

УДК: 577.213/215:579.882.11

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛУГНЕЗДНОГО МЕТОДА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Литовченко О.А.

ГУ "Институт дерматологии и венерологии АМН
Украины", Харьков

Chlamydia trachomatis относится к числу наиболее распространенных возбудителей инфекций человека и животных, в мире ежегодно возникает около 90 миллионов новых случаев трахомы, а урогенитальные хламидиозы занимают первое место среди всех бактериальных инфекций, передающихся половым путем [1,2]. Диагностическое выявление этого облигатного внутриклеточного паразита проводится иммунологическими, культуральными и молекулярно-биологическими методами, к последним относится метод ПЦР-диагностики.

В Украине для ПЦР-диагностики хламидиозов используются тест-системы ряда производителей (Литех, Амплисенс, Изоген, РФ), однако результаты их применения не всегда дают сходные результаты. Зачастую при использовании данных систем показатели выявления хламидийной инфекции в группах повышенного риска оказываются значительно ниже, чем указывает литература. Все это свидетельствует о необходимости разработки и использования в клинике более чувствительных методов ПЦР-диагностики хламидийной инфекции. В связи с этим нами была разработана полугнездная методика ПЦР-диагностики хламидийной инфекции, основанная на амплификации фрагмента криптической плазмиды возбудителя [3,4]. Ее применение позволило значительно повысить число положительных результатов исследования,

В настоящем исследовании изложены данные, полученные при применении разработанной тест-системы на представительной группе больных с урогенитальной патологией, а также результаты сравнения ее с тест-системой ПЦР-диагностики фирмы „Интерлабсервис“, используемой в настоящее время в Украине. Приведены также данные верификации результатов исследования с использованием разработанной тест-системы.

Материал и методы исследования

Были исследованы клинические образцы, полученные у 1089 больных, 559 мужчин и 530 женщин, проходивших лечение в ГУ "Институт дерматологии и венерологии АМН Украины" в 2008 – 2011 годах, из них 449 - с диагнозом «уретрит», 341 – «эндоцервицит», 68 – «эрозия шейки матки», 73 – «артрит», 30 – «бесплодие», 16 – «патология беременности», 12 – «синдром Рейтера», 11 – «подозрение на хламидиоз». Образцы были получены из уретры или шейки матки с помощью пластиковых зондов.

Выделения ДНК из образцов производили методом с протеиназой К [5], в исследованиях с тест-системами „АмплиСенс Chlamydia trachomatis-EPh“ ДНК выделяли наборами фирмы „ИнтерЛабСервис“. Позитивным контролем служили образцы культуры лабораторного штамма *C. trachomatis* 434/Вц, предоставленные сотрудниками лаборатории хламидиологии ГУ "ИДВ АМНУ".

Амплификацию проводили на аппарате „Терцик“ ("ДНК-технология", Россия) с использованием реакционной смеси: Трис-НСI, рН 8,5 – 10 мМ, хлористый калий – 50 мМ, хлористый магний – 2,5 мМ, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты – 0,2 мМ каждый, диметилсульфоксид – 1%, праймеры – 0,1 нМ. К 25 мкл смеси добавляли 0,5 ед. Таq-полимеразы, 4 мкл выделенной ДНК и 15 мкл вазелинового масла.

Определение ДНК хламидий проводили полугнездной тест-системой [3-4], в первом туре использовали праймеры, предложенные Hashemi et al. [6] 5'-AACCGTTTTTAATAGTGGCA-3' и 5'-TTCTGGCCAAGAATTATCC-3', во втором – 5'-AACCGTTTTTAATAGTGGCA-3' и оригинальный праймер СТGCTGT 5'-AATCACCCAGTCG-3'. Длина ампликона первого тура 377 н.п., второго – 330 н.п.

