

*На правах рукописи*

Эйдельштейн Инна Александровна

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ  
СЕМЕЙСТВА *CHLAMYDIACEAE***

03.00.07 - микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2004

Работа выполнена в Смоленской государственной медицинской академии  
НИИ Антимикробной химиотерапии

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАМН **Страчунский Леонид Соломонович**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Шмелева Елена Александровна**  
доктор биологических наук, **Раковская Ирина Валентиновна**

Ведущая организация: Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова

Защита диссертации состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2004 г. в \_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 001.007.01 в НИИ эпидемиологии и  
микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН по адресу:  
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ эпидемиологии и  
микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Е.В. Русакова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Микроорганизмы семейства *Chlamydiaceae* являются облигатными внутриклеточными паразитами. Различные представители данного семейства вызывают ряд заболеваний человека и животных, известных под общим названием «хламидиозов». Для многих хламидий характерна высокая видоспецифичность, однако некоторые виды *Chlamydiaceae* имеют широкий круг естественных хозяев, включающий представителей различных классов позвоночных животных. Наиболее распространенные хламидийные инфекции человека, вызываемые *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae* (биовар TWAR) носят антропонозный характер. Ряд других видов хламидий является причиной зоонозных заболеваний (A. Herring et al., 1987; D. Jorgensen, 1997). Хламидиозы характеризуются разнообразием клинических симптомов, могут протекать латентно или сопровождаться тяжелыми поражениями различных органов и систем. Характер и степень выраженности заболевания определяются принадлежностью возбудителя к определенному виду, биовару или серовару, поскольку многие штаммы хламидий проявляют тканеспецифичность, а также особенностями организма хозяина (B. Batteiger et al., 1989; C. Beaty et al., 1991; L. Eckert et al., 2000; K. Everett et al., 1999; C. Jantos et al., 1997).

*C. trachomatis*, открытая раньше других хламидий, в настоящее время рассматривается как самый распространенный бактериальный возбудитель заболеваний, передающихся половым путем. По данным ВОЗ, количество инфекций, вызываемых *C. trachomatis* во всем мире, ежегодно составляет около 90 млн. (C. Richey et al., 1999). При этом почти у 75% женщин и 50% мужчин урогенитальный хламидиоз протекает бессимптомно, что значительно усложняет эпидемиологический надзор за ним (А. Егоров и Ю. Сазыкин, 2000). Помимо инфекций, передающихся половым путем, *C. trachomatis* вызывает эндемичную трахому – заболевание, особенно широко распространенное в развивающихся странах Азии, Африки, Южной Америки и являющееся одной из наиболее распространенных причин потери зрения (Н. Зайцева, 1976).

*C. pneumoniae* известна в основном как возбудитель заболеваний респираторного тракта, с которым связывают от 10 до 20% случаев пневмоний и около 5% случаев бронхитов и синуситов (M. Hammerschlag, 2000). Кроме того, многие исследования, проведенные в последнее время, свидетельствуют о вероятной взаимосвязи между хронической инфекцией, вызванной *C. pneumoniae*, и развитием многих заболеваний, ранее не ассоциированных с инфекционной патологией, например, атеросклероза (R. Ellis, 1997; А. Сумароков и В. Панкратова 1999), бронхиальной астмы (C. Kuo et al., 1995), и некоторых заболеваний центральной нервной системы (B. Balin et al., 1998; C. Yucesan et al., 2001).

Значительно большую группу представляют виды семейства *Chlamydiaceae*,

патогенные для животных (А. Казанцев, 1973). Хламидийные инфекции наносят существенный экономический ущерб различным отраслям животноводства и птицеводства, вызывая гибель животных, аборт, рождение мертвого или нежизнеспособного приплода (П. Митрофанов, 1997). Некоторые виды возбудителей хламидиозов домашних и сельскохозяйственных животных, например, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis*, представляют угрозу спорадических заболеваний людей, особенно лиц, профессионально занятых в сельском хозяйстве (А. Herring et al., 1987; D. Jorgensen, 1997). Возможные пути передачи и опасность для человека других видов хламидий, вызывающих инфекции животных, до сих пор недостаточно изучены из-за отсутствия эпидемиологических данных.

Несмотря на разнообразие существующих диагностических методов, проблема идентификации представителей семейства *Chlamydiaceae* остается чрезвычайно актуальной. Культуральный метод, ранее рассматриваемый как «золотой стандарт», представляет собой трудоемкий и длительный процесс, требующий использования нескольких клеточных линий для поддержания роста различных видов, и доступный лишь в немногих лабораториях (С. Kuo and J. Grayston, 1990; S. Thompson and A. Washington, 1983). Серологические методы, вследствие кросс-реактивности основных антигенных детерминант хламидий, а также особенностей формирования иммунного ответа, недостаточно специфичны (R. Gonen et al., 1993; T. Moss et al., 1993; G. Ozanne and J. Lefebvre, 1992).

В последние годы интенсивно разрабатываются молекулярно-генетические методы обнаружения и типирования хламидий на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Значение этих методов существенно возросло в связи с накоплением данных о биологическом разнообразии представителей семейства *Chlamydiaceae* и фундаментальными изменениями их классификации, в основу которой положены принципы современной геносистематики (К. Everett and A. Andersen, 1997; К. Everett et al., 1999). ПЦР широко используется для выявления отдельных видов хламидий и, прежде всего, *C. trachomatis*. В то же время, известные в настоящее время универсальные методы типирования хламидий с использованием ПЦР являются недостаточно чувствительными для их прямого обнаружения в клиническом материале или требуют использования трудоемких процедур анализа ПЦР-продуктов (S. Holland et al., 1990; S. Rasmussen et al., 1992). Ни в одном из описанных в настоящее время методов ПЦР для универсального обнаружения *Chlamydiaceae* не предусмотрена возможность использования внутреннего стандарта, который позволяет выявлять ингибирование реакции.

Таким образом, широкий спектр заболеваний, вызываемых представителями семейства *Chlamydiaceae*, особенности течения хламидиозов человека и животных с часто сходной, но не всегда типичной клинической картиной, а также сложность идентификации хламидий с помощью стандартных

подходов, обуславливают необходимость разработки универсальных методов обнаружения и типирования возбудителей данной группы.

**Цель настоящей работы:** разработать молекулярно-генетические методы для выявления и дифференциации представителей семейства *Chlamydiaceae* и оценить эффективность предложенных методов при тестировании контрольных и клинических образцов в сравнении с альтернативными методами ПЦР.

**Задачи исследования:**

1. Разработать протоколы ПЦР-амплификации фрагментов гена *ompA*, обеспечивающие возможность обнаружения всех видов семейства *Chlamydiaceae* в клинических образцах как с использованием электрофоретического анализа продуктов реакции, так и в режиме реального времени.
2. Создать коллекцию штаммов *E. coli*, несущих клонированные амплификационные фрагменты гена *ompA* различных видов *Chlamydiaceae*, для использования в качестве контрольных ПЦР-матриц.
3. Определить нуклеотидные последовательности амплифицируемых фрагментов гена *ompA* у штаммов *Chlamydomonas pecorum* и *Chlamydia suis*.
4. Разработать систему дифференциации видов семейства *Chlamydiaceae* с использованием электрофореза амплификационных фрагментов *ompA* в присутствии сайт-специфического ДНК-лиганда - бисбензимида-ПЭГ.
5. Разработать методы выявления и дифференциации *Chlamydia* spp., *C. pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов (*C. psittaci*, *C. felis*, *C. abortus*) на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием неспецифического флуоресцентного красителя SYBR Green I и анализа кривых плавления ПЦР-продуктов, а также мультиплексной TaqMan ПЦР со специфическими зондами.
6. Создать гетерогенный внутренний стандарт ПЦР на основе гибридной последовательности ДНК фага  $\lambda$  для контроля ингибирования ПЦР.
7. Оценить чувствительность и специфичность предложенных способов выявления хламидий при тестировании контрольных и клинических образцов в сравнении с альтернативными методами на основе ПЦР.

**Научная новизна и практическая значимость работы**

Впервые:

- Показана возможность дифференциации видов хламидий путем электрофоретического разделения ПЦР-продуктов в агарозном геле с добавлением сиквенс-специфического ДНК-лиганда - бисбензимида-ПЭГ.
- Исследованы нуклеотидные последовательности амплифицируемых

фрагментов гена *ompA* у штаммов *C. pecorum* и *C. suis*.

