

ДЕЯКІ МЕТОДИЧНІ ПРОБЛЕМИ ГЕНОТИПУВАННЯ *TREPONEMA PALLIDUM*

О.А. Сокол¹, О.П. Білосоров¹, О.Й. Мілютіна¹,
Т.В. Частій¹, Е.Л. Баркалова², О.В. Шатілов³

¹ДУ „Інститут дерматології та венерології НАМН України”

²Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

³Луганський обласний шкірно-венерологічний диспансер

Резюме. Проаналізовані деякі методичні аспекти визначення генотипів *T.pallidum* за локусами генів *trp* та *arp*. Показано, що значна відмінність інтенсивності полос на електрофореграмах в деяких випадках є наслідком утворення декількох подібних за розміром рестрикційних фрагментів.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, *Treponema pallidum*, типкування

ВСТУП

Одним з важливих досягнень останніх років в дослідженні сифілісу є розробка високочутливих молекулярно-генетичних методів типкування *Treponema pallidum* (*T.pallidum*), заснованих на виявленні молекулярних особливостей збудника безпосередньо у клінічних зразках. В більшості публікацій типкування *T.pallidum* засновано на поліморфізмі двох генетичних локусів *trp* і *arp* [2-8].

Метою представленої роботи є аналіз деяких методичних проблем проведення типкування *T.pallidum*, з якими ми зустрілись при спробі характеристики збудників, що циркулюють у Східному регіоні України. Останнім часом для генотипування *T.pallidum* запропоновано також секвенування фрагмента гена *tp0548*, але цей метод нами не використовувався.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено 94 клінічних зразка, отриманих від 74 хворих на різні форми сифілісу. В дослідження були включені 27 клінічних зразків, які виявилися позитивними за геном *polA T.pallidum*.

ДНК *T.pallidum* зі зразків клінічного матеріалу виділяли гуанідиновим методом з використанням протеїнази К [1,11].

Наявність ДНК в клінічних зразках виявляли за модифікованим методом Liu [9], позитивні клінічні зразки типувалися на підставі варіабельності генів *trp* і *arp*.

Генотипування проводили за методами [6,12] з незначними модифікаціями. Ампліфікацію фрагмента гена *trp* проводили за методикою гніздної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): в першому раунді ампліфікації використовували праймери 5'-ACTGGCTCTGCCACACTTGA-3' і

5'-CTACCAGGAGAGGGTGACGC-3'; в другому – 5'-CAGGTTTTGCCGTTAAGC-3' і 5'-AATCAAGGGAGAATACCGTC-3' [6]. Перший тур ампліфікації включав початкову денатурацію при 95°C 4 хв 30 сек, наступні 35 циклів – 95°C 35 сек, 58°C 45 сек і 72°C 2 хв. Наприкінці ампліфікації проводилась інкубація при 72°C 2 хв. Другий тур проводили за наступними умовами: початкова денатурація при 95°C 3 хв 30 сек, наступні 35 циклів – 95°C 40 сек, 60°C 35 сек і 72°C 1 хв 40 сек. Наприкінці ампліфікації проводився 1 цикл при 72°C 4 хв. Для проведення рестрикції використовували рестриктазу MseI («Thermo Scientific») та відповідний буфер. Рестрикцію проводили при 50°C 3,5 години. Продукти рестрикції розділяли в 2 % агарозному гелі в присутності етидіуму броміду з візуальним аналізом на транслюмінаторі («Биоком», РФ) при довжині хвилі 310 нм.

Для ампліфікації ділянки гена *agr* використовували праймери 5'-AGCGTGATCCTCTGTCATCC-3' і 5'-TTGGGAGCTGAGTTGGAAAC-3' [12]. Ампліфікація включала початкову денатурацію при 95°C 2 хв 30 сек, наступні 35 циклів при 95°C 1 хв, 55°C 40 сек і 72°C 1 хв 30 сек і 1 цикл при 72°C 5 хв. Електрофорез проводили в 2 % агарозному гелі в присутності етидіуму броміду з візуальним аналізом на транслюмінаторі («Биоком», РФ) при довжині хвилі 310 нм.

Ампліфікацію проводили на апараті «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Контролем служила ДНК штаму Нікольса, яку виділяли з ліофілізованих препаратів *T.pallidum* для імунофлюоресцентної реакції, в частині експериментів використовували зразки *T.pallidum* штаму Нікольса, отримані при культивуванні у кролях, люб'язно наданий працівниками Полтавського обласного шкірно-венерологічного диспансеру.

