные факты могут затруднять лабораторную диагностику хламидиоза.

Таким образом, более детальное изучение уже известных мишеней, равно как и поиск новых, является актуальной задачей не только для характеристики штаммов хламидий, но и для создания на их основе новых генодиагностических тест-систем для лабораторной диагностики хламидиоза.



Целью настоящего исследования явилось сравнение диагностической значимости различных генетических мишеней для выявления *C. trachomatis* в клинических образцах.

### Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали клинические образцы (уретральные и цервикальные соскобы) от 58 пациентов обоего пола, обратившихся в Диагностический центр г. Энгельса (Di-центр). Выделение ДНК из клинического материала проводили с помощью коммерческого комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для выявления ДНК *C. trachomatis* в исследуемом клиническом материале методом ПЦР применяли коммерческий набор реагентов «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis-FL*» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Также образцы тестировали с помощью специфических праймеров (KL1/KL2), предложенных в работе J. Mahony с соавт. [15]. В качестве положительного контроля использовали ДНК серовара E *C. trachomatis*.

Параллельно проводили амплификацию с созданными нами праймерами (ORF8-150F/ORF8-150R) на ген *orf8* криптоической плазмиды, которые рассчитывали с помощью программы «Primer 3». Регистрацию результатов ПЦР выполняли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Эти же клинические образцы одновременно тестировали с использованием коммерческого набора ХлаМоноСкрин-2 (НИАРМЕДИК ПЛЮС, Москва) по методике, описанной нами ранее [16]. Все положительные образцы были исследованы с применением модифицированного метода Романовского – Гимза [17] с последующей микроскопией (микроскоп Leica марки DME, при 1000-кратном увеличении под иммерсией).

### Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе исследования все образцы ДНК тестировали на плазмидные мишени. Для этого в ПЦР выявляли последовательности двух наиболее консервативных генов криптоической плазмиды – *orf3* и *orf8* [18]. В первом случае применяли один из вариантов коммерческих китов «АмплиСенс» (ПЦР-А), предназначенных для амплификации участка плазмидной ДНК *C. trachomatis* размером 330 п.н. предположительно в последовательности *orf3*. Второй ген определяли двумя парами праймеров – KL1/KL2 (ПЦР-К) и ORF8-150F/ORF8-150R (ПЦР-О).

В целом количество положительных ответов, полученных при детекции обоих генов криптоической плазмиды, оказалось приблизительно

сходным – около 20% (табл. 1). При этом мы не наблюдали полного совпадения результатов как по положительным, так и по отрицательным ответам между использованными нами вариантами анализа.

Таблица 1

Частота выявления хромосомных и плазмидных мишеней *C. trachomatis* в клинических образцах

Количество образцов	Мишени							
	Плазмидные						Хромосомная	
	<i>orf3</i>		<i>orf8</i>				<i>orf1</i>	
	Ампли-сенс		KL1/KL2		ORF8-150F/ORF8-150R		MOMP	
Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Положительных	10	17.2	16	27.6	7	12.1	49	84.5
Отрицательных	48	82.8	42	72.4	51	87.9	9	15.5
Всего:	58	100	58	100	58	100	58	100

Так, только в 60% случаев (6/10) регистрировались совпадения данных между ПЦР-А и ПЦР-К и в 70% (7/10) – между ПЦР-А и ПЦР-О. Более того, при использовании двух пар праймеров на одну и ту же мишень – *orf8* – выявлялись значительные статистически достоверные различия ( $p < 0.9$ ) в количестве положительных ответов в ПЦР-К и ПЦР-О (см. табл. 1). Видимо, это связано с неоднородностью генома хламидий и появлением ряда штаммов *C. trachomatis*, имеющих точковые мутации как в последовательностях-мишенях, так и между ними, равно как и с режимами проведения ПЦР.

На наш взгляд, это подтверждается результатами ПЦР-К, представленными на рис. 1, где в положительных образцах (см. рис. 1, треки 1, 3, 7, 8) мы получили ПЦР-продукт ожидаемого размера [19] на уровне положительного контроля (см. рис.1, трек К+). Кроме того, обращает на себя внимание факт появления в некоторых треках фрагмента меньшего веса (см. рис. 1, трек 4), который, вероятно, можно считать положительным, так как уменьшение молекулярной массы ампликона обычно происходит за счет делеции между сайтами прикрепления праймеров. Интересно также, что при наличии искомого фрагмента на уровне положительного контроля нами отмечено появление дублирующей полосы немного меньшей молекулярной массы (рис.1, трек 8). Эти факты также могут свидетельствовать о наличии небольших делеций между участками отжига праймеров, равно как и о неоднородности популяции хламидий и возможном присутствии в исследуемом образце вариантов *C. trachomatis* с модифицированным геномом. Именно об этом