- Разработан метод дифференциального выявления представителей семейства *Chlamydiaceae* с применением ПЦР в режиме реального времени и анализа кривых плавления ПЦР-продуктов в присутствии SYBR Green I.
- Разработаны специфические флуоресцентные зонды и предложена система дифференциального выявления патогенных для человека видов хламидий: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и возбудителей зоонозных инфекций с помощью мультиплексной TaqMan ПЦР.
- Создана коллекция штаммов *E. coli*, несущих клонированные фрагменты гена *ompA* различных видов *Chlamydiaceae*, для использования в качестве системы контроля качества предложенных ПЦР методов.
- Разработанные методы могут быть использованы для определения видовой принадлежности неизвестных штаммов хламидий в медицинских и ветеринарных лабораториях проводящих диагностику хламидийных заболеваний.
- Поданы заявки на изобретение:
  1. № 2003113244 от 05.05.2003 Способ дифференциальной диагностики представителей семейства *Chlamydiaceae*.
  2. № 2003113132 от 05.05.2003 Способ дифференциальной диагностики представителей семейства *Chlamydiaceae*.
  3. № 2003113544 от 08.05.2003 Способ дифференциальной диагностики *Chlamydia* spp., *Chlamydophila pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов.

**Апробация работы.** Результаты исследования доложены на 9 Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Берлин, 1999), 4-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний» (Москва, 2002), межкафедральном заседании СГМА (Смоленск, 2002), XXIII межобластной научно-практической конференции терапевтов Центра и Запада России, а также 14 Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Прага, 2004). Диссертация апробирована 12 апреля 2004 года, в НИИ антимикробной химиотерапии СГМА.

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 4 – в зарубежной печати.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 116 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 225 источника, из них 14 отечественных и 211 иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования. Штаммы хламидий, использованные в работе приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Характеристика контрольных штаммов хламидий.

№	Вид	Штамм	Материал	Источник*
1	<i>Chlamydia trachomatis</i>	L2	Очищенные ЭТ	1
2	<i>Chlamydia muridarum</i>	MoPn	ДНК	2
3	<i>Chlamydia suis</i>	S45	ДНК	2
4	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Kajaani 7	Очищенные ЭТ	1
5	<i>Chlamydophila psittaci</i>	6 BC	ДНК	2
6	<i>Chlamydophila abortus</i>	B577	ДНК	2
7	<i>Chlamydophila abortus</i>	CP 16	Очищенные ЭТ	1
8	<i>Chlamydophila felis</i>	FEPN	ДНК	2
9	<i>Chlamydophila pecorum</i>	LW613	ДНК	2
10	<i>Chlamydophila pecorum</i>	66p130	ДНК	2
11	<i>Chlamydophila pecorum</i>	L71	ДНК	2
12	<i>Chlamydophila pecorum</i>	1710S	ДНК	2
13	<i>Chlamydophila caviae</i>	GPIC	ДНК	4
14	<i>Chlamydophila</i> spp.	KC-93	Очищенные ЭТ	3
15	<i>Chlamydophila</i> spp.	250	Очищенные ЭТ	3
16	<i>Chlamydophila</i> spp.	Ростиново-70	Очищенные ЭТ	3
17	<i>Chlamydophila</i> spp.	ПП-87	Очищенные ЭТ	3

\* Штаммы предоставлены: 1 - P. Saikku (National Public Health Institute, Финляндия); 2 - А. Е. Гуциным (ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия); 3 - А. Р. Садриевым (Казанский НИИ ветеринарии, Казань, Россия); 4 - В. В. Демкиным (Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия).

На этапе оптимизации ПЦР в качестве модельной матрицы использовались образцы моноцитов крови, содержащие  $\approx 200$  нг ДНК человека, с добавлением ЭТ *C. trachomatis* или *C. pneumoniae* в титре 3 – 10000 ЭТ/мкл. Специфичность ПЦР с выбранными праймерами оценивали на образцах ДНК следующих видов микроорганизмов: *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Gardnerella vaginalis*, *Micrococcus luteus*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*. Урогенитальные образцы (n=219), полученные от пациентов с воспалительными заболеваниями органов женской репродуктивной системы, использовали для сравнения чувствительности и специфичности обнаружения *C. trachomatis* с помощью предложенных в настоящей работе методов и коммерческой ПЦР-диагностической системы «АмплиСенс *C. trachomatis*» (ЦНИИ

эпидемиологии МЗ РФ). Диагностические параметры методов ПЦР в режиме реального времени определяли также путем слепого анализа контрольных образцов с заданным содержанием ДНК *C. trachomatis* (0, 14, 178 и 2280 геномэквивалентов), предоставленных в рамках международной программы контроля качества ПЦР-диагностики «Quality Control for Molecular Diagnostics, 2003» (QCMD, Великобритания).

**Выделение ДНК из клинических образцов.** Для сравнения эффективности выделения ДНК использовали: 1) метод быстрой очистки ДНК с помощью Chelex-100, 2) лизис в буфере, содержащем неионные детергенты и протеиназу К, 3) ДНК-сорбционный метод (коммерческий набор ДНК-сорб Б, ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ).

**ПЦР-амплификация.** Амплификацию фрагмента гена *ompA* проводили с использованием семейственно специфичных праймеров CM1 (5'- CAG GAC ATC TTG TCT GGC TT-3') и CM2 (5'- CAA GGA TCG CAA GGA TCT CC -3') (H. Yoshida et al, 1998). Продукты ПЦР анализировали путем электрофоретического разделения в 3,5% агарозном геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия (2 мкг/мл). При оптимизации ПЦР подбирали концентрации компонентов реакционной смеси и температурный режим амплификации, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность обнаружения ДНК хламидий.

**Клонирование и определение нуклеотидных последовательностей 5'-концевых фрагментов *ompA*.** Для получения панели контрольных штаммов амплификационные фрагменты *ompA* 12 хламидийных штаммов: *C. trachomatis* L2, *C. muridarum* MoPn, *C. suis* S45, *C. pneumoniae* Kajaani 7, *C. psittaci* 6BC, *C. abortus* B577, *C. felis* FEPN, *C. pecorum* LW613, 66p130, L71, 1710S и *C. cavia* GPIC клонировали в составе вектора pGEM-T в реципиентный штамм *E.coli* TOP10. Клонированные фрагменты ДНК пяти хламидийных штаммов: *C. suis* S45, *C. pecorum* LW613, 66p130, L71 и 1710S секвенировали с использованием 0,5 - 0,7 мкг каждой плазмиды в качестве матрицы, праймеров M13F-20 и M13R (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' и 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), наборов CEQ DTCS и автоматического флуоресцентного секвенатора CEQ-2000 (Beckman Coulter, США) в лаборатории Евроген (Москва, Россия).

**Получение гетерогенного внутреннего стандарта ПЦР.** Для создания гетерогенного внутреннего стандарта (ВС) ПЦР использовали фрагмент ДНК фага  $\lambda$  с заданной длиной (301 пн), G/C-насыщенностью (50,4%) и отсутствием прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей. Выбранный сегмент фланкировали сайтами связывания праймеров CM1 и CM2 путем ПЦР-амплификации  $\lambda$  ДНК с помощью гибридных праймеров, содержащих 3'-концевые  $\lambda$ -специфические последовательности и участки, гомологичные CM1 и CM2 на 5' концах  $\lambda$ HYB1 (5'- CAG GAT ATC TTG TCT GGC TTA TCG GGA TGA TTA CGG

TCC-3') и λHYB2 (5'- CAA GGA TCG CAA GGA TCT CCG CAT GGA TTC TGT CGA CC-3'). Результирующий ПЦР-фрагмент (341 пн) клонировали в составе вектора pCR2.1 в реципиентный штамм *E.coli* TOP10. Для подтверждения клонирования заданного фрагмента проводили выделение и рестрикционный анализ полученной плазмиды (pIS3.2) с помощью эндонуклеаз *AvaII* и *PvuII*. Оптимальную концентрацию pIS3.2, используемой в качестве ВС ПЦР, подбирали путем тестирования последовательных разведений плазмиды в реакциях с минимальным детектируемым количеством ДНК хламидий.

**Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в присутствии бисбензимида-ПЭГ.** Для дифференциации различных видов хламидий использовали электрофоретическое разделение специфических продуктов амплификации в присутствии сайт-специфического ДНК лиганда – бисбензимида-ПЭГ (Би-ПЭГ; H.A.Yellow, Hanse Analytic, Германия). Лиганд добавляли в предварительно расплавленный и охлажденный до 50°C агарозный гель (3,5% в 0,5x TBE буфере) до конечной концентрации 1 ед./мл.

**ПЦР в режиме реального времени.** ПЦР в режиме реального времени проводили на системе Rotor-Gene 2000 (Corbett Research, Австралия) с использованием двух подходов. В первом случае накопление продуктов амплификации *ompA* в последовательных циклах ПЦР наблюдали по нарастанию флуоресценции SYBR Green I, а разделение патогенных для человека видов: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и возбудителей зоонозов, осуществляли на основании анализа кривых плавления продуктов ПЦР.