В роботі використовували маркер молекулярної маси SM1191 (діапазон 700-25 нп) виробництва «Thermo Scientific». В декількох експериментах були використані стандарти молекулярної маси, отримані шляхом обробки плазмиди *E.coli* pRSETa рестриктазою HinfI («Thermo Scientific»). Розміри фрагментів (від 1074 до 22 нп), які були отримані при цьому, встановлені за допомогою теоретичного розщеплення плазмиди pRSETa на сайті фірми «Rebase». Плазмиду pRSETa культивували в *E.coli* XLblue, ДНК виділяли лужним методом [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Протягом 2011-2013 років на території Харківської, Донецької та Луганської областей від 74 хворих на різні форми сифілісу було отримано 94 клінічних зразка. Клінічні зразки були отримані від 5 хворих на первинний сифіліс (8 клінічних зразків), 4 – на вторинний сифіліс (4 клінічних зразка), 1 – на третинний сифіліс (1 клінічний зразок), 6 – на ранній прихований сифіліс (7 клінічних зразків), 19 – на пізній прихований сифіліс (24 клінічних зразка), 36 – на різні форми нейросифілісу (44 клінічних зразка), 3 – на неуточнений прихований сифіліс з невстановленим строком зараження (6 клінічних зразків). В проведеному дослідженні кількість клінічних зразків, позитивних по гену *polA T.pallidum*, по відношенню до загальної кількості отриманих зразків складає 27/94, тобто 29 %.

Генотипування за локусами генів *trp* за методикою Pillay A. [8,10] засновано на характеристиці розподілу декількох з 6 фрагментів, що утворюються при рестрикції відповідного амплікону, які мають довжину 911-901, 804, 722, 524, 425, 382 (таблиця 1). При аналізі електрофореграм ці фрагменти визначались цифрами від 1 до 6 у порядку зменшення їх розміру.

**Спектр рестрикційних фрагментів гена *tpr* у різних типів
T.pallidum (за Pillay A., 2013) [10]**

Фрагмент (н.п.)	Типи <i>tpr</i> MseI RFLP															
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
1. 911, 901	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
2. 804		+	+	+		+		+	+	+		+				
3. 722	+	+	+	+	+	+					+				+	
4. 524	+			+	+	+						+		+		+
5. 425	+		+			+	+	+						+	+	
6. 382	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+

Для спрощення ідентифікації генотипів були змодельовані електрофоретичні картини, які характерні для найбільш поширених генотипів. Отримана схема, яка наведена на рисунку 1, значно полегшила аналіз електрофореграм дослідних зразків.

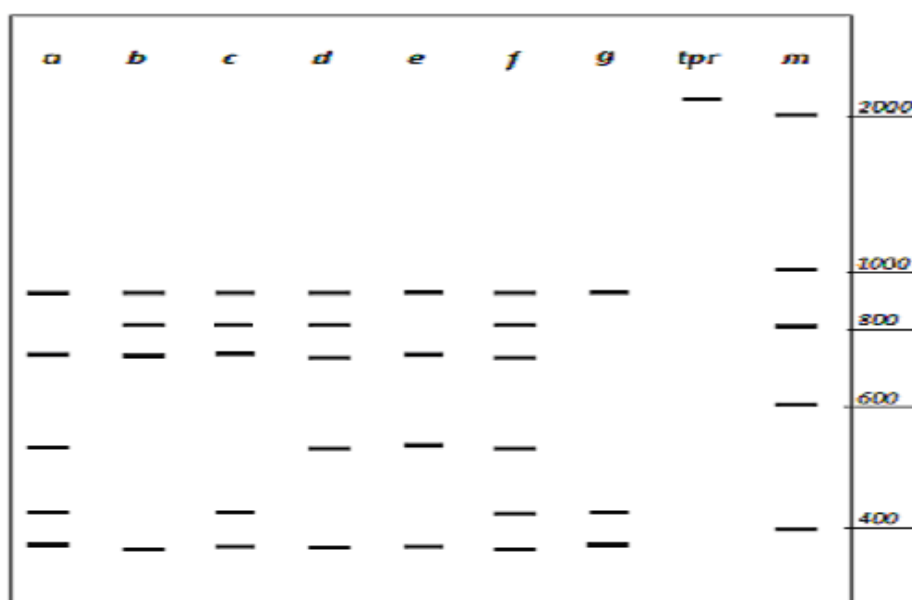


Рисунок 1. Схема електрофоретичної картини найбільш поширених генотипів *T.pallidum* за геном *tpr*

Зразки електрофореграм, що отримані при типуванні за геном *tpr*, наведені на рисунках 2-4.