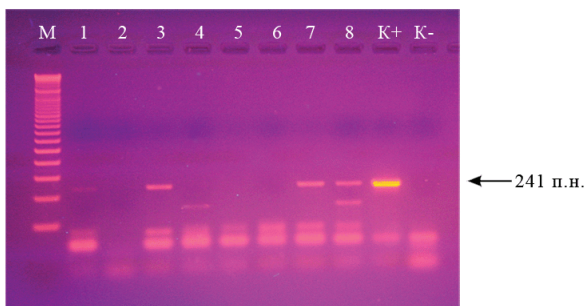


Рис. 1. Результаты электрофореза ПЦР продуктов после амплификации ДНК из клинических образцов (треки 1–8) с праймерами KL1/KL2. М – маркер молекулярных весов, (K+)/(K–) – положительный и отрицательный контроль соответственно

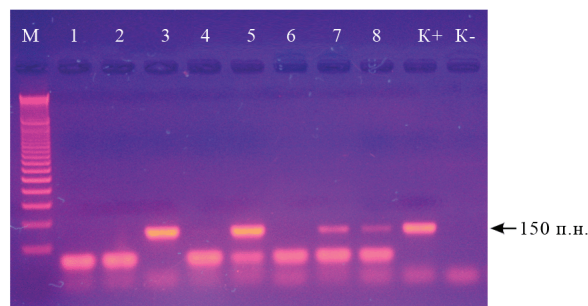


Рис. 2. Результаты электрофореза ПЦР продуктов после амплификации ДНК из клинических образцов (треки 1–8) с праймерами ORF8-150F и ORF8-150R. М – маркер молекулярных весов, (K+)/(K–) – положительный и отрицательный контроль соответственно

свидетельствуют и различия в специфических последовательностях плазмидных ДНК хламидий, депонированных в GeneBank [20] и используемых в качестве мишеней для праймеров KL1/KL2 [15].

На следующем этапе те же клинические образцы тестировали в ПЦР-О с использованием праймеров на другую мишень, а именно участок гена *orf8* криптической плазмиды, который, как недавно показано L. Clarke с соавт. [21], наиболее стабильно обнаруживается в плазмидном репликоне клинических изолятов *C. trachomatis*. Как видно на рис. 2, данные праймеры четко амплифицировали ожидаемый фрагмент 150 bp (треки 3, 5, 7, 8). При этом ни в одном из треков не наблюдалось образования дополнительных или минорных полос.

Для оценки адекватности полученных результатов была использована другая мишень – основной белок наружной мембраны МОМР (от англ. Major Outer Membrane Protein), кодируемый хромосомным геном *omp1* и обеспечивающий внутривидовую дифференциацию хламидий на отдельные сероварианты [19]. В этом случае

клинические образцы тех же пациентов были исследованы с применением тест-системы «Хла-МоноСкрин-2» для детекции штаммов всех 15 основных сероваров *C. trachomatis* с помощью соответствующих сероварспецифических моноклональных антител (МКА) [22].

Проведенный анализ показал, что наибольшее число положительных ответов было зафиксировано именно на выбранный нами хромосомный маркер (см. табл. 1). По сравнению с вышеуказанными плазмидными мишенями количество положительных ответов с анти-МОМР МКА оказалось выше в 4,91–6,98 раза. Вероятно, это могло быть связано с циркуляцией среди пациентов бесплазмидных штаммов хламидий (около 57%, что соотносится с общеевропейской статистикой, представленной недавно В. Негтманн с соавт. [13]). При этом наибольшее количество совпадений по положительным ответам регистрировалось с праймерами KL1/KL2, а по отрицательным во всех случаях составило 100%, независимо от использованных в ПЦР праймеров (табл. 2).

Таблица 2

Соотношение положительных и отрицательных ответов по плазмидным и хромосомными мишеням *C. trachomatis* при тестировании клинических образцов

Плазмидные мишени	Праймеры	Количество совпадений с хромосомными мишенями			
		по положительным ответам		по отрицательным ответам	
		Абс. *	%	Абс.*	%
<i>orf3</i>	Амплиценс	10/49	20.4	9/9	100
<i>orf8</i>	KL1/ KL2	16/49	32.7	9/9	100
	ORF8-150F/ORF8-150R	7/49	14.3	9/9	100

Примечание. \* в числителе – количество ответов по данной плазмидной мишени; в знаменателе – количество ответов по хромосомной мишени (МОМР).

Клинические образцы, выявленные с помощью вышеуказанных мишеней, также тестировали с применением модифицированного метода Романовского-Гимза [19]. Благодаря этому подходу уда-

лось подтвердить наличие почти во всех из них элементарных телец хламидий (рис. 3). Минимальные расхождения в результатах находятся за пределами чувствительности бактериоскопического метода.