Для верификации результатов исследования использовали оригинальные праймеры первого тура 5'-GACGGTTCTTAA-GCTGGGAGAAAG-3 и 5'-ATGCATTGGA-CCGCATCACTCAA-3, (длина ампликона 328 н.п.) и второго тура 5'-GACGGTTCTTAAAGCTGGGAGAAAG и 5'-ACTAAACAAGTTCGAGCAGCAAGC-3' (длина ампликона 219 н.п.). Последовательности праймеров были проверены программой BLAST Национального центра биотехнологической информации США, праймеры синтезированы фирмой „Литех“(РФ).

Температурные режимы амплификации: денатурация - 94°C 30 секунд, отжиг - 54°C 30 секунд, элонгация - 72°C 30 секунд, всего 35 циклов. После окончания первого раунда 4 мкл реакционной смеси вносили в пробирки со смесью для второго тура и проводили еще 30 циклов амплификации. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5% геле агарозы с 0,5 нг/мл этидиума бромидом и анализировали на трансиллюминаторе ("Биоком", Россия) при 310 нм. Использовали реагенты производства Fermentas (Литва) и Сибэнзим (РФ).

Разработанную систему сравнивали с набором „АмплиСенс Chlamydia trachomatis-EPh“(„Интерлабсервис“, РФ).

Результаты и обсуждения

Применение разработанного полугнездного метода ПЦР-диагностики позволило выявить ДНК *C. trachomatis* в 339 из 1089 исследованных образцов (31,12 ± 1,4%), в 166 - у мужчин (29,69 ± 1,7%) и 173 - у женщин (32,64 ± 1,87%). Отмечалась отчетливая зависимость частоты выявления ДНК хламидий от возраста обследованных. Если в группе до 20 лет частота положительных случаев составила 21,73 ± 8,65%, то в группе от 20 до 29 лет они были получены у 34,86 ± 2,05%, а в группе от 30 до 39 лет – у

31,46 ± 2,27% обследованных. При дальнейшем повышении возраста часто выявления *C. trachomatis* замечено снижалась и составляла для 40-49 лет 27,27 ± 3,58%, для 50-59 лет – 23,37 ± 4,82%, а в группе 60 лет и старше – 13,04 ± 7,02%. Можно предположить, что выявленная динамика определяется, в основном, вероятностью инфицирования в разных возрастных группах.

Наиболее высокая частота выявления ДНК *C. trachomatis* была отмечена при эрозии шейки матки (47,05 ± 6,05%), несколько ниже показатели у больных уретритом (33,18 ± 2,22%) и эндоцервицитом (32,84 ± 2,54%), сходные результаты были в группе больных с подозрением на хламидиоз – 32,25 ± 8,39%. При бесплодии и патологической беременности хламидии выявлялись в 23,33 ± 7,72 % и 25,00 ± 10,82 % случаев соответственно, при различных формах артрита – в 19,17 ± 4,6 % случаев, а при синдроме Рейтера – в 16,66 ± 9,31% случаев. Полученные результаты в целом соответствуют данным литературы о значительной распространенности хламидийной инфекции при урогенитальной патологии [1,2,7,8], однако показатель выявления выше, чем в большинстве работ.

Представляют интерес результаты сравнения разработанного метода с используемой в настоящее время в Украине тест-системой для ПЦР-диагностики хламидиоза „АмплиСенс Chlamydia trachomatis-EPH” („Интерлабсервис”, РФ). Выделение ДНК в данной серии производилось набором "ДНК-сорб-АМ". Из 62 случайно выбранных образцов разработанная система выявила 35 положительных, а „АмплиСенс Chlamydia trachomatis-EPH” – 19, не было ни одного образца, дававшего отрицательный результат с разработанной системой и положительный с системой „АмплиСенс”.

Ранее было проведено сравнение разработанного метода с тест-системой „Полимик Хл”, „Литех”, РФ [4]. При этом были получены сходные результаты: в 87 образцах разработанная нами система выявила 24 положительных образца, а система „Полимик Хл” - только 10. Таким образом, разработанная система выявляет почти в 2 раза больше положительных образцов, чем „АмплиСенс” и в 2,5 раза – чем „Полимик Хл”.