Во втором варианте использовали мультиплексную TaqMan ПЦР с четырьмя разработанными зондами, содержащими различные флуоресцентные метки на 5' конце и гасители флуоресценции BHQ-типа на 3' конце: IS146 – 6FAM-5'-CGG AAC GAT GCC ATT CTG CTT AT-3'-BHQ-1, CTR – JOE-5'-ATC CTG CTG AAC CAA GCC TTA TGA T-3'-BHQ-1, CPN – ROX-5'-ACC CTT CTG ATC CAA GCT TAT TAA TTG AT-3'-BHQ-2 и CPS – Cy5-5'-CCA GCT GAA CCA AGT TTA TTA ATC GAT G-3'-BHQ-3, для селективного детектирования ВС, амплификационных фрагментов *ompA Chlamydia* spp., *C. pneumoniae* и возбудителей зоонозных инфекций (*C. psittaci*, *C. felis*, *C. abortus*), соответственно.

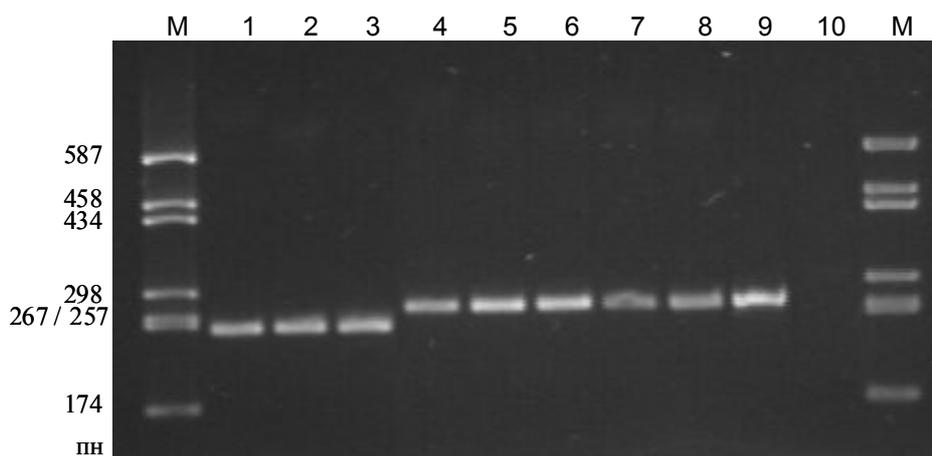
В процессе оптимизации различных вариантов ПЦР подбирали температурный режим, число и продолжительность циклов амплификации, соотношение зондов и праймеров, концентрацию  $Mg^{2+}$ , обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность обнаружения ДНК хламидий в присутствии ВС и избытка ДНК человека (200 нг).

**Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей.** Выравнивание и анализ гомологии нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalX в. 1.64b (EMBL). Выбор и анализ

олигонуклеотидных зондов и праймеров, а также дизайн ВС ПЦР проводили с помощью программ Gene Runner в. 3.05 (Hastings Software, США) и MeltCalc в. 99 (E. Schütz & N. Von Ahsen, Германия). Проверку на наличие в различных нуклеотидных последовательностях сайтов неспецифической гомологии для выбранных праймеров и зондов проводили с использованием поисковой системы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, NCBI, США).

### Результаты и обсуждение

**ПЦР-амплификация и анализ фрагмента последовательности *ompA* различных видов хламидий.** ПЦР с использованием выбранных праймеров позволила амплифицировать ДНК-фрагменты с ожидаемой молекулярной массой (245-249 пн) у всех контрольных штаммов хламидий (Рис. 1). Представители родов *Chlamydia* и *Chlamydophila* могут быть дифференцированы с помощью электрофоретического разделения амплификационных фрагментов *ompA* в обычном агарозном геле, благодаря различиям в их молекулярной массе.

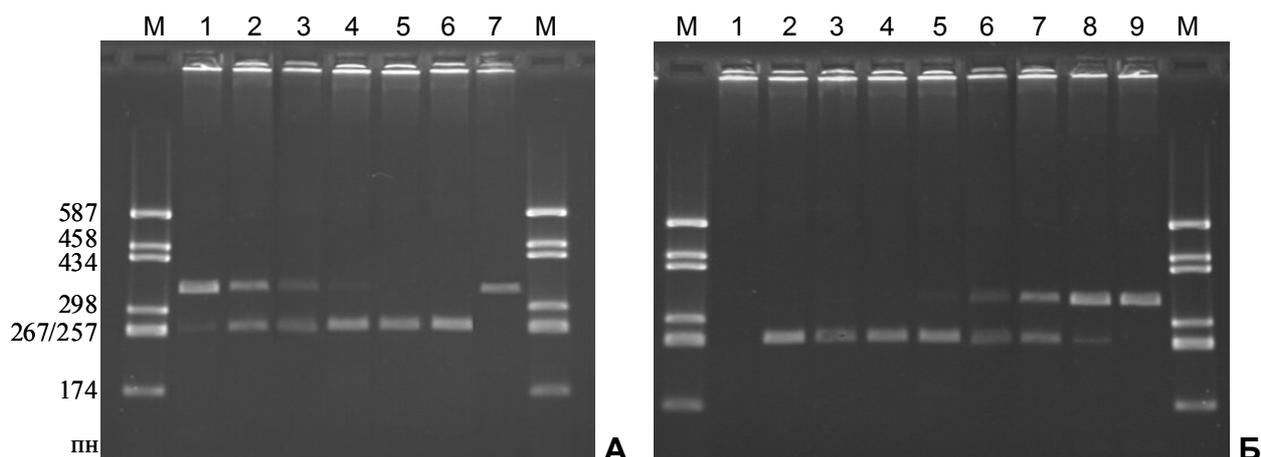


**Рис. 1.** Электрофоретическое разделение ПЦР-фрагментов *ompA*

M - маркер молекулярной массы (pUC 18-*Hae* III); 1 - *C. trachomatis* L2; 2 - *C. muridarum* MoPn; 3 - *C. suis* S45; 4 - *C. pneumoniae* Kajaani 7; 5 - *C. psittaci* 6BC; 6 - *C. abortus* B577; 7 - *C. felis* FEPN; 8 - *C. pecorum* LW613; 9 - *C. cavia* GPIC; 10 - отрицательный контроль.

В результате тщательной оптимизации состава ПЦР-смеси и протокола амплификации выбраны условия, обеспечивающие воспроизводимое, специфическое детектирование 2-5 копий ДНК любого из 9 видов хламидий в присутствии избытка ДНК человека (200 нг) и 600 копий плазмиды pIS3.2, используемой в качестве внутреннего стандарта (Рис. 2).

До проведения данного исследования полные нуклеотидные последовательности амплифицируемого участка *ompA* были получены для всех видов хламидий, за исключением *C. pecorum* и *C. suis*. В связи с этим, нами исследованы последовательности клонированных фрагментов *ompA* у штаммов *C. pecorum* LW613, 66p130, L71, 1710S и *C. suis* S45.



**Рис. 2.** Чувствительность обнаружения ВС и ДНК *C. pneumoniae* с помощью электрофоретического анализа продуктов ПЦР

**А:** Титрование rIS3.2 в ПЦР с фиксированным количеством ДНК *C. pneumoniae* (13 геном-эквивалентов). Дорожка М - маркер молекулярной массы (pUC 18-*Hae* III); 1 -  $6 \times 10^5$  копий ВС; 2 -  $6 \times 10^4$  копий ВС; 3 - 6000 копий ВС; 4 - 600 копий ВС; 5 - 60 копий ВС; 6 - 6 копий ВС; 7 - 600 копий ВС без хламидийной ДНК

**Б:** Чувствительность детектирования ДНК *C. pneumoniae* в присутствии фиксированного количества ВС (600 копий) и ДНК человека (200 нг). Дорожка 1 - ДНК человека; 2 - 46875; 3 - 9375; 4 - 1875; 5 - 375; 6 - 75; 7 - 15; 8 - 3; 9 - 0 геном-эквивалентов

Согласно проведенному нами анализу, различия в последовательностях исследуемого фрагмента составляют от 24,6 до 30% между видами *Chlamydia* и *Chlamydophila*. При этом, различия между видами внутри рода *Chlamydia* не превышают 6,1%. Установленная нами нуклеотидная последовательность *C. suis* S45 полностью совпадает с короткими (127-157 пн) 3'-концевыми последовательностями анализируемого участка у штаммов S45, H5, R19, pm220, PCLH296, pmd1340, pmsh47 и pm197 (GenBank № AF269274, AF269275, AF269270, AJ005616, AJ004880, AJ004879, AJ004878, AJ004877), описанными ранее. Межвидовые различия в пределах рода *Chlamydophila* выражены в большей степени – до 20,6% между *C. cavia* и *C. pecorum*. Следует однако отметить, что все штаммы *C. psittaci* и *C. abortus* проявляют 100% идентичность по нуклеотидной последовательности 5'-концевого фрагмента *ompA*, вследствие чего не могут быть дифференцированы на основании анализа исследуемого участка генома. Два других вида – *C. felis* и *C. cavia*, ранее входивших в группу *Chlamydia psittaci*, проявляют, соответственно, 97,6 и 98% гомологии со штаммами, относящимися к *C. psittaci* согласно новой классификации. *C. pneumoniae* отличается от видов данной группы приблизительно на 15,5%, а штаммы *C. pecorum* формируют наиболее генетически удаленную группу, в среднем отличаясь по последовательности фрагмента *ompA* от *C. pneumoniae* и 4 видов, выделенных из *C. psittaci*, соответственно на 17,5 и 19,7%. Различия между 4 исследованными штаммами *C. psittaci* составили 0,4-1,6%. При этом установлено полное совпадение коротких (131 пн) 3'-концевых фрагментов