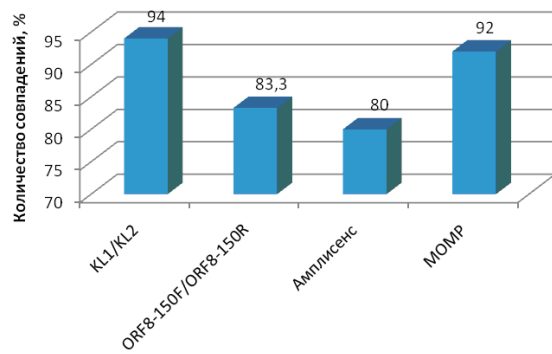


Рис. 3. Количество совпадений обнаружения включений элементарных тел хламидий методом бактериоскопии в клинических образцах с положительными ответами при их тестировании в ПЦР на различные мишени и ДИА с МОМР МКА

Таким образом, полученные данные позволяют сделать предположение о модификациях генома не только в районе последовательности гена *orf3*, как показано Т. Рипа с соавт. [11], но и в участках гена *orf8*, ранее рассматриваемого как наиболее консервативный участок криптической плазмиды. Использование хромосомных мишеней для детекции штаммов *C. trachomatis* позволило нам выявить большее количество образцов, чем с помощью плазмидных мишеней. Следовательно, хромосомным маркерам требуется отводить более важное место при создании китов для лабораторной диагностики хламидиозов, так как их использование позволит выявлять практически все сероварианты возбудителя. Это значительно повысит диагностическую значимость соответствующих тест-систем в условиях полиморфизма генома *C. trachomatis*. Вместе с тем использование уже известных и поиск новых генетических мишеней позволяют точнее охарактеризовать особенности диагностически значимых последовательностей ДНК *C. trachomatis*, выявить новые варианты мутаций генома и проследить направление его филогенетической эволюции.

Авторы выражают глубокую признательность коллегам-проф. С.А. Gaydos и проф. Т.А. Quinn из Johns Hopkins University School of Medicine, USA.

Работа выполнена при поддержке Проектов НИИ/ВТЕР/ИСТС №3846 и НАИРИТ № d5a2c.

#### Список литературы

1. Biros E., Vodnar J., Biros I. et al. Nucleic acid amplification technique for detection of *Chlamydia trachomatis* infection from clinical urogenital swabs // Folia Microbiol. 2007. Vol. 52 (4). P. 437–442.
2. Yuan Y., Zhang Y.-X., Watkins N. et al. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia*

*trachomatis* serovars // Infect. Immun. 1989. Vol. 57. P. 1040–1049.

3. Ward M. Chlamydial classification, development and structure // Br. Med. Bull. 1983. Vol. 39. P. 109–115.
4. Nuñez A., Nogueira P., Borrego M. et al. *Chlamydia trachomatis* diversity viewed as a tissue-specific coevolutionary arms race // Genome Biology. 2008. Vol. 9. P. 153.
5. Stephens R., Kalman S., Lammel C. et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis* // Science. 1998. Vol. 282. P. 754–759.
6. Carlson J., Whitmire W., Crane D. et al. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor // Infect. Immun. 2008. Vol. 76. P. 2273–2283.
7. Peterson E., Markoff B., Schachter J. et al. The 7.5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism // Plasmid. 1990. Vol. 23. P. 144–148.
8. Farencena A., Comanducci M., Donati M. et al. Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of Biovar trachoma // Infect. Immun. 1997. Vol. 65. P. 2965–2969.
9. Stothard D., Williams J., Van Der P. et al. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid // Infect. Immun. 1998. Vol. 66. P. 6010–6013.
10. Жданов А. В., Квасов А. В., Бурменская О. В. и др. Диагностика урогенитального хламидиоза методом ДОТ-гибридизации с использованием ДНК-зонда, меченного биотином // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 1996. № 9. С. 329–333.
11. Ripa T., Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests // Euro Surveill. 2006. Vol. 11. E061109. 2 17213548. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/061109.asp#2>.
12. Ripa T., Nilsson P. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests // Sex. Transm. Dis. 2007. Vol. 34. P. 255–256.
13. Herrmann B., Torner A., Low N. et al. Emergence and spread of *Chlamydia trachomatis* variant, Sweden // Emerg. Infect. Dis. 2008. Vol. 14. P. 1462–1465.
14. Storni E., Donati M., Marangoni A. et al. Comparative PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of the plasmid gene *orf3* of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006. Vol. 48(3). P. 313–318.
15. Mahony J., Luinstra K., Sellors J. et al. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1993. Vol. 31 P. 1753–1758.
16. Полянина Т. И., Голова И. В., Дружкин И. Н., Федотов Э. А., Федорова В. А. Апробация экспериментальной диагностической тест-системы для лабораторной диагностики хламидийной инфекции в дот-иммуноанализе // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: материалы междунар. конф. СПб., 2010 С.127.



