

МЕТОДЫ ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

(*N. GONORRHOEAE, C. TRACHOMATIS, T. PALLIDUM*)

С.В. СИДОРЕНКО, В.С. СОЛОМКА, О.С. КОЖУШНАЯ, Н.В. ФРИГО

Methods for typing std pathogens (*N. Gonorrhoeae, C. Trachomatis, T. Pallidum*)

S.V. SIDORENKO, V.S. SOLOMKA, O.S. KOZHUSHNAYA, N.V. FRIGO

Об авторах:

С.В. Сидоренко — главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., профессор

В.С. Соломка — старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, к.б.н.

О.С. Кожушная — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

Н.В. Фриго — главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н.

Представлены данные о методах типирования возбудителей инфекций, передаваемых половым путем (*N.gonorrhoeae, C.trachomatis, T.pallidum*). Показано, что первоначально для типирования бактерий использовались фенотипические методы, однако они имеют ряд недостатков, которые ограничивают их применение. В настоящее время широкое распространение получили методы молекулярно-генетического типирования. Среди них более быстрыми темпами развивается типирование бактерий, основанное на мультилокусном секвенировании (Multilocus Sequence Typing — MLST). Однако схемы молекулярно-генетического типирования возбудителей ИППП в сравнении с другими бактериями разработаны недостаточно, что существенно затрудняет планирование мероприятий, направленных на снижение их распространения.

Ключевые слова: *N.gonorrhoeae, C.trachomatis, T.pallidum, фенотипирование, генотипирование, секвенирование.*

Phenotypic methods were initially used for bacterial typing yet they have a number of drawbacks limiting their use. Methods of molecular and genetic typing have become wide-spread today. Among these methods, bacterial typing based on multilocus sequence typing (Multilocus Sequence Typing — MLST) has been developing at the fastest rate. However, schemes of molecular and genetic typing of STD pathogens as compared to other bacteria are insufficiently developed, which considerably complicates the planning of measures aimed at the reduction of their spread.

Key words: *N. gonorrhoeae, C. trachomatis, T. pallidum, phenotyping, genotyping, sequence typing.*

Определение и классификация бактерий, в том числе передающихся половым путем (ИППП), относятся к числу ключевых задач клинической микробиологии и эпидемиологии. Специалистам необходимо знать, являются ли штаммы, изолированные от различных пациентов или из различных источников в окружающей среде, идентичными, генетически родственными или они не взаимосвязаны, и как связаны штаммы, циркулирующие на данной территории, со штаммами, распространенными на других территориях или в другие годы. Итогами анализа должны стать устранение возбудителя инфекции, а также выяснение закономерностей распространения, циркуляции и эволюции пато-

генных штаммов и клонов и создание мероприятий эпидемиологического контроля и прогноза, учитывающих эти закономерности. Одним из основных условий для этого является возможность выявлять сходство и различия между штаммами бактерий одного биологического вида, т. е. осуществлять типирование.

Исторически первоначально для типирования бактерий использовались фенотипические методы, основанные на выявлении таких свойств, как способность к утилизации отдельных субстратов (биохимическое типирование), наличие общих антигенных детерминант (серотипирование), чувствительность к бактериофагам (фаготипирование), а также к антибактериальным препаратам (типирование по антибиограмме). Отдельные фенотипические методы типирования бактерий, такие как серотипирование сальмонелл, сохраняют и, вероятно, еще долго

будут сохранять свое практическое значение. Однако для фенотипических методов характерен ряд недостатков, которые ограничивают их применение. Важнейшим из них является невозможность оценивать эволюционные связи и структуру бактериальных популяций. Фенотипические методы отличаются значительной трудоемкостью и недостаточной воспроизводимостью. Они, как правило, являются уникальными и предназначены для типирования бактерий в пределах конкретных биологических видов. Например, методологию фаготипирования стафилококков невозможно применить для типирования кишечной палочки. Важным моментом является то, что фенотип далеко не всегда соответствует определенному генотипу. Одинаковым спектром резистентности к антибактериальным препаратам могут обладать не только разные штаммы одного и того же вида, но и представители разных видов. Полностью идентичными спектрами резистентности могут обладать штаммы разных видов, например *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*. Указанные недостатки фенотипических методов типирования бактерий обусловили поиск новых методов типирования. К таким методам следует в первую очередь отнести метод молекулярно-генетического типирования, или генотипирования. Среди подходов такого типирования наибольшее развитие получило типирование бактерий, основанное на мультилокусном секвенировании (Multilocus Sequence Typing — MLST). Схемы MLST типирования разработаны более чем для 40 видов бактерий, для каждого из этих видов существуют международные базы данных. В стадии разработки находятся еще более 50 схем. Схемы молекулярно-генетического типирования возбудителей ИППП в сравнении с другими бактериями разработаны недостаточно, что существенно затрудняет планирование мероприятий, направленных на их сдерживание и распространение.

Общие принципы и методы типирования бактерий. Под типированием понимают фенотипический или генетический анализ изолятов бактерий на уровне вида/подвида, осуществляемый для выявления комплекса характеристик, специфичных для штаммов или клонов. Типирование используют для изучения динамики бактериальных популяций на различном уровне, начиная от отдельного человека или ограниченной экологической ниши (например, учреждения) и заканчивая глобальной экосистемой.

Важнейшей характеристикой любого метода типирования является его разрешающая способность, под которой подразумевают способность метода оценивать как отдельные типы, так и два штамма, случайно отобранные из бактериальной популяции. Для количественной оценки дискриминирующей способности методов типирования применяют индекс разнообразия Симпсона (D) [22, 30], который рассчитывают по формуле:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1),$$

где: S — число групп, на которое данный метод разделяет всю выборку штаммов, n_j — число штаммов в j -й группе; N — общее число штаммов в исследованной выборке.