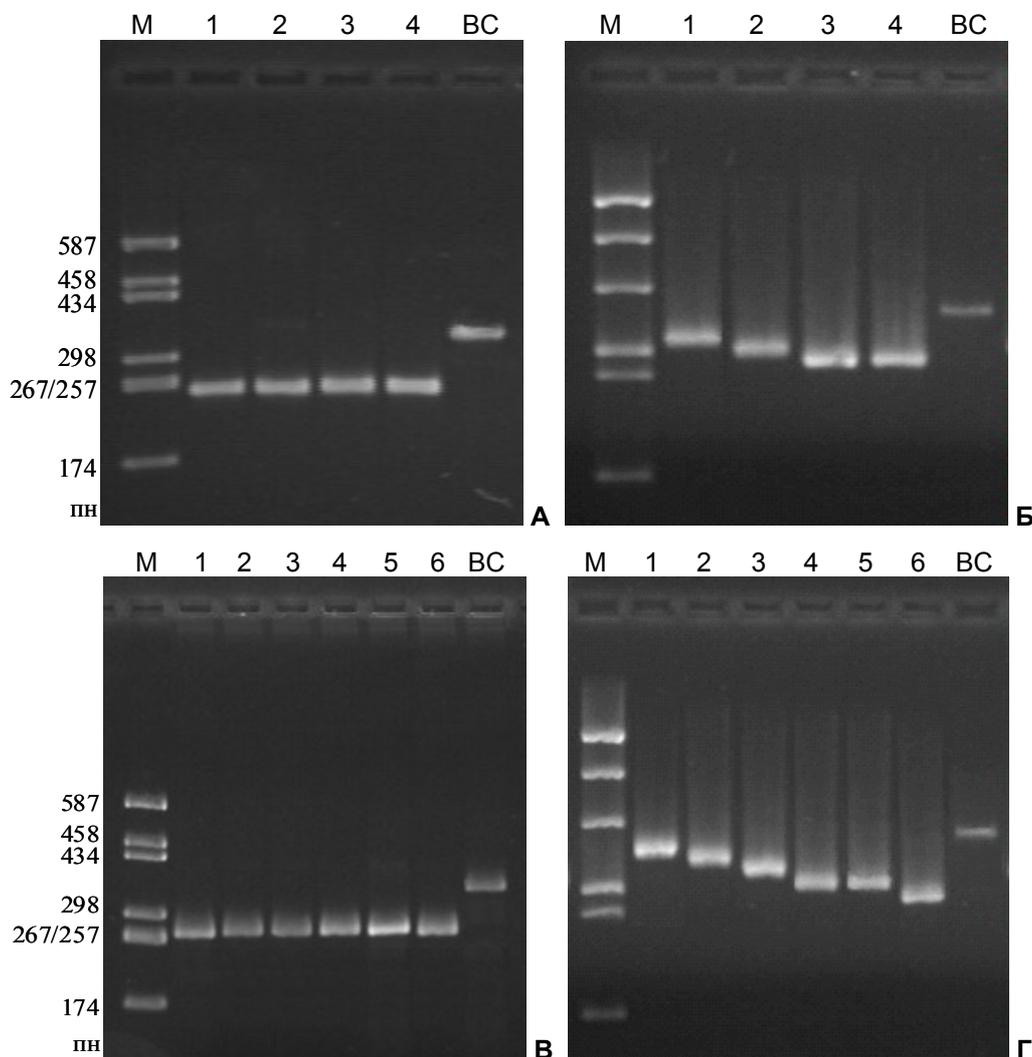
последовательности описанных ранее (GenBank № AF269280, AF269279) и полученных нами для штаммов L71 и 1710S. Два других штамма: 66p130 и LW613, последовательности которых были исследованы впервые, отличаются делецией одного нуклеотида и наиболее близки по структуре 3'-концевого фрагмента изоляту P787 (GenBank № Z18756). В целом, результаты филогенетического анализа, проведенного на основании сравнения последовательностей 5'-концевого участка *ompA*, хорошо коррелируют с данными К. Everett и соавт. (1999) по сравнению последовательностей генов 16S рРНК, положенными в основу современной систематики хламидий. Выбранный фрагмент генома отличается высокой внутривидовой консервативностью (98,3-100% гомологии для каждого вида). В то же время, выраженные различия в его структуре между видами позволяют рассматривать его в качестве перспективной мишени для детектирования и дифференциации представителей семейства *Chlamydiaceae*.

#### **Дифференциация представителей семейства *Chlamydiaceae* путем электрофоретического разделения в геле с добавлением Би-ПЭГ.**

Гельэлектрофорез в присутствии сайт-специфических ДНК-лигандов является простым и, в то же время, эффективным методом разделения ДНК фрагментов, обладающих одинаковой молекулярной массой, но отличающихся по нуклеотидной последовательности (С. Wawer et al., 1995). Известно, что бисбензимидазол, связанный с высокомолекулярным полиэтиленгликолем, при добавлении в агарозный гель позволяет эффективно разделять ПЦР-фрагменты, даже незначительно отличающиеся по числу и структуре участков связывания данного лиганда – тетра-А/Т сайтов (М. Müller et al., 1997).

Предварительный анализ последовательностей *ompA* показал относительно высокую консервативность структуры сайтов связывания Би-ПЭГ в амплифицируемых последовательностях каждого вида хламидий. Вместе с тем, различия в числе и характере А/Т-повторов между видами позволили нам разработать метод их дифференциации с помощью электрофореза ПЦР-фрагментов *ompA* в геле с Би-ПЭГ. На рисунке 3 представлены результаты электрофоретического разделения амплификационных фрагментов *ompA* различных видов хламидий в стандартном агарозном геле, а также в геле содержащем ДНК-лиганд. Незначительные различия в молекулярной массе ПЦР-фрагментов не позволяют дифференцировать отдельные виды в пределах рода *Chlamydia* и рода *Chlamydophila* при разделении в агарозном геле (Рис. 3А, 3В). В то же время, добавление в гель Би-ПЭГ приводит к четкой дифференциации по подвижности амплификационных фрагментов, полученных от разных видов, за счет различий в их нуклеотидной последовательности и эффективности связывания с лигандом. Электрофоретическая подвижность фрагментов *ompA* возрастает для рода *Chlamydia* в следующем порядке: *C. trachomatis* (D-K) < *C. trachomatis* L2 < *C. muridarum* = *C. suis* (Рис. 3Б), а для рода *Chlamydophila*:

*C. pecorum* < *C. pneumoniae* < *C. felis* < *C. psittaci* = *C. abortus* < *C. caviae* (Рис. 3Г). ВС обладает наименьшей подвижностью. Результаты многократного повторного тестирования свидетельствуют о высокой воспроизводимости разделения амплификационных фрагментов *ompA* в геле, содержащем Би-ПЭГ.



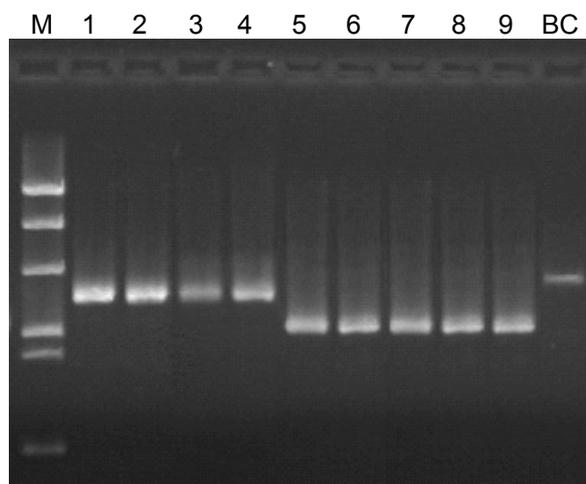
**Рис. 3.** Разделение ПЦР-фрагментов *ompA* представителей семейства *Chlamydiaceae* в обычном геле (**А, В**) и в геле с добавлением Би-ПЭГ (**Б, Г**)

**А и Б:** Дорожка М - маркер молекулярной массы (pUC 18-*Hae* III); 1 - *C. trachomatis* E; 2 - *C. trachomatis* L2; 3 - *C. muridarum* MoPn; 4 - *C. suis* S45; ВС – внутренний стандарт

**В и Г:** 1 - *C. pecorum* LW613; 2 - *C. pneumoniae* Kajaani 7; 3 - *C. felis* FEPN; 4 - *C. psittaci* 6BC; 5 - *C. abortus* B577; 6 - *C. caviae* GPIC

Полученные результаты хорошо согласуются с данными анализа числа и структуры тетра-А/Т повторов в амплифицируемых последовательностях и подтверждают теоретические положения о механизмах связывания Би-ПЭГ с ДНК (M. Müller et al., 1997). Метод Би-ПЭГ электрофореза был использован нами для типирования штаммов КС-93, 250, Ростиново-70, ПП-87, выделенных из паренхиматозных органов абортрованного плода или плаценты различных животных: собаки, песца, коровы и овцы, и предоставленных Казанским НИИ

ветеринарии. Фрагменты ДНК, полученные в результате амплификации этих изолятов, а также контрольных штаммов *C. psittaci* и *C. abortus* с помощью праймеров CM1-CM2, обладали одинаковой электрофоретической подвижностью в геле с Би-ПЭГ (Рис. 4). Согласно новой классификации к виду *C. psittaci* принадлежат только штаммы, вызывающие заболевания птиц. Таким образом, исследованные нами изоляты были отнесены к *C. abortus*.