17. URL: [http://www.vetlib.ru/infection\\_bolezni/page,5,93-diagnostika-klamidiozov-zhivotnyx-uchebno.html](http://www.vetlib.ru/infection_bolezni/page,5,93-diagnostika-klamidiozov-zhivotnyx-uchebno.html).
18. Clarke I. Chlamydial transformation: facing up to the challenge Proceedings // The Materials of the 12th Intern. Sympos. on Human Chlamydial Infections. Austria. Salzburg June, 20–25. 2010. P. 295–304.
19. Quint K., Van Doorn L. J., Kleter B. et al. A highly sensitive, multiplex broad-spectrum PCR – DNA – Enzyme Immunoassay and reverse hybridization assay for rapid detection and identification of *Chlamydia trachomatis* // J. of Molecular Diagnostics. Vol. 9(5). 2007. P. 631–638.
20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
21. Clarke I., Lockey S., Skilton R. et al. Plasmid evolution in *Chlamydia trachomatis* // Materials of the Sixth meeting of the European society for Chlamydia research. Denmark. Kopenhagen. July. 2008. P. 145–146.
22. Кутлин А. В., Дробышевская Э. И., Шаткин А. А. Иммунохимические и биологические свойства моноклональных антител к *Chlamydia trachomatis* // ЖМЭИ. 1996. № 1. С. 3–6.

УДК 615:616.379

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ АДАПТОГЕНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ



К. С. Эльбекьян<sup>1</sup>, А. Б. Муравьева<sup>1</sup>, Г. В. Шляхтин

<sup>1</sup>Ставропольская государственная медицинская академия  
Саратовский государственный университет  
E-mail: karinasgma@inbox.ru

В экспериментах на животных оценена эффективность терапевтического применения естественных антиоксидантов (мелаксена и тонизида) при экспериментальном сахарном диабете на состояние про- и антиоксидантной системы организма. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования мелаксена и тонизида для коррекции системы антиоксидантной защиты при экспериментальном сахарном диабете.

**Ключевые слова:** мелаксен, тонизид, диабет, антиоксидантные системы организма.

### Comparative Estimation of Natural Adaptogens Antioxidatic Activity when the Experimental Diabetes

K. S. Elbekjan, A. B. Muravjeva, G. V. Shlyakhtin

Experiments on animals gave opportunity to establish efficiency of natural antioxidant (melaxen, and tonizid) therapeutic application on a condition of pro- and antioxidant system of an organism when experimental diabetes. The received results testify to efficiency of melaxen and tonizid use, for correction of antioxidant protection system when an experimental diabetes.

**Key words:** melaxen, tonizid, diabetes, antioxidant system.

Одним из патогенетических факторов развития сахарного диабета (СД) является чрезмерная активация процессов свободнорадикального окисления (СРО). В этой связи изыскание и изучение механизма действия лекарственных средств, регулирующих свободнорадикальные процессы в организме при диабете, являются одними из важных направлений в фармакологии и токсикологии.

Современная антиоксидантная терапия представлена различными препаратами. Согласно результатам многочисленных исследований,

препараты корня женьшеня и некоторых близких ему растений отечественной дальневосточной флоры обладают адаптогенной, антиоксидантной активностью. Томским фармацевтическим объединением «БИОРИТМ» был предложен для клинических целей комплексный растительный препарат тонизид [1], в состав которого в качестве основных компонентов, наряду с женьшенем, входят действующие начала родиолы розовой, аралии и элеутерококка. Нам представлялось важным оценить активность такого комплекса, сопоставив с эффектом другого адаптогенного средства, мелаксена – синтетического аналога гормона шишковидной железы мелатонина [2].

Цель работы: оценить эффективность терапевтического применения естественных антиоксидантов (мелаксена и тонизида) при экспериментальном сахарном диабете на состояние про- и антиоксидантной системы организма.

### Материалы и методы

Эксперименты были проведены на лабораторных мышцах, у которых путем однократного подкожного введения аллоксана тетрагидрата в дозе 150 мг/кг был вызван аллоксановый диабет. Экспериментальных животных ( $n = 60$ ) делили на 6 групп: первая группа – интактные животные, вторая и третья – мыши, получавшие ежедневно в течение 14 дней тонизид (200 мг/кг) и мелаксен (0,1 мг/кг), четвертая – мыши с аллоксановым диабетом, пятая и шестая – животные, получавшие тонизид и мелаксен на фоне аллоксана. На 15-е сут наблюдений животных декапитировали,