В идеале для методов с максимальной разрешающей способностью индекс Симпсона должен быть равен 1. Это означает, что метод может отнести к различным типам два любых штамма. Однако необходимый уровень разрешающей способности определяется конкретными задачами типирования, к которым относятся:

- информационное обеспечение программ (систем) наблюдения за распространением инфекций на региональном, национальном или глобальном уровнях;
- расследование вспышек инфекционных болезней;
- изучение патогенеза инфекционных болезней, выявление групп (клонов) бактерий, обладающих повышенной вирулентностью;
- изучение динамики инфекционного процесса у отдельных пациентов (исключение или подтверждение предположений о рецидиве процесса или реинфекции).

Очевидно, что для изучения динамики инфекционного процесса у отдельных пациентов или расследования вспышек инфекционных болезней необходимы методы с максимальной разрешающей способностью. Методы, применяемые для решения национальных и глобальных задач, должны позволять выделять группы сходных бактерий (клонов).

Фенотипирование бактерий. Из фенотипических признаков для типирования бактерий можно использовать самые простые, такие как морфология и цвет колоний, но их разрешающая способность, как правило, незначительна. Так, на практике достаточно часто применяют типирование *Staphylococcus* spp. и *E. coli* по признаку образования гемолиза на плотных питательных средах, содержащих кровь. Наиболее распространенным методом является биотипирование, предполагающее оценку биохимической активности бактерий. Так, этот метод с успехом применяется для типирования *Acinetobacter* spp. [3] и некоторых других бактерий. В качестве первого ориентировочного метода при изучении как нозокомиальных, так и внебольничных инфекций широко применяется типирование по спектру антибактериальной резистентности (антибиограмме). Этот метод практически не требует дополнительных затрат, так как оценка чувствительности клинических изолятов осуществляется в процессе рутинной работы, однако его разрешающая способность незначительна.

Еще одним важным фенотипическим методом является серотипирование. Этот метод незаменим

при типировании сальмонелл. В то же время для ряда бактерий классический вариант серотипирования с применением специфических антисывороток вытесняется молекулярными методами анализа генов, кодирующих соответствующие антигены [54, 76]. Широко распространенные в свое время методы *фаготипирования* и *бактериоцинотипирования* к настоящему времени во многом утратили свое значение из-за недостаточной разрешающей способности.

Очень высокой разрешающей способностью обладают методы, основанные на электрофоретическом исследовании компонентов микробной клетки (белков и липополисахаридов), однако они отличаются сложностью и трудоемкостью в выполнении. Один из вариантов таких методов — *мультилокусный электрофорез ферментов* (multilocus enzyme electrophoresis — MLEE) [70], основанный на изучении различных аллелей ферментов «домашнего хозяйства», в ряде случаев рассматривается как референтный. Этот метод послужил основой для разработки генотипического метода мультилокусного секвенирования. К ферментам «домашнего хозяйства» относят группу ферментов, участвующих в ключевых метаболических путях бактерий. Гены указанных ферментов также обозначаются как гены «домашнего хозяйства».

Бурное развитие спектроскопических технологий открывает новые перспективы для типирования бактерий. Методы, основанные на MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight — времяпролетная лазерная десорбционная ионизация, ассоциированная с матрицей) спектроскопии, занимают промежуточное положение между фенотипическими и генотипическими методами, поскольку эта технология может использоваться для анализа как белков, так и нуклеиновых кислот. Принцип метода основан на ионизации лизата бактериальной культуры лазерным пучком в мощном электрическом поле. Молекулярная масса ионизированных молекул биологических полимеров, присутствующих в лизате, определяется по времени пролета до детектора. При использовании специальных условий удается регистрировать масс-спектры молекул преимущественно белковой природы. Получаемая с достаточным разрешением и точностью, воспроизводимая в стандартных условиях карта белковых масс оказывается уникальной для данного микробного вида/подвида характеристикой по типу «отпечатков пальцев». MALDI-TOF анализ протеомного состава бактерий в сочетании с соответствующими базами данных обеспечивает очень высокий уровень разрешения и может быть использован не только для типирования бактерий, например метициллинрезистентных стафилококков [31], но и для их видовой идентификации [15, 16]. Для целей типирования применяют и другие спектрометрические и хроматографические методы.

Генотипирование бактерий. Молекулярно-генетические методы типирования бактерий можно разделить на связанные с секвенированием ДНК и не связанные. Последние появились существенно раньше связанных с секвенированием, и некоторые из них постепенно утрачивают свое значение.

Методы анализа ДНК, не связанные с секвенированием. Исторически наиболее ранними были методы молекулярно-генетического типирования, основанные на гибридизации (*гибридизация* по Саузерну [74] в различных модификациях). В этих методах оценивают гибридизацию иммобилизированной ДНК исследуемого микроорганизма с ДНК-зондами различной специфичности. Положительный сигнал гибридизации свидетельствует о наличии в исследуемом образце ДНК той же специфичности, что и у зонда. На основе гибридизации по Саузерну разработаны автоматизированные методы риботипирования, оценивающие количество и положение на хромосоме рибосомальных генов [4, 5].

Появление технологий, основанных на микрочипах, а также результатах секвенирования целых геномов бактерий, позволило разработать наиболее совершенные методы типирования. При этом подходе на микрочип наносят олигонуклеотидные зонды, специфичные для всех или большинства из известных генов данного вида бактерий, и проводят гибридизацию с тотальной геномной ДНК исследуемого микроорганизма. Применение указанной технологии позволяет оценивать распространение в микробных популяциях больших групп генов, например связанных с отдельными метаболическими путями или вирулентности. Так, при сравнении трех лабораторных штаммов гонококков были выявлены определенные различия в их геномах [72].

В свое время очень широкое распространение получили методы типирования, основанные на электрофоретическом изучении *плазмидного профиля* бактерий (количества и размера плазмид) и/или рестрикционных карт плазмид [49]. Однако из-за нестабильности плазмид (частой утраты бактериями одних и приобретения других плазмид) разрешающая способность этих методов оказалась недостаточной.