**Рис. 4.** Типирование штаммов *C. pecorum*, *C. abortus* и неизвестных хламидийных изолятов из коллекции Казанского НИИ ветеринарии с помощью Би-ПЭГ электрофореза ПЦР-фрагментов *ompA*

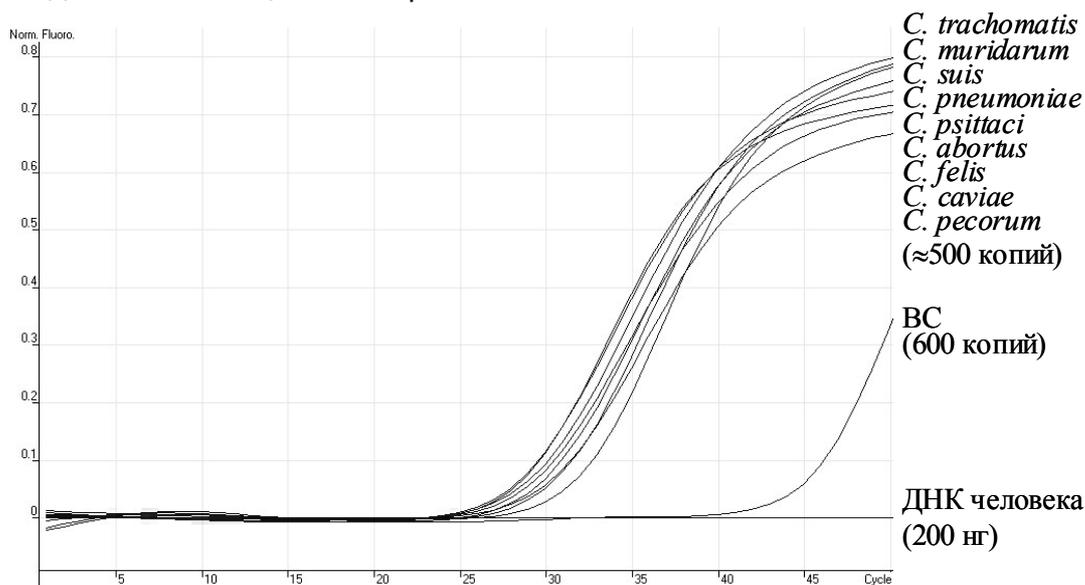
Дорожка М - маркер (pUC 18-*Hae* III); 1 - *C. pecorum* LW613; 2 - *C. pecorum* 66p130; 3 - *C. pecorum* L71; 4 - *C. pecorum* 1710S; 5 - *C. abortus* B577; 6 - Ростиново-70; 7 - ПП-87; 8 - КС-93; 9 - 250; BC - внутренний стандарт

Предложенный подход позволяет дифференцировать все виды *Chlamydiaceae*, за исключением *C. muridarum* и *C. suis*, а также *C. psittaci* и *C. abortus*, которые, однако, вызывают заболевания у разных животных. Обладая высокой воспроизводимостью, он является значительно менее длительным, трудоемким и дорогостоящим по сравнению с методами рестрикционного анализа ПЦР-продуктов и не требует применения сложного оборудования и дорогостоящих реактивов.

**Выявление и типирование представителей семейства *Chlamydiaceae* с помощью ПЦР в режиме реального времени и анализа кривых плавления с SYBR Green I.** Параллельно с разработкой метода электрофоретического анализа амплификационных фрагментов *ompA* нами была исследована возможность выявления и типирования представителей семейства *Chlamydiaceae* с помощью методов ПЦР в режиме реального времени. Введение в состав ПЦР-смеси интеркалирующего флуоресцентного красителя - SYBR Green I и модификация температурного режима реакции позволили разработать протокол одновременной амплификации и анализа продуктов ПЦР в формате закрытой пробирки.

Чувствительность и специфичность окончательного варианта

амплификации с SYBR Green I были идентичны таковым для стандартного метода ПЦР с электрофоретическим детектированием продуктов. Наличие неспецифических продуктов амплификации ДНК человека и неродственных микроорганизмов не было обнаружено. Сравнение значений пороговых циклов (Ct) свидетельствует об одинаковой эффективности амплификации клонированных фрагментов *ompA* всех 9 видов хламидий с помощью праймеров CM1 и CM2 при равной стартовой концентрации плазмид. На рисунке 5 представлены нормализованные кривые изменения флуоресценции SYBR Green I в последовательных циклах ПЦР.

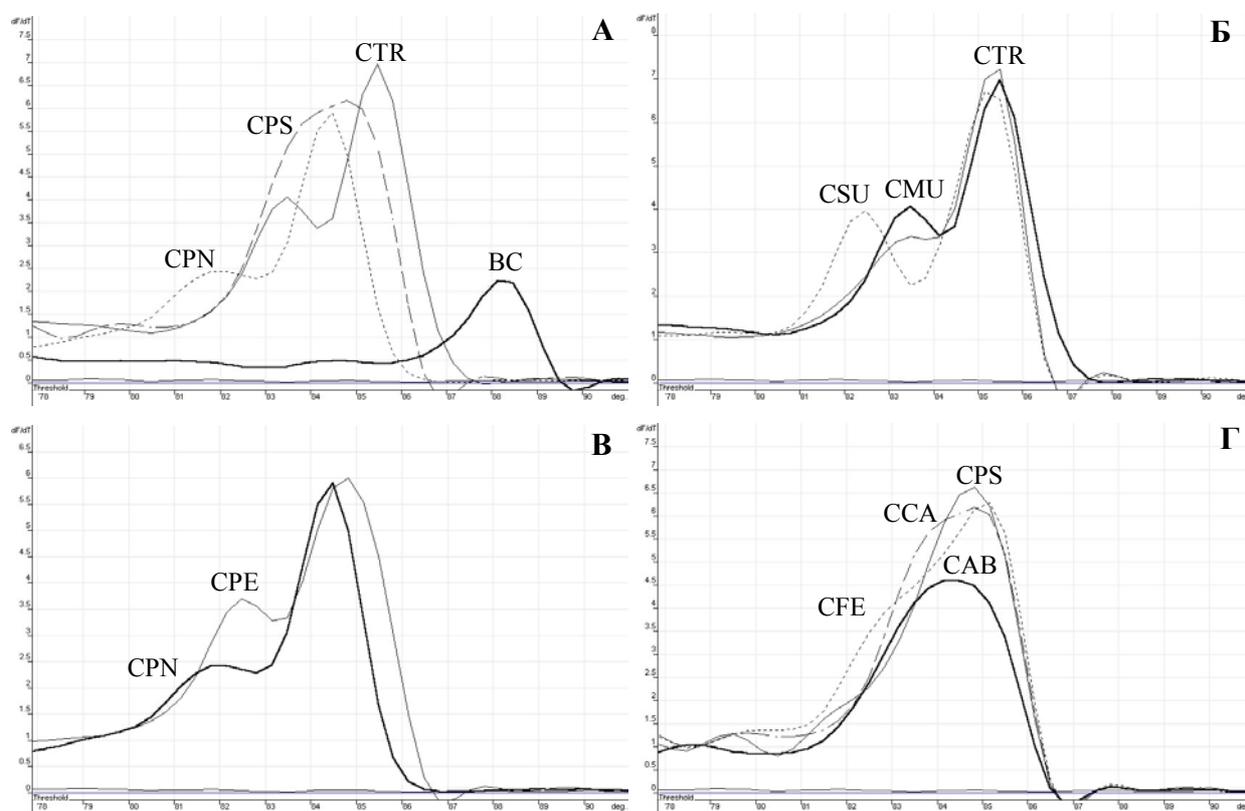


**Рис. 5.** ПЦР-амплификация фрагментов гена *ompA* различных видов *Chlamydiaceae* и ВС в режиме реального времени с SYBR Green I

Постамплификационный анализ кривых плавления ПЦР-фрагментов *ompA* позволяет проводить их дифференциацию за счет различий в температурах плавления ВС и различных видов *Chlamydiaceae* (88°C против 82,6-86,1°C). При этом кривые плавления хламидийных ампликонов характеризуются наличием двух пиков, отражающих двухэтапную диссоциацию цепей ДНК в участках с разной А/Т-насыщенностью, а их принадлежность к определенной группе может быть установлена путем сравнения пиков плавления: 84,1°C и 86,1°C – для *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*; 82,6°C и 85,1°C – для *C. pneumoniae*, *C. pecorum*; 84,4°C и 85,5°C (неразделенные или частично разделенные пики) – *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis* и *C. caviae* (Рис. 6).