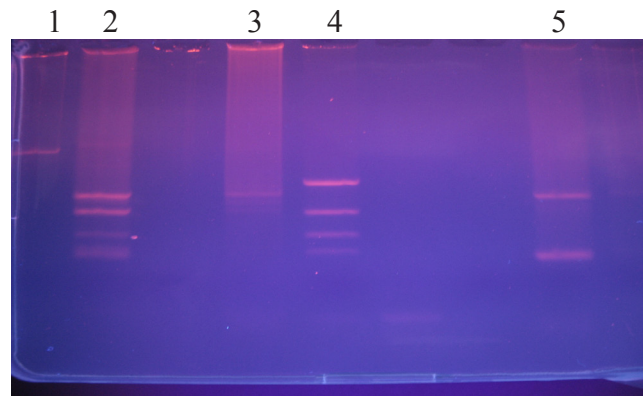


Рисунок 2. Електрофореграма продуктів типування за геном *tpr*

Примітка: 1 – контрольний амплікон (штам Нікольса), який не піддавали дії рестриктази; 2 – контрольний амплікон (штам Нікольса) після рестрикції, генотип *a*, фрагменти 1,3,4,5 і 6, останні два злились; 3 – дослідний амплікон після рестрикції, фрагменти 1, 2, 3, трек 6 майже непомітний, імовірно генотип „*b*”; 4 – маркер молекулярної маси; 5 – дослідний амплікон після рестрикції фрагменти 1,5,6, останні два дуже подібні до картини у генотипі *a*, імовірно генотип „*g*”

нп К а К р М g К р К



Рисунок 3. Електрофореграма продуктів рестрикції ДНК *T.pallidum* за геном *tpr*

Примітка: *К* – контрольні амплікони, які не піддавалися дії рестриктаз; буквами позначені типи штамів *T.pallidum* на підставі визначення ПДРФ ділянки гену *tpr*; *М* – маркер молекулярної маси, ліворуч вказані розміри фрагментів маркера молекулярної маси

нп М 1 2

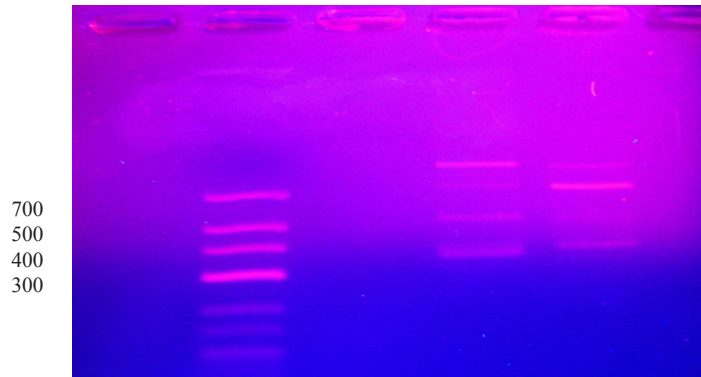


Рисунок 4. Електрофореграма продуктів рестрикції ДНК *T.pallidum* за геном *tpr*

Примітка: генотип *d* у зразках 1 і 2; *М* – маркер молекулярної маси, ліворуч вказані розміри фрагментів маркера молекулярної маси

При аналізі отриманих електрофореграм привертає увагу те, що інтенсивність різних полос після рестрикції ампліконів суттєво відрізняється, зокрема, можна відзначити різну інтенсивність фрагментів амплікона гена *tpr* штаму Нікольса на рисунку 2. Крім того, при аналізі електрофореграм дослідних продуктів рестрикції ДНК *T.pallidum* за геном *tpr*, наприклад таких, які приведені на рисунках 2-4, також можна відмітити різну інтен-

сивність деяких фрагментів. Для в'яснення можливої причини цього було проведено аналіз фрагментів за допомогою теоретичної ампліфікації і рестрикції локусів *tpr* штаму Нікольса по базах геномів *T.pallidum* з фондів НЦБІ. Враховуючи той факт, що для типування використовують гени другого субсімейства генів *tpr* – *tprE*, *tprG* і *tprJ*, для *T.pallidum* штаму Нікольса були отримані наступні результати (таблиця 2).