Из молекулярно-генетических методов типирования, не связанных с секвенированием ДНК, к одним из самых распространенных относят методы анализа *длин рестрикционных фрагментов* (*restriction fragment length polymorphism — RFLP*). Бактериальную ДНК обрабатывают рестриктазами и анализируют с помощью электрофореза. Степень генетического родства сравниваемых изолятов оценивают по количеству и расположению рестрикционных фрагментов (полос на электрофорезе). Очень высокой разрешающей способностью достичь после разработки метода гель-электрофореза в пульсирующем поле (Puls Field Gel Electrophoresis — PFGE), позволяющего разделять фрагменты ДНК с большой

молекулярной массой, образующиеся при использовании «редкощеплящих рестриктаз». PFGE применяли для типирования большинства клинически значимых бактерий [25, 26, 48], для некоторых из них были созданы международные базы данных пульс-типов. Однако значительная трудоемкость метода, высокие требования к стандартизации выполнения всех процедур, а также сложности в интерпретации результатов несколько ограничивают его широкое применение.

Метод ПЦР фингерпринтинг основан на амплификации бактериальной ДНК с использованием «случайных» (универсальных) праймеров или праймеров, специфичных для отдельных видов бактерий, с электрофоретическим анализом продуктов амплификации [24, 73, 80, 91]. Генетическое родство оценивают по количеству и расположению фрагментов (полос). Основным преимуществом ПЦР фингерпринтинга являются техническая простота выполнения, высокая скорость и производительность, однако межлабораторная воспроизводимость метода подвергается сомнению.

Описаны методы генотипирования, использующие комбинацию ПЦР, фингерпринтинга и RFLP [28]. Одним из вариантов этого метода является коммерчески доступный метод анализа полиморфизма амплифицированных фрагментов (*amplified fragment length polymorphism* — AFLP) [2, 23, 40].

К методам генотипирования, основанным на ПЦР, относится также мультилокусный анализ числа tandemных повторов (*Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis* — MLVA). В геноме практически всех бактерий встречаются фрагменты ДНК, состоящие из повторяющихся нуклеотидных последовательностей (tandemные повторы), при этом число повторов может значительно варьировать. В ряде случаев повторы обнаруживают в генах белков, в других случаях их функции не известны. Определение размеров таких фрагментов ДНК (числа входящих в них повторов) может быть осуществлено при обычном электрофорезе ампликонов в агарозном геле или с применением методов масс-спектрометрии. Метод использовали для типирования микобактерий туберкулеза, легионелл, буркхолдерий [21, 42, 65, 83]. Создана международная база данных tandemных повторов (<http://vntr.csie.ntu.edu.tw>) [11], что открывает хорошие возможности для стандартизации метода.

Методы анализа ДНК, основанные на секвенировании

Генотипирование секвенированием отдельных локусов. Основным преимуществом данного подхода является относительно незначительный объем секвенирования. В то же время этот подход основан на особенностях отдельных видов бактерий и не имеет универсального характера. Так, оказалось, что для получения результатов генотипирова-

ния *Streptococcus pyogenes*, полностью совпадающих с результатами классического М-серотипирования, достаточно определить нуклеотидную последовательность короткого фрагмента (150 пар оснований), кодирующего N-терминальную область М-белка [17].

Другим примером удачного использования секвенирования отдельного локуса является типирование *Staphylococcus aureus* по гену белка А (*spa*-типирование) [20, 71]. Эффективность этого метода во многом объясняется тем, что по существу он является вариантом VNTR анализа, так как для *spa*-гена характерно наличие tandemных повторов, различающихся как по нуклеотидной последовательности, так и по количеству.

Генотипирование мультилокусным секвенированием. В 1998 г. М. С. J. Maiden и соавт. был предложен подход, развивающий и совершенствующий принцип мультилокусного белкового электрофореза, но основанный на прямом определении нуклеотидной последовательности соответствующих генов (45, 46). Метод получил название типирования мультилокусным секвенированием (*Multi Locus Sequence Typing, MLST*). Он заключается в секвенировании определенного набора генов «домашнего хозяйства» (обычно 6—7 генов), имеющих достаточное число аллелей (более 10), характеризующихся медленным накоплением мутаций и селективно нейтральных. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» (или «сиквенс-типом») по выбранным локусам. Сравнение полученных данных между собой, выяснение эволюционных связей между штаммами, их генетического расстояния производится с использованием специализированного программного обеспечения. Подход подразумевает обязательное создание общедоступной on-line базы данных для исследуемого микроорганизма, содержащей последовательности распространенных аллелей и информацию о соответствующих аллельных профилях для различных штаммов.

В настоящее время существуют два веб-сайта, на которых размещены базы данных по результатам типирования бактерий различных видов. На веб-сайте www.mlst.net размещены базы данных для 23 видов бактерий и грибов, в ближайшее время анонсировано размещение еще около 40 баз данных. На сайте www.pubmlst.org размещены базы данных еще более чем для 20 видов бактерий.

Для анализа данных, получаемых при MLST-типировании, используется кластерный анализ, предложено несколько алгоритмов, наиболее популярный из них (eBURST) реализован в виде общедоступной программы на веб-сайте www.mlst.net. Популярность этой программы во многом объясняется возможностью выявления эволюционных связей (предшественник — потомок) в бактериальных популяциях, а также выделения клональных комплек-

сов — групп сиквенс-типов, объединенных общим происхождением. Алгоритм eBURST, судя по всему, не лишен недостатков. На рисунке приведена иллюстрация из работы [82], посвященной оценке достоверности результатов, получаемых при изучении структуры бактериальных популяций с помощью этого алгоритма.

При очень высокой гетерогенности популяции (зона А), связанной с преобладанием мутаций над рекомбинациями, программа не выявляет клональных комплексов (процент сиквенс-типов, входящих в самую большую группу, незначителен). В зоне В программа выявляет реальные клональные связи (клональные комплексы и общих предшественников) для подавляющей части бактериальной попу-

ляции (в самые большие группы входит от 3 до 13% сиквенс-типов), результаты анализа представляются наиболее достоверными. В зоне С оказываются виды бактерий с очень высокой частотой процессов внутривидовой рекомбинации (процент сиквенс-типов, входящих в самую большую группу, очень высок), достоверность результатов анализа для бактерий в этой зоне невысока.