Анализ кривых плавления амплификационных фрагментов *ompA* не является способом видовой идентификации хламидий, поскольку некоторые виды характеризуются сходными или неразличимыми профилями плавления. К их числу относятся виды *Chlamydia* (Рис. 6Б), *C. pneumoniae* и *C. pecorum* (Рис. 6В), а также виды, ранее входившие в группу *Chlamydia psittaci* (Рис. 6Г). Тем не менее,

данный подход позволяет дифференцировать основные группы патогенных для человека хламидий: 1) *C. trachomatis*, 2) *C. pneumoniae* и 3) возбудителей зоонозных инфекций (*C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*).



**Рис. 6.** Анализ кривых плавления Продуктов ПЦР с SYBR Green I

**А:** Основные патогенные для человека виды; **Б:** *Chlamydia* spp., **В:** *C. pneumoniae* и *C. pecorum*; **Г:** «группа *C. psittaci*»; CTR - *C. trachomatis*; CMU - *C. muridarum*; CSU - *C. suis*; CPN - *C. pneumoniae*; CPS - *C. psittaci*; CAB - *C. abortus*; CFE - *C. felis*; CPE - *C. pecorum*; BC – внутренний стандарт

Метод ПЦР в режиме реального времени с SYBR Green I обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для прямого обнаружения различных видов хламидий в образцах клинического материала, полученного от человека и животных. Благодаря детектированию в формате закрытых пробирок и отсутствию необходимости постаmplификационных манипуляций с продуктами ПЦР, этот подход позволяет существенно сократить продолжительность и трудоемкость исследований, практически исключает риск появления ложноположительных результатов вследствие контаминации продуктами ПЦР.

**Идентификация *Chlamydia* spp., *Chlamydophila pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов с помощью мультиплексной TaqMan ПЦР.** С целью дифференциального обнаружения представителей семейства *Chlamydiaceae*, включая все патогенные для человека виды, разработан альтернативный метод ПЦР в режиме реального времени на основе технологии мультиплексной TaqMan ПЦР (5'-экзонуклеазный метод). Предложенный подход

предполагает возможность универсальной амплификации фрагмента гена *ompA*, фланкированного участками связывания праймеров CM1-CM2, и селективного выявления в одной пробирке *Chlamydia* spp., *C. pneumoniae*, возбудителей зоонозных инфекций (*C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*) и ВС с помощью зондов, содержащих различные флуоресцентные метки. Анализ большого числа известных к началу исследования нуклеотидных последовательностей *ompA* позволил выбрать участки связывания зондов в районе первого консервативного домена *ompA*, обладающие 100% идентичностью и, одновременно, специфичностью для каждой группы выявляемых видов (Таб. 2).

**Таблица 2.** Характеристика разработанных зондов

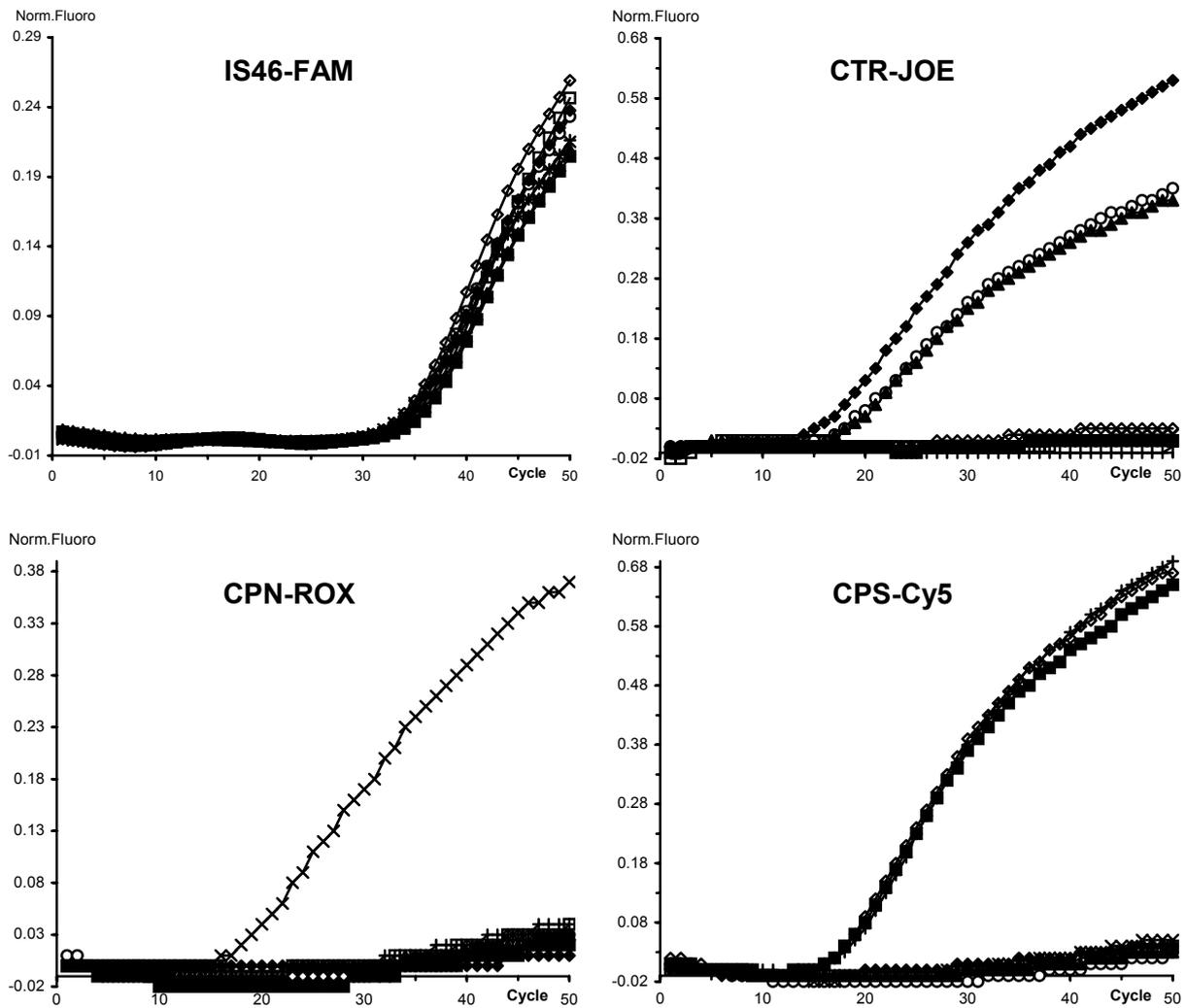
Мишень	Зонд	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	Число послед-тей*	Идентичность, %
ВС	5' 6-FAM-d(N) <sub>23</sub> -BHQ-1 3'	470/510		
<i>Chlamydia</i> spp.:	5' JOE-d(N) <sub>25</sub> -BHQ-1 3'	530/555	83	100
<i>C. trachomatis</i>			63	100
<i>C. muridarum</i>			5	100
<i>C. suis</i>			15	100
<i>C. pneumoniae</i>	5' ROX-d(N) <sub>29</sub> -BHQ-2 3'	585/610	8	100
Зоонозная группа:	5' Cy5-d(N) <sub>28</sub> -BHQ-3 3'	625/660	38	100
<i>C. psittaci</i>			21	100
<i>C. abortus</i>			14	100
<i>C. felis</i>			3	100

\* Число последовательностей *ompA*, найденных в BLAST.

Выбранные зонды удовлетворяют следующим основным требованиям: 1) не проявляют случайную гомологию с неродственными нуклеотидными последовательностями; 2) не превышают по длине 29 нуклеотидов, что обеспечивает эффективное гашение флуорофоров в интактных зондах; 3) характеризуются G/C-насыщенностью от 35 до 48% и расчетной температурой плавления ( $T_m$ ) на 7-8°C выше  $T_m$  праймеров; 4) отличаются высоким содержанием С и отсутствием 5'-концевых G-нуклеотидов, что способствует эффективному разгоранию флуорофоров при 5'-эксонуклеазном расщеплении зондов; 5) обладают меньшей тугоплавкостью на 3'-конце; 6) не содержат поли-G/C повторов и участков, формирующих нежелательные вторичные структуры или допускающих комплементарное связывание зондов друг с другом и с праймерами, что позволяет использовать их в мультиплексной ПЦР.