Таблиця 2

Рестрикційні фрагменти амплікона гена *tpr* *T.pallidum* штаму Нікольса (аналіз послідовності геному *T.pallidum* з GenBank: AE000520.1)

	Амплікон (нп)	Локалізація амплікона (нп)	Ген	1	2	3	4	5	6		
1	1848	328325-330172	<i>tprE</i>	-	-	726 + 726	-	-	383	-	13
2	1839	334323-332494	<i>tprG</i>	912	-	-	522	-	381	-	15
3	1836	674881-673046	<i>tprJ</i>	915	-	-	-	423	381	102	15

Можна відзначити, що розміри рестрикційних фрагментів, визначені за допомогою моделювання по базах даних, деякою мірою відрізняються від наведених в таблиці 1, хоч ці розбіжності не впливають на електрофоретичну картину. Крім того, з таблиці 2 видно, що електрофоретичні полоси можуть утворюватись одним (4, 5), двома (1, 3) або трьома (6) рестрикційними фрагментами, що обумовлює різну інтенсивність флюоресценції відповідних полос на електрофореграмах. При проведенні типування необхідно особливу увагу приділяти виявленню наявності або відсутності цих полос, їх вірна реєстрація має важливе значення і може бути причиною помилок при визначенні генотипу.

В деяких випадках на інтенсивність полос впливало джерело отримання ДНК. На рисунку 4 наведена електрофореграма типування за геном *tpr* двох клінічних зраз-

ків, отриманих від одного хворого, 1 – це зразок з вогнища ураження, 2 – з периферичної крові. Можливо, причиною відмінності інтенсивності полос в цьому випадку була часткова деградація ДНК збудника в периферичній крові.

При типуванні за локусом гена *arp* складності полягали, перш за все, в отриманні ампліконів. Ампліфікація цього локусу була позитивною всього в 7 випадках. Можливо, це пов'язано з використанням в методі тільки одного туру ампліфікації. Була зроблена спроба розробити для цього локусу напівгніздовну систему ампліфікації з ще одним раундом ампліфікації і додатковим праймером, але її використання не покращило результатів типування.

На рисунку 5 представлений приклад електрофореграми продуктів типування ДНК *T.pallidum* за геном *arp*.

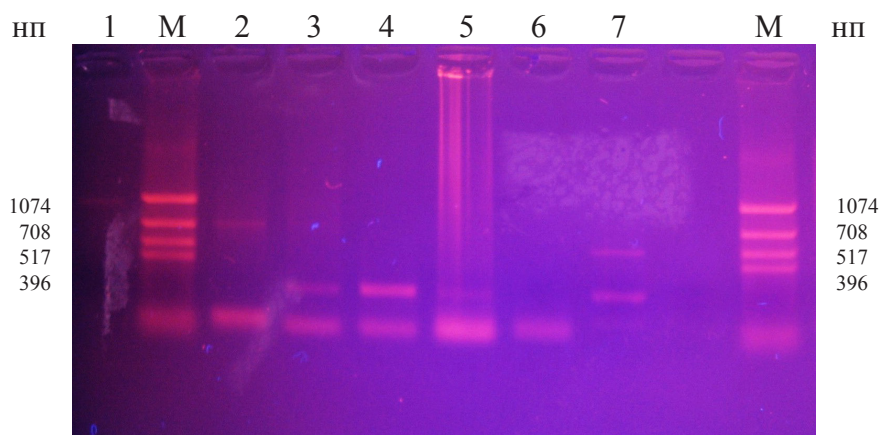


Рисунок 5. Електрофореграма продуктів типування ДНК *T.pallidum* за геном *arp*

Примітка: цифрами позначені номери дослідних зразків, М – маркер молекулярної маси, ліворуч і праворуч вказані розміри фрагментів маркера молекулярної маси

За геном *arp* *T.pallidum* було виявлено 5 типів з наступною кількістю 60-нуклеотидних повторів: 2, 6, 7, 13, 14. Домінуючий генотип з 6 повторами був ідентифікований майже в половині зразків.