Методы типирования возбудителей ИППП

Типирование *N. gonorrhoeae*

Фенотипическое А/С (ауксотип/серотип) типирование. Данный метод основан на определении двух характеристик гонококков: их ауксотипа и серотипа. Популяция гонококков отличается

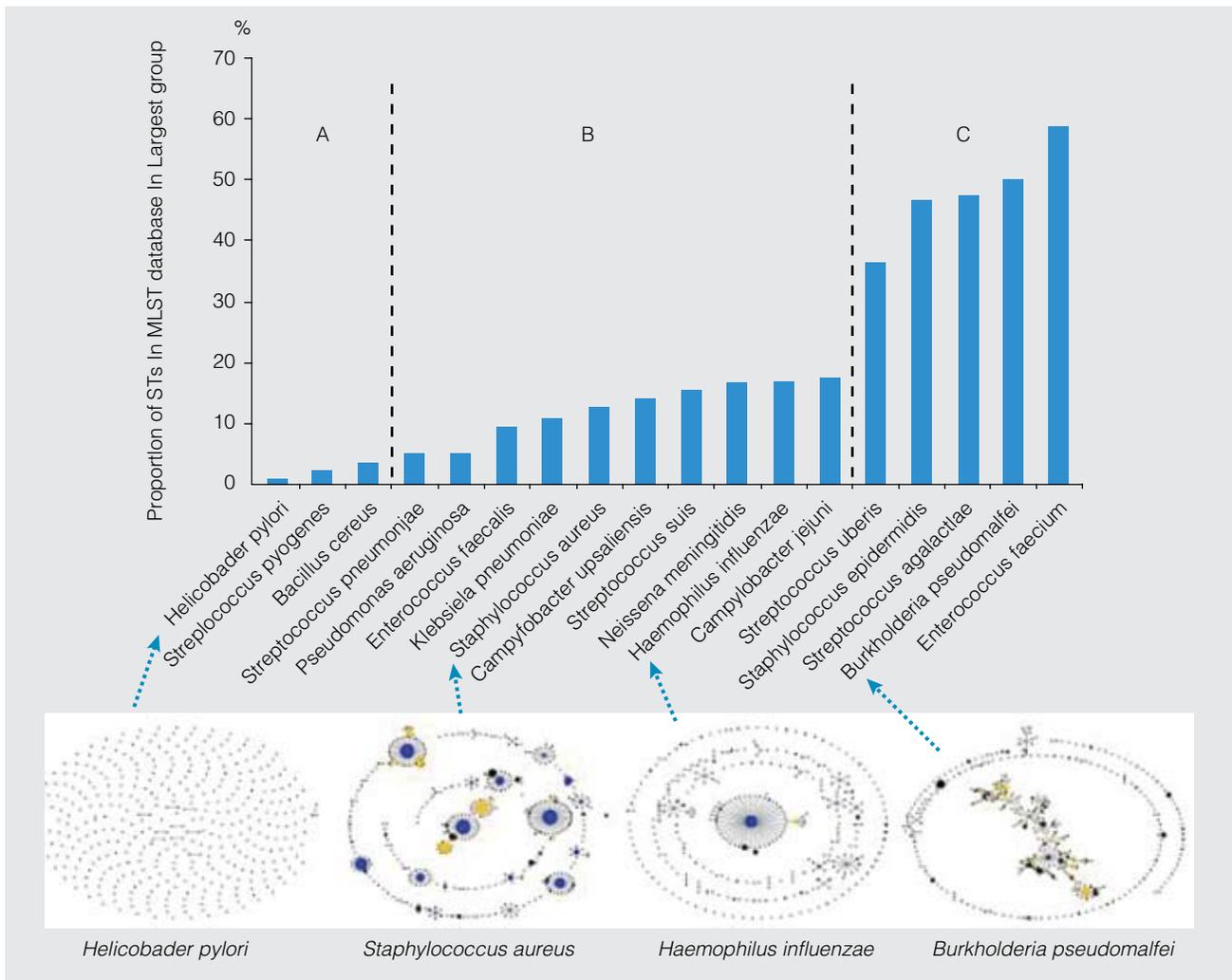


Рис. Структура бактериальных популяций, получаемая при анализе данных MLST-типирования с помощью программы eBURST. В нижней части рисунка представлена структура популяций *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Burkholderia pseudomallei*. Отдельные сиквенс-типы представлены точками. Если сиквенс-типы различаются не более чем по одной аллели, то они соединены линиями. Диаметр точки пропорционален количеству изолятов данного сиквенс-типа, представленных в базе данных MLST соответствующего вида бактерий. (Дальнейшее объяснение в тексте)

значительной гетерогенностью по признаку потребности в некоторых элементах питания. Различают штаммы *N. gonorrhoeae*, требующие для своего роста присутствия аргинина (ауксотип А), пролина (ауксотип Р), аргинина, гипоксантина и урацила (ауксотип АНУ), не требующие специальных добавок (ауксотип NR), и прототрофные (Proto) или О-типы (нулевые). В целом выделено более 30 ауксотипов, наибольшую значимость из которых имеет ауксотип АНУ, вызывающий системные инфекции. Обнаружение у гонококков различных ауксотрофных потребностей и распределение их на ауксотипы позволило впервые дифференцировать различные штаммы по их географическому происхождению.

Гонококки экспрессируют значительное количество белков, обладающих антигенными свойствами, однако большинство из них характеризуются значительной вариабельностью и не пригодны для целей серологического типирования. В качестве мишени для серотипирования используют Por-белок, вариабельность которого значительно ниже. Por-белок относится к группе пориновых белков, через которые осуществляется транспорт питательных веществ внутрь клеток грамотрицательных бактерий. У патогенных и непатогенных нейссерий известны два пориновых белка: PorA (ген *porA*) и PorB (ген *porB*). У *N. gonorrhoeae* белок PorA не экспрессируется, но в геноме обнаруживается соответствующий дефектный ген (псевдоген). Белок PorB представлен в популяции *N. gonorrhoeae* двумя взаимоисключающими серологическими вариантами: P1A или PorB1a (ген *porB1a*) и P1B или PorB1b (ген *porB1b*) [14, 84]. Серовары, в свою очередь, разделяются на серотипы. Описаны 26 P1A серотипов (от IA-1 до IA-26) и 31 P1B серотип (от IB-1 до IB-31). P1A штаммы чаще ассоциированы с диссеминированной формой гонококковой инфекции [8, 68, 69]. В странах Западной Европы в настоящее время преобладает P1A серовар.