Результаты амплификации ДНК 9 видов хламидий (в виде очищенных ЭТ или плазмид, несущих клонированные фрагменты *ompA*, в концентрации  $\approx 8$  млн. копий/ПЦР) в присутствии ВС (600 копий) и ДНК человека (200 нг) свидетельствуют об отсутствии перекрестного выявления *Chlamydia* spp.,

*C. pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов с помощью соответствующих зондов (Рис. 8).



ДНК-мишень	Результат детектирования с зондами			
	FAM-IS146	JOE-CTR	ROX-CPN	Cy5-CPS
▣ только BC	+	-	-	-
○ <i>C. trachomatis</i> + BC	+	+	-	-
◆ <i>C. muridarum</i> + BC	+	+	-	-
▲ <i>C. suis</i> + BC	+	+	-	-
× <i>C. pneumoniae</i> + BC	+	-	+	-
◇ <i>C. psittaci</i> + BC	+	-	-	+
■ <i>C. abortus</i> + BC	+	-	-	+
+ <i>C. felis</i> + BC	+	-	-	+
— <i>C. caviae</i> + BC	+	-	-	-
— <i>C. pecorum</i> + BC	+	-	-	-

**Рис. 8.** Дифференциальное обнаружение различных видов хламидий с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

Дифференциальное обнаружение этих видов оказывается возможным благодаря различиям в 2-7 нуклеотидных позициях в участках связывания зондов

и отсутствию спектрального перекрытия флуоресцентных сигналов с используемыми светофильтрами. Неспецифическое взаимодействие зондов с ДНК неродственных микроорганизмов не установлено.

Аналитическая чувствительность TaqMan ПЦР исследована путем тестирования серии последовательных разведений плазмид, несущих клонированные фрагменты *ompA* *S. trachomatis* (pGEM-T-CTR), *S. pneumoniae* (pGEM-T-CPN) и *S. psittaci* (pGEM-T-CPS). Зависимость значений  $C_T$  от логарифма начального числа копий плазмид была линейной в диапазоне от 7 до 7 млн. копий pGEM-T-CTR и pGEM-T-CPS и от 70 до 7 млн. копий pGEM-T-CPN (Рис. 9). Предел детектирования составил 1-2 копии для всех плазмид.

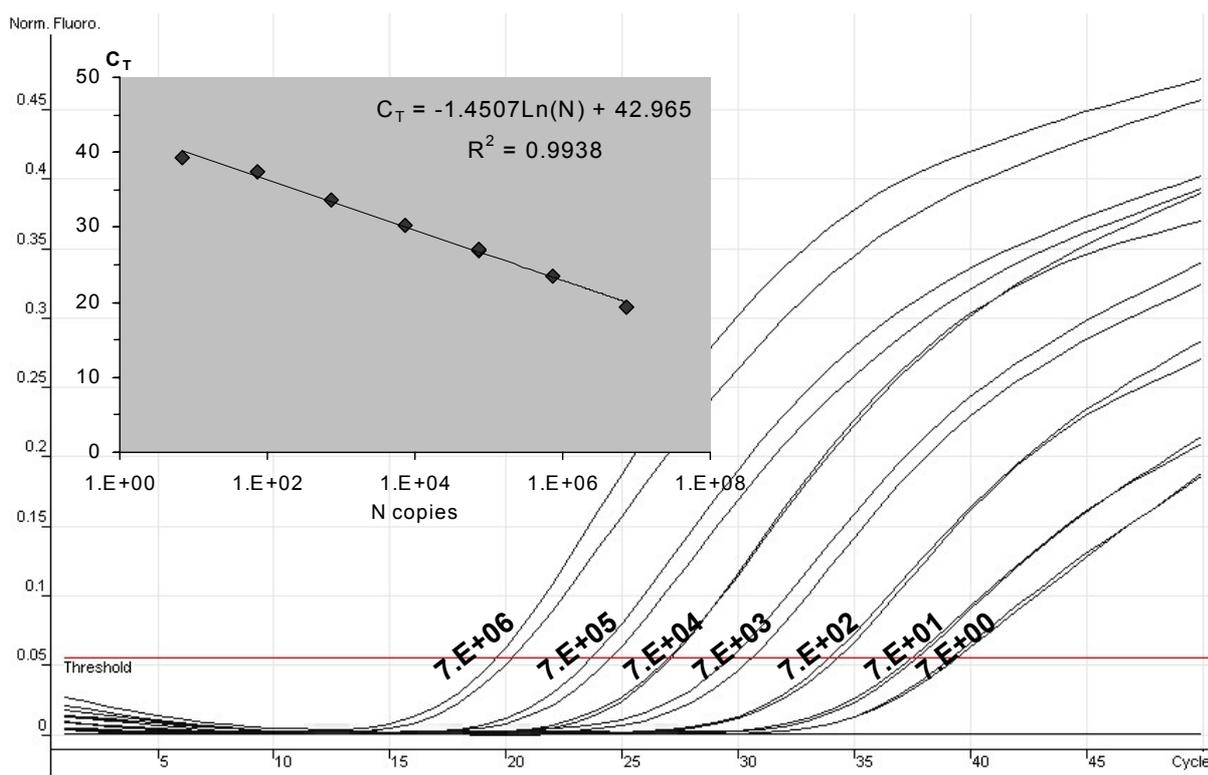


Рис. 9. Определение числа копий *ompA* *S. trachomatis* с помощью TaqMan ПЦР

Таким образом, метод TaqMan ПЦР может быть использован для количественного или полуколичественного определения хламидийной ДНК в анализируемых образцах. Дополнительным преимуществом TaqMan ПЦР по сравнению с другими предложенными нами методами является большая точность и воспроизводимость детектирования низких концентраций ДНК хламидий.

**Анализ чувствительности и специфичности разработанных методов при исследовании клинических образцов.** Эффективность выявления *S. trachomatis* с помощью разработанных методов по сравнению с коммерческой ПЦР-диагностической системой «АмплиСенс *S. trachomatis*» (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ) была оценена путем параллельного тестирования 219 образцов клинического материала. Применение внутреннего стандарта позволило

выявить ингибирование амплификации в 2 образцах при исследовании в формате TaqMan ПЦР и 6 образцах при исследовании с помощью ПЦР в режиме реального времени с SYBR Green I и ПЦР с последующим электрофоретическим детектированием продуктов (Таб. 3). В связи с невозможностью оценки наличия хламидийной ДНК в этих образцах результаты их тестирования не учитывались при расчете показателей чувствительности и специфичности разработанных методов. Для оставшихся образцов совпадение результатов тестирования с помощью коммерческой тест-системы и TaqMan ПЦР было отмечено в 215 (99,1%) из 217 случаев; коммерческой тест-системы и ПЦР с SYBR Green I в 207 (97,2%) из 213 случаев. При использовании коммерческого метода в качестве референтного диагностическая чувствительность TaqMan ПЦР и ПЦР с SYBR Green I составила 97,8% и 84,4%, соответственно. В шести положительных образцах, не выявленных с помощью ПЦР с SYBR Green I или электрофоретического детектирования исходная концентрация ДНК-мишени по данным TaqMan ПЦР не превышала 100 копий/мл. Таким образом, более высокая стабильность детектирования низких концентраций хламидийной ДНК в формате TaqMan ПЦР по сравнению с другими разработанными методами подтверждается результатами исследования клинических образцов.

**Таблица 3.** Сравнение результатов тестирования урогенитальных образцов с помощью тест-системы «АмплиСенс *C. trachomatis*» и разработанных методов ПЦР

АмплиСенс <i>C. trachomatis</i>	Количество образцов*					
	TaqMan ПЦР			ПЦР с Sybr Green I и ПЦР-электрофорез		
	«+»	«-»	«ИНГ.»	«+»	«-»	«ИНГ.»
«+» n=46	44	1	1	38	7	1
«-» n=173	1	171	1	1	167	5
Относительная чувствительность:**	97,8%			84,4%		
специфичность:**	99,4%			99,4%		

\* «+» – положительные, «-» – отрицательные, «инг.» – ингибированные образцы

\*\* исключая ингибированные образцы

Учитывая, что копияность криптической плазмиды *C. trachomatis*, которая является мишенью для АмплиСенс и ряда других коммерческих тест-систем, в 7-10 раз превосходит копияность *ompA*, теоретическая чувствительность методов, основанных на выявлении плазмидных локусов, может быть почти на порядок выше по сравнению с методами обнаружения однокопийных хромосомных генов. Тем не менее, разработанный нами вариант TaqMan ПЦР с праймерами к *ompA* незначительно уступал в диагностической чувствительности системе АмплиСенс. Интересно отметить, что один из образцов, охарактеризованный как отрицательный по данным тестирования с помощью «АмплиСенс- *C. trachomatis*», показал

положительный результат амплификации фрагмента *ompA* во всех предложенных нами вариантах ПЦР. Одним из возможных объяснений данного факта может быть ранее описанное у отдельных штаммов *S. trachomatis* отсутствие плазмиды. С учетом этого случая, относительная диагностическая чувствительность разработанных методов составила 99,4%.