Одночасне типування за двома генами *arp* і *tpr* *T.pallidum* було здійснено у 6 клінічних зразках. Так, в зразку периферичної крові пацієнта з первинним сифілісом вдалося виявити субтип 7*p*; в зразку зішкряба пацієнта з первинним сифілісом виявився субтип 14*i*; в зразку зішкряба пацієнта з первинним сифілісом вдалося виявити субтип 6*d*; в зразку спинномозкової рідини пацієнта з нейросифілісом був ідентифікований субтип 13*i*; в зразку плазми крові пацієнта з пізнім прихованим сифілісом виявили субтип 2*g*; в зразку плазми крові пацієнта з пізнім прихованим сифілісом вдалося виявити субтип 6*c*. В більшості зразків були отримані результати типування лише по одному з двох локусів.

З наведених прикладів отриманих нами електрофореграм можна відзначити недо-

статньо добре розділення полос, особливо помітне для фрагментів довжиною 400 нп та менше. Це свідчить про необхідність використання більш високої концентрації агарози в агарозному гелі.

Деякі генотипи, які виявлялися в нашому дослідженні досить часто, в роботах інших дослідників визначались рідко [2-7]. Зокрема, це відноситься до генотипу *p* за геном *tpr*, але аналіз наведеної на рисунку 3 електрофореграми із зразком такого генотипу свідчить про належність його саме до генотипу *p*. Малий обсяг типованих зразків дещо ускладнює таке порівняння.

Результати роботи свідчать, що основні методичні проблеми при генотипуванні *T.pallidum* пов'язані зі складністю ампліфікації достатньо великих за розмірами фрагментів генів збудника, а також високими вимогами до якості електрофореграм рестрикційних фрагментів. При вирішенні цих проблем дослідження дозволяє дати характеристику штамів *T.pallidum* і отримати важливу інформацію з епідеміології сифілісу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
2. Comparison of CDC and sequence-based molecular typing of syphilis treponemes: *tpr* and *arp* loci are variable in multiple samples from the same patient / L. Mikalová, P. Pospíšilová, V. Woznicová [et al.] // BMC Microbiology. – 2013. – Vol. 13. – P. 178.
3. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis / C.M. Marra, S.K. Sahi, L.C. Tantaló [et al.] // J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 202, N. 9. – P. 1380-1388.
4. First experience of molecular typing and determining the antibiotic resistance of syphilis pathogen *Treponema pallidum* in the Russian Federation / A.A. Kubanova, A.A. Kubanov, N.V. Frigo [et al.] // Vestnik Dermatologii i Venerologii. – 2013. – № 3. – P. 34-46.
5. Liu H. Molecular characterization and analysis of a gene encoding the acidic repeat protein (Arp) of *Treponema pallidum* / H. Liu, B. Rodes, R. George, B. Steiner // J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56. – P. 715-721.
6. Molecular epidemiology of syphilis in Scotland / M.J. Cole, S.A. Chisholm, H.M. Palmer [et al.] // Sex. Transm. Infect. – 2009. – Vol. 85. – P. 447-451.
7. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in North and South Carolina / V. Pope, K. Fox, H. Liu [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, No. 8. – P. 3743-3746.
8. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies pallidum / A. Pillay, H. Liu, C.Y. Chen [et al.] // Sex Transm. Infect. – 1998. – Vol. 25. – P. 408-414.
9. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene / H. Liu, B. Rodes, C.Y. Chen, B. Steiner // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, No. 5. – P. 1941-1946.
10. Pillay A. *Treponema*, in: Molecular typing in bacterial infections / I. de Filippis and M.L. McKee (eds) // Springer Science and