Стандартный серологический метод типирования клинических штаммов *N. gonorrhoeae* был разработан в начале 80-х годов прошлого века [67]. В своем классическом варианте тест для типирования *N. gonorrhoeae* представляет собой реакцию коаггутинации с панелью антител, специфичных к различным локусам мембранного Por-белка. Поскольку A/S-типирование является весьма длительным и трудоемким методом, требующим высококачественных поли- или моноклональных антител, его широкое практическое применение нереально.

Для типирования гонококков был также предложен метод мультилокусного электрофореза ферментов (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) [13, 63]. Главным недостатком этого метода, как и других электрофоретических методик, считается трудность сравнения результатов, полученных в разных лабораториях.

Молекулярно-генетические методы, не связанные с секвенированием ДНК

Из молекулярно-генетических методов для типирования гонококков прежде всего были применены методы, не связанные с секвенированием. К таким подходам относятся амплификация фрагментов генома с использованием случайных праймеров (AP-PCR) [7, 64], анализ полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов генома (AFLP) [55, 75]. Достаточно широко использовались также методы, основанные на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Самым популярным из них является анализ макрорестриктов тотальной хромосомной ДНК методом электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) [12, 61, 92]. Применяли также анализ рестрикционного полиморфизма генов рПНК (риботипирование) [39, 52], но его разрешающая способность оказалась невысокой.

Очень высокую разрешающую способность продемонстрировал метод, основанный на амплификации многокопийного гена (11 копий), кодирующего второй белок наружной мембраны *N. gonorrhoeae* (P. II, Ора-белок), с последующим рестрикционным анализом (ора-типирование) [53]. Несмотря на высокую разрешающую способность, методы, связанные с электрофорезом ДНК, не нашли массового применения из-за значительных трудностей со стандартизацией.

Аналогично с методикой ора-типирования был разработан метод оценки полиморфизма Por-гена с помощью амплификации и рестрикционного анализа. Этот подход показал степень дискриминации штаммов гонококка, схожую с таковой для A/S-типирования [38]. Была также предложена схема гибридизационного анализа генетического полиморфизма Por-гена, позволяющая проводить генотипирование штаммов *N. gonorrhoeae* на основании взаимодействия олигонуклеотидных зондов с типоспецифичными локусами (петлями) этого гена [81].

Молекулярные методы типирования, основанные на секвенировании ДНК

Секвенирование Por-гена (por-типирование) идеологически связано с серотипированием, поскольку предполагает непосредственный анализ генов, кодирующих Por-белки. По мере развития технологий секвенирования предлагались различные подходы к использованию Por-гена в целях типирования [6, 12, 27, 29, 62]. Современный вариант метода был предложен в 2000 г., тогда же было показано, что его разрешающая способность сопоставима с ора-типированием [89]. Типирование штаммов *N. gonorrhoeae* осуществляется по аналогии с серотипированием на основании различных сочетаний уникальных фрагментов Por-гена. Высокая разрешающая способность, стандартность, воспроизводимость и относительная дешевизна

являются основными причинами значительной популярности этого метода.

Типирование мультилокусным секвенированием (MLST-типирование)

Одними из первых бактерий, к типированию которых был применен метод MLST, были менингококки [18]. В базе данных по MLST нейссерий наряду с *N. meningitidis* представлены и результаты типирования этим методом небольшого количества изолятов *N. gonorrhoeae*. Однако механический перенос на гонококки схемы типирования, разработанной для менингококков, оказался не совсем удачным. Не так давно для типирования популяции *N. gonorrhoeae* были предложены схемы мультилокусного секвенирования, основанные на анализе 13 и 16 различных генов «домашнего хозяйства» [58, 90], однако эти методы не нашли широкого применения, на их основе не было создано международных баз данных.

Таким образом, типирование мультилокусным секвенированием представляется одним из перспективных подходов, позволяющих решать задачи глобальной эпидемиологии, однако методика для *N. gonorrhoeae* еще окончательно не отработана (не определен оптимальный набор генов) и требует дальнейшей разработки.

Сравнительно недавно для типирования гонококков был предложен еще один молекулярно-генетический метод (*N. gonorrhoeae* multiantigen sequence typing — NG-MAST) [47]. Метод основан на секвенировании двух генов: широко применяемого для типирования *Por*-гена и *Tbp*-гена, кодирующего бета-субъединицу трансферрина связывающего белка. При этом в отличие от традиционного подхода секвенируют только внутренние (наиболее полиморфные) фрагменты *Por*-гена и *Tbp*-гена. Благодаря ограничению размеров секвенируемых фрагментов весь процесс типирования удается ограничить четырьмя реакциями секвенирования. Данный метод практически не уступает ора-типированию, на его основе создана международная база данных (www.ng-mast.net). Если первоначально метод разрабатывали для оценки процессов распространения гонококков в ограниченных сообществах, то к настоящему времени накопились данные о возможностях его использования для более глобальных целей. Этот метод позволил выявить в различных географических регионах клоны гонококков, устойчивые к ципрофлоксацину [51, 56, 57, 86], азитромицину [43], демонстрирующие сниженную чувствительность к цефалоспорином III поколения [41], лишенные фермента полиминопептидазы, входящего в системы биохимической идентификации гонококков [85]. При использовании этого метода были выявлены существенные различия в распространении отдельных сиквент-типов между Западной

Европой и Архангельским регионом Российской Федерации [87].

Типирование *Chlamydia trachomatis*

Серотипирование является основным методом типирования *C. trachomatis*. Четко установлено, что серотипы А, В и С вызывают трахому, серотипы от D до К — урогенитальный хламидиоз и три серотипа (L1 — L3) — венерическую лимфогранулему.

Серотипирование является достаточно трудоемким и длительным процессом, требующим высокой квалификации персонала и наличия набора антисывороток, в связи с чем молекулярно-генетические методы типирования представляются достаточно привлекательной альтернативой. Объектом типирования в подавляющем большинстве работ был ген белка внешней мембраны (outer membrane protein — *omp1*, *ompA*).