Разработанные методы ПЦР в режиме реального времени использованы также для слепого анализа контрольных образцов, предоставленных в рамках международной программы контроля качества ПЦР-диагностики «Quality Control for Molecular Diagnostics, 2003» (QCMD, Великобритания). Результаты двукратного тестирования 10 контрольных образцов с заданным содержанием ДНК *S. trachomatis* с помощью разработанных методов представлены в таблице 4. Положительные результаты амплификации ВС и/или хламидийной ДНК свидетельствовали об отсутствии ингибирования во всех реакциях. Правильные результаты оценки наличия или отсутствия *S. trachomatis* получены нами для 9 образцов. Один образец, содержащий 14 копий ДНК-мишени ( $\approx 2$  копии на реакцию) был расценен нами как «вероятно отрицательный», поскольку не обнаружил амплификации *ompA* при двукратном тестировании с помощью ПЦР с SYBR Green I, а также в одной из двух реакций TaqMan ПЦР. Для двух других образцов с таким же содержанием хламидийной ДНК положительные результаты были получены не менее чем в одном из двух тестов с использованием каждого метода, а для образцов с более высоким содержанием ДНК-мишени – во всех повторах. Таким образом, полученные при анализе контрольных образцов результаты хорошо согласуются с данными об аналитической чувствительности разработанных методов.

**Таблица 4.** Сравнение результатов тестирования контрольных образцов с помощью разработанных методов ПЦР в режиме реального времени и коммерческих систем

Образец	Материал	Ожидаемое число копий ДНК в образце	Результаты парных тестирований (амплификация <i>ompA</i> )			% правильных результатов при тестировании с помощью коммерческих систем*		
			TaqMan	SYBR Green	Интерпретация	Roche Amplicor (n=72)	Abbott LCx (n=13)	BD Probe TEC (n=11)
СТ03-1	ТЕ буфер	14	+ –	– –	«–»	81	85	27
СТ03-2	ТЕ буфер	2280	++	++	«+»	97	100	100
СТ03-3	ТЕ буфер	14	++	+ –	«+»	81	92	45
СТ03-4	ТЕ буфер	0	– –	– –	«–»	97	100	91
СТ03-5	ТЕ буфер	178	++	++	«+»	96	100	82
СТ03-6	моча	178	++	++	«+»	100	100	73
СТ03-7	моча	14	++	+ –	«+»	81	62	27
СТ03-8	моча	0	– –	– –	«–»	99	100	100
СТ03-9	моча	2280	++	++	«+»	97	100	100
СТ03-10	моча	14	+ –	+ –	«+»	64	62	27

\* Суммарные данные из отчета QCMD по тестированию контрольных образцов с помощью коммерческих систем в различных лабораториях (общее число тестов указано в скобках).

Сопоставление полученных нами результатов с данными из отчета QCMD по анализу идентичных контрольных образцов в других лабораториях, использующих наиболее известные коммерческие системы обнаружения *C. trachomatis* на основе ДНК-амплификационных методов, также свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности разработанных методов ПЦР в режиме реального времени (Таб. 4).

## ВЫВОДЫ

1. Разработанные методы ПЦР с использованием семейственно-специфических праймеров к 5'-концевому участку гена *ompA* обеспечивают чувствительное и специфическое детектирование всех 9 видов семейства *Chlamydiaceae*, что позволяет рассматривать их как перспективные подходы для диагностики хламидийных инфекций человека и животных.
2. Анализ нуклеотидных последовательностей амплифицируемого фрагмента *ompA*, включая впервые описанные в данной работе последовательности штаммов *C. suis* и *C. pecorum*, свидетельствует об их высокой внутривидовой консервативности (98,3-100% гомологии для каждого вида). В то же время, выраженные различия в структуре данного участка генома у разных видов обеспечивают возможность их дифференциации в соответствии с современной системой классификации хламидий.
3. Созданная панель штаммов *E. coli*, несущих клонированные фрагменты *ompA* и гетерогенный внутренний стандарт, может быть использована для контроля качества ПЦР-диагностики и дифференциации представителей семейства *Chlamydiaceae*.
4. Благодаря различиям в структуре сайтов связывания бисбензиимида в ПЦР-фрагментах *ompA* различных видов хламидий, электрофорез в агарозном геле с добавлением бисбензиимида-ПЭГ может быть использован для определения видовой принадлежности неизвестных штаммов хламидий.
5. Разработанные методы выявления и дифференциации *Chlamydia* spp., *C. pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов (*C. psittaci*, *C. abortus* и *C. felis*) на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I и анализа кривых плавления ПЦР-продуктов, а также мультиплексной TaqMan ПЦР со специфическими зондами отличаются высокой чувствительностью, специфичностью и производительностью по сравнению с ранее предложенными методами универсального обнаружения представителей семейства *Chlamydiaceae* на основе ПЦР.

### НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метод электрофоретического разделения амплификационных фрагментов *ompA* в агарозном геле с добавлением сайт-специфического ДНК-лиганда - бисбензимида-ПЭГ может быть рекомендован в качестве простого и экономически эффективного метода определения видовой принадлежности как культивируемых, так и выделенных из клинического материала штаммов хламидий.
2. Использование рекомбинантных штаммов *E.coli*, несущих клонированные фрагменты *ompA* девяти видов *Chlamydiaceae* и гетерогенный внутренний стандарт, рекомендуется для контроля качества выявления и дифференциации хламидий с помощью ПЦР с семейственно-специфическими праймерами СМ1 и СМ2.
3. Предложенные методы идентификации *Chlamydia* spp., *C. pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов (*C. psittaci*, *C. abortus* и *C. felis*) на основе ПЦР в режиме реального времени могут быть рекомендованы для использования в медицинских и ветеринарных лабораториях, проводящих диагностику хламидийных заболеваний.

### Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Эйдельштейн И.А. Фундаментальные изменения в классификации хламидий и родственных им микроорганизмов порядка *Chlamydiales* // Клин. Микробиол. и антимикроб. химиотер. - 1999. - №1. - Том 1.
2. Demkin V. V., Zimin A. L., Edelstein M. V., Edelstein I. A., Suvorov M. M. Identification of *Chlamydia* Species by Electrophoretic Separation of *omp2* Gene PCR Products in the Presence of Bisbenzimidazole-PEG // 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases (ECCMID). - Berlin, -1999. - P. 196.
3. Demkin V. V., Edelstein M. V., Zimin A. L., Edelstein I. A., Suvorov M. M. Detection of sequence variation in PCR-amplified fragments of *omp2* gene from three species of the family *Chlamydiaceae* using agarose gel electrophoresis containing bisbenzimidazole-PEG // FEMS Microbiol Lett. - 2000. - V. 15. - P. 215-218.
4. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Метод дифференциальной диагностики представителей семейства *Chlamydiaceae* с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // 4-я Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний». - Москва, - 2002 г. - С. 194.
5. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Разработка метода дифференциальной диагностики *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов с помощью ПЦР в режиме реального

- времени и анализа кривых плавления ДНК // 4-я Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний». - Москва, - 2002 г. - С. 193.
6. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Создание панели рекомбинантных штаммов для контроля качества ПЦР-диагностики и дифференциации представителей семейства *Chlamydiaceae* // 4-я Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний». - Москва, - 2002 г. - С. 421.
  7. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Способ универсальной диагностики и дифференциации видов семейства *Chlamydiaceae* с помощью ПЦР и электрофореза в геле с ДНК-связывающим лигандом (бисбензимидам-ПЭГ) // 4-я Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний». - Москва, - 2002 г. - С. 97.
  8. Метод дифференциальной диагностики представителей семейства *Chlamydiaceae* с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // И.А. Эйдельштейн, А.Д. Нарезкина // Методические рекомендации МЗ РФ. 2003.
  9. Tuuminen T., Edelstein I, Punin A., Kislova N., Stratchounski L. Use of quantitative and objective enzyme immunoassays to investigate the possible association between *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* antibodies and asthma // Clin Microbiol Infect. - 2004. - V. 10. - P. 345-348.
  10. Edelstein I. A., Edelstein M. V., Narezkina A. D. Development of a multiplex real-time PCR for detection and differentiation of *Chlamydiaceae* species which are pathogenic for humans // 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases (ECCMID). - Prague, -2004. - P. 173.
  11. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Способ дифференциальной диагностики представителей семейства *Chlamydiaceae*. Заявка на изобретение № 2003113244 от 05.05.2003.
  12. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Способ дифференциальной диагностики представителей семейства *Chlamydiaceae*. Заявка на изобретение № 2003113132 от 05.05.2003.
  13. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Нарезкина А.Д. Способ дифференциальной диагностики *Chlamydia* spp., *Chlamydophila pneumoniae* и возбудителей зоонозных хламидиозов. Заявка на изобретение № 2003113544 от 08.05.2003.