REFERENCES

1. Maniatis T., Fritch E., Sambrook Dzh. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molecularnoe klonirovanie. – M.: Mir, 1984. – 479 p.
2. Mikalová L., Pospíšilová P., Woznicová V. [et al.] /Comparison of CDC and sequence-based molecular typing of syphilis treponemes: *tpr* and *arp* loci are variable in multiple samples from the same patient // BMC Microbiology. – 2013. – Vol. 13. – P. 178.
3. Marra C.M., Sahi S.K., Tantaló L.C. [et al.] Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis // J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 202, N. 9. – P. 1380-1388.
4. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Frigo N.V. [et al.] First experience of molecular typing and determining the antibiotic resistance of syphilis pathogen *Treponema pallidum* in the Russian Federation // Vestnik Dermatologii i Venerologii. – 2013. – № 3. – P. 34-46.
5. Liu H., Rodes B., George R., Steiner B. Molecular characterization and analysis of a gene encoding the acidic repeat protein (Arp) of *Treponema pallidum* // J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56. – P. 715-721.
6. Cole M.J., Chisholm S.A., Palmer H.M. [et al.] Molecular epidemiology of syphilis in Scotland // Sex. Transm. Infect. – 2009. – Vol. 85. – P. 447-451.
7. Pope V., Fox K., Liu H. [et al.] Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in North and South Carolina // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, No. 8. – P. 3743-3746.
8. Pillay A., Liu H., Chen C.Y. [et al.] Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies pallidum // Sex Transm. Infect. – 1998. – Vol. 25. – P. 408-414.
9. Liu H., Rodes B., Chen C.Y., Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, No. 5. – P. 1941-1946.
10. Pillay A. *Treponema*, in: Molecular typing in bacterial infections / I. de Filippis and M.L. McKee (eds) // Springer Science and

Business Media New York, 2013. – Ch. 19. – P. 311-326.

11. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D.W. Russell. – New York, USA: Cold Spring Harbor laboratory press, 2001. – 222 p.

12. The sequence of the acidic repeat protein (*arp*) gene differentiates venereal from nonvenereal *Treponema pallidum* subspecies, and the gene has evolved under strong positive selection in the subspecies that causes syphilis / K.N. Harper, H. Liu, P.S. Ocampo [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 53. – P. 322-332.

Business Media New York, 2013. – Ch. 19. – P. 311-326.

11. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. – New York, USA: Cold Spring Harbor laboratory press, 2001. – 222 p.

12. Harper K.N., Liu H., Ocampo P.S. [et al.] The sequence of the acidic repeat protein (*arp*) gene differentiates venereal from nonvenereal *Treponema pallidum* subspecies, and the gene has evolved under strong positive selection in the subspecies that causes syphilis // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 53. – P. 322-332.

**НЕКОТОРЫЕ
МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ
ПРОБЛЕМЫ
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ
*TREPONEMA PALLIDUM***

**Сокол О.А.¹,
Белозоров А.П.¹,
Милютин Е.И.¹,
Частий Т.В.¹,
Баркалова Э.Л.²,
Шатилов А.В.³**

¹ГУ „Институт дерматологии
и венерологии НАМН Украины”

²Донецкий национальный медицинский
университет им. М. Горького

³Луганский областной кожно-
венерологический диспансер

Резюме. Проанализированы некоторые методологические аспекты определения генотипов *T.pallidum* по локусам генов *tp* и *arp*. Показано, что значительные различия интенсивности полос на электрофореграммах в некоторых случаях являются следствием образования нескольких похожих по размерам рестрикционных фрагментов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, *Treponema pallidum*, типирование

**SOME METHODOLOGICAL
PROBLEMS GENOTYPING
OF *TREPONEMA PALLIDUM***

**Sokol O.A.¹,
Belozorov A.P.¹,
Milutina E.I.¹,
Chastii T.V.¹,
Barkalova E.L.²,
Shatilov O.V.³**

¹SE “Institute of Dermatology and
Venereology of NAMS of Ukraine”

²Donetsk National Medical
University of Maxim Gorky

³Lugansk Regional Skin and
Venereal Diseases Dispensary

Abstract. Some methodological aspects of *T.pallidum* genotyping for genes *tp* and *arp* are analyzed. It was shown that significant difference in the bands` intensity at the electrophoregrams may result from formation of several similar-sized restriction fragments.

Key words: polymerase chain reaction, *Treponema pallidum*, genotyping

Об авторах:

Сокол Оксана Анатольевна – кандидат биол. наук, старший научн. сотрудник лаб. иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики, ГУ “Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины”, e-mail: oksanasokol@yahoo.co.uk

Белозоров Алексей Павлович – доктор мед. наук, зав. лаб. иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики, ГУ “Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины”

Милютин Елена Иосифовна – младший научн. сотрудник лаб. иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики, ГУ “Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины”

Частий Татьяна Владимировна – младший научн. сотрудник лаб. иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики, ГУ “Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины”

Баркалова Элеонора Леонидовна – доктор мед. наук, профессор кафедры дерматовенерологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького

Шатилов Алексей Владимирович – кандидат мед. наук, зав. организационно-методическим отделом Луганского областного кожно-венерологического диспансера