Для амплификации ДНК чаще всего использовали гнездную ПЦР. Получаемые ампликоны исследовали методами анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, обратной гибридизации [50, 77, 93], олигонуклеотидных чипов [94] и секвенирования [1, 36, 78]. Сравнительно недавно для типирования *C. trachomatis* был предложен метод гнездной ПЦР в реальном времени, по разрешающей способности не уступавший секвенированию *omp1* гена [32]. Однако анализ гена *omp1* обладает недостаточной разрешающей способностью, так как на практике более половины всех случаев урогенитального хламидиоза вызываются серотипом E [33, 34, 44]. Как и в большинстве других случаев, наибольшую разрешающую способность при типировании *C. trachomatis* проявил метод MLST [35, 95]; в качестве мишеней для типирования были использованы высоковариабельные области генома *C. trachomatis*: в работе M. Klint и соавт. [35] — два аннотированных гена (*hctB* и *pbpB*) и три гипотетических гена (*CT058*, *CT144* и *CT172*), в работе L.N. Pedersen и соавт. [95] — *ompA* и тандемные повторы (*CT1335*, *CT1299*, *CT1291*). Использование MLST представляется наиболее перспективным направлением для типирования *C. trachomatis*.

Типирование *Treponema pallidum*

Реальные предпосылки для типирования *T. pallidum* появились после расшифровки в 1998 г. группой исследователей из США [19] генома бледной трепонемы. Полная нуклеотидная последовательность генома *T. pallidum* составляет 1 138 006 пар оснований, содержащих 1041 предсказанную ранее последовательность азотистых оснований, кодирующих белки.

Установлено, что микроорганизм включает 42 семейства генов, ответственных за основные жизнеобеспечивающие функции: механизмы репликации ДНК, транскрипции, трансляции, энергетический метаболизм, процессы клеточного деления

и секреции белков. При анализе генома выявлены потенциальные факторы вирулентности микроорганизма, к которым относятся 12 белков, родственных «большому оболочечному белку» (major sheath protein — Msp) *Treponema denticola*, ряд гемолизинов и некоторые другие классы белков.

Молекулярное типирование бледной трепонемы, выделенной от больных сифилисом, впервые проведено А. Pillay и соавт. [59] в рамках исследований центра CDC. Авторами отработана методика типирования, заключающаяся в обнаружении ДНК бледной трепонемы в образцах соскобов с сифилитических высыпаний или цельной крови больных первичным и вторичным сифилисом методом ПЦР путем амплификации региона гена *poIA* и последующего проведения молекулярного типирования по двум генам-мишеням: гену *arp* (acidic repeat protein) и семейству генов *tpr* (*T. pallidum* repeat). Показано, что ген *arp*, кодирующий кислый белок с неизвестными функциями, содержит уникальные повторы, состоящие из 60 пар оснований, причем количество этих повторов варьирует у разных штаммов *T. pallidum* [66]. Подобная вариабельность характерна и для семейства *tpr* генов. В состав семейства *tpr* входит 12 генов, часть которых, как предполагают, кодирует экспонированные на поверхности белки. Один из *tpr* генов, *tprK*, характеризуется изменчивостью по семи вариабельным участкам (V), ограниченными уникальными повторами, состоящими из 4 пар оснований [37]. На основании исследований реакции антиген — антитело на примере трех клонированных штаммов *T. pallidum* (Chicago A, Chicago B, Chicago C) можно предположить, что вариабельность в области V участков у разных штаммов обеспечивает определенную устойчивость трепонемы к антителам и, вероятно, затрудняет процесс распознавания активированными макрофагами [37]. Подобная особенность *T. pallidum* — способность к антигенной изменчивости — по-видимому, может объяснить, почему сифилис является хронической инфекцией, трудно поддающейся диагностике и лечению.

Ранее было показано, что *T. pallidum* субтипа *pallidum* может быть дифференцирована от других субтипов на основании присутствия или отсутствия одиночного сайта рестрикции Eco47III на 5' фланкирующем участке гена (*tpp15*), кодирующего липопротеин с молекулярной массой 15 кДа [9]. Однако по данному признаку невозможно провести дифференциацию субтипа *pertenue* от субтипа *endemicum*. С целью дифференциации этих двух субтипов трепонем необходимо дополнительно идентифицировать два гена семейства *tpr*: *tprC* и *tprI* [10].

Таким образом, путем амплификации *agr* и *tpr* генов методом ПЦР и анализа полиморфизма рестрикционных фрагментов ДНК возможно провести молекулярное типирование *T. pallidum*. Этот метод позволяет дифференцировать различные штаммы трепонемы и может быть успешно использован для

дальнейших исследований молекулярной эпидемиологии сифилиса.

Применение молекулярного типирования *T. pallidum* в Аризоне и Южной Африке позволило обнаружить доминирование субтипа 14f в период вспышки заболеваемости сифилисом в Аризоне [79] и наличие тесной прямой корреляции между количеством определяемых субтипов бледной трепонемы и превалентностью сифилиса в Южной Африке [60].

Литература

1. Banda C. I., Kubota K., Brown T. M. et al. Typing of Chlamydia trachomatis strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (*omp1*). *Sex Transm Infect* 2001; 77: 419–422.
2. Bensch S., Akesson M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Mol Ecol* 2005; 14: 2899–2914.
3. Bouvet P. J., Grimont P. A. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138: 569–578.
4. Brisse S., Fussing V., Ridwan B. et al. Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1977–1984.
5. Brisse S., Verduin C. M., Milatovic D. et al. Distinguishing species of the *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli* by automated ribotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1876–1884.
6. Butt N. J., Lambden P. R., Heckels J. E. The nucleotide sequence of the *por* gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain P9 encoding outer membrane protein PIB. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4258.
7. Camarena J. J., Nogueira J. M., Dasi M. A., et al. DNA amplification fingerprinting for subtyping *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Sex Transm Dis* 1995; 22: 128–136.
8. Cannon J. G., Buchanan T. M., Sparling P. F. Confirmation of association of protein I serotype of *Neisseria gonorrhoeae* with ability to cause disseminated infection. *Infect Immun.* 1983; 40: 816–819.
9. Centurion-Lara A., Castro C., Castillo R. et al. The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. *J Infect Dis* 1998; 177: 1036–1040.
10. Centurion-Lara A., Molini B. J., Godomes C. et al. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3377–3380.
11. Chang C. H., Chang Y. C., Underwood A. et al. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: D416–D421.
12. Cooke S. J., de la Paz H., La Poh C. et al. Variation within serovars of *Neisseria gonorrhoeae* detected by structural analysis of outer-membrane protein PIB and by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiology* 1997; 143 (Pt 4): 1415–1422.
13. De la Fuente L., Vazquez J.A. Multilocus enzyme analysis of African type penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) strains isolated in Spain. *Sex Transm Dis* 1991; 18: 150–152.
14. Derrick J. P., Urwin R., Suker J. et al. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria porins*. *Infect Immun* 1999; 67: 2406–2413.
15. Dworzanski J. P., Deshpande S. V., Chen R. et al. Mass spectrometry-based proteomics combined with bioinformatic tools for bacterial classification I. *J Proteome Res* 2006; 5: 76–87.
16. Dworzanski J. P., Snyder A. P. Classification and identification of bacteria using mass spectrometry-based proteomics 2. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2: 863–878.
17. Facklam R., Beall B., Efstratiou A. et al. *emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci 71. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 247–253.
18. Feavers I. M., Gray S. J., Urwin R. et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3883–3887.
19. Fraser C. M., Norris S. J., Weinstock G. M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998; 281: 375–388.

20. Frenay H. M., Bunschoten A. E., Schouls L. M. et al. Molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 768–770.
21. Frothingham R., Meeker-O'Connell W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 5): 1189–1196.
22. Gaston M. A., Hunter P. R. Efficient selection of tests for bacteriological typing schemes. *J Clin Pathol* 1989; 42: 763–766.
23. Geornaras I., Kunene N. F., von Holy A., Hastings J. W. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Pseudomonas* strains from a poultry processing plant. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3828–3833.
24. Gevers D., Huys G., Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 205: 31–36.
25. Goering R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis 27. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14: 595–600.
26. Goering R. V., Tenover F. C. Epidemiological interpretation of chromosomal macro-restriction fragment patterns analyzed by pulsed-field gel electrophoresis 17. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2432–2433.
27. Gotschlich E. C., Seiff M. E., Blake M. S., Koomey M. Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: cloning and gene structure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1987; 84: 8135–8139.
28. Healy M., Huong J., Bittner T. et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR 45. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 199–207.
29. Hobbs M. M., Alcorn T. M., Davis R. H. et al. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* causing repeated infections: evolution of porin during passage within a community. *J Infect Dis* 1999; 179: 371–381.
30. Hunter P. R., Gaston M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465–2466.
31. Jackson K. A., Edwards-Jones V., Sutton C. W. et al. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 13. *J Microbiol Methods* 2005; 62: 273–284.
32. Jalal H., Stephen H., Alexander S. et al. Development of real-time PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2649–2653.
33. Jonsdottir K., Kristjánsson M., Hjaltalin O. J. et al. The molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* in the greater Reykjavik area, Iceland. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 249–256.
34. Jurstrand M., Falk L., Fredlund H. et al. Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3915–3919.
35. Klint M., Fuxelius H. H., Goldkuhl R. R. et al. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1410–1414.
36. Klint M., Lofdahl M., Ek C. et al. Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis* ompA genotypes. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4066–4071.
37. LaFond R. E., Molini B. J., Van Voorhis W. C. et al. Antigenic variation of TprK V regions abrogates specific antibody binding in syphilis. *Infect Immun*. 2006; 74: 6244–6251.
38. Lau Q. C., Chow V. T., Poh C. L. Differentiation of *Neisseria gonorrhoeae* strains by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of outer membrane protein IB genes. *Genitourin. Med* 1995; 71: 363–366.
39. Li H., Dillon J. A. Utility of ribotyping, restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis to discriminate between isolates of *Neisseria gonorrhoeae* of serovar IA-2 which require arginine, hypoxanthine or uracil for growth. *J Med Microbiol* 1995; 43: 208–215.
40. Lin J. J., Kuo J., Ma J. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 3649–3650.
41. Lindberg R., Fredlund H., Nicholas R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in penA, mtrR, porB1b, and ponA. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 2117–22.
42. Lindstedt B.A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005; 26: 2567–2582.
43. Lundback D., Fredlund H., Berglund T. et al. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae*- identification of the first presumed Swedish transmission chain of an azithromycin-resistant strain. *APMIS*, 2006; 114: 67–71.
44. Lysen M., Osterlund A., Rubin C. J. et al. Characterization of ompA genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1641–1647.
45. Maiden M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 561–588.
46. Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3140–3145.
47. Martin I. M., Ison C. A., Aanensen D. M. et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004; 189: 1497–1505.
48. Maslow J., M. E. Mulligan. Epidemiologic typing systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 595–604.
49. Mayer L. W. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 228–243.
50. Molano M., Meijer C. J., Morre S. A. et al. Combination of PCR targeting the VD2 of omp1 and reverse line blot analysis for typing of urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2935–2939.
51. Moodley P., Martin I. M., Pillay K. et al. Molecular epidemiology of recently emergent ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in South Africa. *Sex Transm Dis* 2006; 33: 357–360.
52. Ng L. K., Dillon J. R. Typing by serovar, antibiogram, plasmid content, riboprobe, and isoenzyme typing to determine whether *Neisseria gonorrhoeae* isolates requiring proline, citrulline, and uracil for growth are clonal. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1555–1561.
53. O'Rourke M., Ison C. A., Renton A. M. et al. Opa-typing: a high-resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea. *Mol Microbiol* 1995; 17: 865–875.
54. Owen R. J., Sutherland K., Fitzgerald C. et al. Molecular subtyping scheme for serotypes HS1 and HS4 of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 872–877.
55. Palmer H. M., Arnold C. Genotyping *Neisseria gonorrhoeae* using fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2325–2329.
56. Palmer H. M., Young H. Dramatic increase in a single genotype of TRNG ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates in men who have sex with men. *Int J STD AIDS* 2006; 17: 254–256.
57. Palmer H. M., Young H., Martin I. M. et al. The epidemiology of ciprofloxacin resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland 2002: a comparison of phenotypic and genotypic analysis. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 403–407.
58. Perez-Losada M., Viscidi R. P., Demma J. C. et al. Population genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence community using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes. *Mol Biol Evol* 2005; 22: 1887–1902.
59. Pillay A., Liu H., Chen C. Y. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies pallidum. *Sex Transm Dis* 1998; 25: 408–414.
60. Pillay A., Liu H., Ebrahim S. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 256–258.
61. Poh C. L., Lau Q. C. Subtyping of *Neisseria gonorrhoeae* auxotypereserovar groups by pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 1993; 38: 366–370.
62. Poh C. L., Lau Q. C., Chow V. T. Differentiation of *Neisseria gonorrhoeae* IB-3 and IB-7 serovars by direct sequencing of protein IB gene and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 1995; 43: 201–207.
63. Poh C. L., Ocampo J. C., Loh G. K. Genetic relationships among *Neisseria gonorrhoeae* serovars analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *Epidemiol Infect* 1992; 108: 31–38.
64. Poh C. L., Ramachandran V., Tapsall J. W. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* IB-2 and IB-6 isolates revealed by whole-cell repetitive element sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 292–295.

65. Pourcel C., Vidgop Y., Ramiise F. et al. Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1819–1826.
66. Purcell B. K., Chamberlain N. R., Goldberg M. S. et al. Molecular cloning and characterization of the 15-kilodalton major immunogen of *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 1989; 57: 3708–3714.
67. Sandstrom E., Danielsson D. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*. Classification by co-agglutination. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1980; 88: 27–38.
68. Sandstrom E. G., Knapp J. S., Buchanan T. B. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: W-antigen serogrouping by coagglutination and protein I serotyping by enzyme-linked immunosorbent assay both detect protein I antigens. *Infect Immun* 1982; 35: 229–239.
69. Sandstrom E. G., Knapp J. S., Reller L. B. et al. Serogrouping of *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of serogroup with disseminated gonococcal infection. *Sex Transm Dis* 1984; 11: 77–80.
70. Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics 96. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 873–884.
71. Shopsin B., Gomez M., Montgomery S. O. et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3556.
72. Snyder L. A., Davies J. K., Saunders N. J. Microarray genotyping of key experimental strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveals gene complement diversity and five new neisserial genes associated with Minimal Mobile Elements. *BMC Genomics* 2004; 5: 23.
73. Soriano V. E., Tellez G., Hargis B. M. et al. Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. *Avian Dis* 2004; 48: 890–895.
74. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis 79. *J Mol Biol* 1975; 98: 503–517.
75. Spaargaren J., Stoof J., Fennema H. et al. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of a core group of *Neisseria gonorrhoeae* transmitters in the population attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2335–2337.
76. Stanley J., Linton D., Desai M. et al. Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2850–2855.
77. Stothard D. R. Use of a reverse dot blot procedure to identify the presence of multiple serovars in *Chlamydia trachomatis* urogenital infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2655–2659.
78. Stothard D. R., Boguslawski G., Jones R. B. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect Immun* 1998; 66: 3618–3625.
79. Sutton M. Y., Liu H., Steiner B. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis* 2001; 183: 1601–1606.
80. Teanpaisan R., Douglas C. W. Molecular fingerprinting of *Porphyromonas gingivalis* by PCR of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences and comparison with other fingerprinting methods. *J Med Microbiol* 1999; 48: 741–749.
81. Thompson D. K., Deal C. D., Ison C. A. et al. A typing system for *neisseria gonorrhoeae* based on biotinylated oligonucleotide probes to PIB gene variable regions. *J Infect Dis* 2000; 181: 1652–1660.
82. Turner K. M., Hanage W. P., Fraser C. et al. Assessing the reliability of eBURST using simulated populations with known ancestry 31. *BMC Microbiol* 2007; 7: 30.
83. U'Ren J. M., Schupp J. M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol* 2007; 7: 23.
84. Unemo M., Norlen O., Fredlund H. The porA pseudogene of *Neisseria gonorrhoeae*—low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations. *APMIS*, 2005; 113: 410–419.
85. Unemo M., Palmer H. M., Blackmore T. et al. Global transmission of prolyliminopeptidase-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains: implications for changes in diagnostic strategies. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 47–51.
86. Unemo M., Sjostrand A., Akhras M. et al. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* identifies transmission and resistance of one ciprofloxacin-resistant strain 8. *APMIS* 2007; 115: 231–241.
87. Unemo M., Vorobieva V., Firsova N. et al. *Neisseria gonorrhoeae* population in Arkhangelsk, Russia: phenotypic and genotypic heterogeneity. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 873–878.
88. van Belkum A., Tassios P. T., Dijkshoorn L. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* (13 Suppl) 2007; 3: 1–46.
89. Viscidi R. P., Demma J. C., Gu J. et al. Comparison of sequencing of the por gene and typing of the opa gene for discrimination of *Neisseria gonorrhoeae* strains from sexual contacts. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4430–4438.
90. Viscidi R. P., Demma J. C. Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* Housekeeping Genes. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 197–204.
91. Webster C. A., Towner K. J. Use of RAPD-ALF analysis for investigating the frequency of bacterial cross-transmission in an adult intensive care unit. *J Hosp Infect* 2000; 44: 254–260.
92. Xia M., Whittington W. L., Holmes K. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis for genomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1995; 171: 455–458.
93. Xiong L., Kong F., Zhou H. et al. Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1413–1418.
94. Zheng H. P., Jiang L. F., Fang D. Y. et al. Application of an oligonucleotide array assay for rapid detecting and genotyping of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 1–6.
95. Pedersen L. N., Podenphant L., Moller J. K. Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using omp1 and a set of variable number tandem repeats. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 644–652.