Можно ли быть уверенным, что эти „дополнительные” положительные образцы отражают наличие в клиническом материале ДНК *Chlamydia trachomatis*, а не являются следствием недостаточной специфичности праймеров, контаминации или какой-либо другой причины ложной положительности? Для проверки специфичности получаемых положительных результатов, их связи с наличием в исследуемом материале ДНК хламидий мы посчитали необходимым провести дополнительную верификацию данных путем сравнения с результатами амплификации другого участка ДНК криптокислотной плазмиды. С этой целью была разработана вторая дополнительная полугнездная системы праймеров, амплифицирующая другой участок ДНК плазмиды. При этом мы учитывали, что в криптокислотной плазмиде *C. trachomatis* в настоящее время выделяют 8

кодирующих последовательностей (CDS) [9]. Если в основной тест-системе амплифицируется фрагмент четвертой кодирующей последовательности, то для подтверждающей амплификации был выбран фрагмент второй, наиболее консервативной кодирующей последовательности плазмиды. Дополнительная амплификация применялась выборочно к образцам, дающим положительный результат с основной тест-системой. Всего было проведено исследование 42 образцов, во всех случаях положительные результаты первого исследования были подтверждены амплификацией второго участка криптокислотной плазмиды.

Результаты амплификации дополнительного участка ДНК криптокислотной плазмиды подтверждают специфичность разработанной тест-системы. Таким образом, можно заключить, что она действительно выявляет значительно больше случаев хламидиоза, чем стандартные системы ПЦР-диагностики, которые достаточно часто дают ложноотрицательные результаты, особенно при низком содержании ДНК возбудителя в образцах.

Необходимо отметить, что высокая чувствительность разработанной системы требует повышенного внимания к профилактике контаминации при работе с ней. Кроме стандартных мер [10], можно считать необходимым использование отдельного бокса для переноса продуктов первого тура амплификации в пробирки с реагентами второго тура, а также включение в каждую постановку нескольких отрицательных контрольных пробирок, появление в которых положительного сигнала может свидетельствовать о контаминации. Методика амплификации дополнительного фрагмента ДНК-мишени может в таких случаях помочь исключить ложноположительные результаты, связанные с контаминацией.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что разработанный высокочувствительный метод выявления ДНК хламидий при тщательном контроле условий постановки может обеспечить высокую точность исследования.

Выводы

1. При использовании разработанной в ГУ”Институт дерматологии и венерологии АМНУ” полугнездной ПЦР-системы на ДНК *C. trachomatis* у больных с урогенитальной патологией положительные результаты были получены в 31,12 ± 1,4% случаев, наиболее высокая частота выявления ДНК *C. trachomatis* была отмечена при эрозии шейки матки – 47,05 ± 6,05%, уретрите – 33,18 ± 2,22%, эндоцервиците 32,84 ± 2,54%.
2. Показано, что разработанная ПЦР-система выявляет в 2 раза больше случаев хламидиоза, чем система „АмплиСенс Chlamydia trachomatis-EPH” (РФ).
3. Верификация разработанной системы амплификацией дополнительного фрагмента ДНК криптокислотной плазмиды *C. trachomatis* с помощью дополнительной полугнездной системы свидетельствует о ее высокой специфичности.

Литература

1. Мавров И.И. Половые болезни. Москва.-АСТ-Пресс Книга.2002. – 786 с.
2. Xiong L, Kong F, Zhou H, Gilbert GL: Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis*. // J.Clin.Microbiol., - 2006. – V.44. – P.1413–1418.
3. Мавров І.І., Мілютина О.Й., Білозорова О.О. та ін. / Спосіб детекції *Chlamydia trachomatis* в клінічних зразках // Патент України № 47755 від 25.02.2010, Бюль. № 5.
4. Литовченко О.О. Напівгніздова ПЛР-система для визначення ДНК *Chlamydia trachomatis* // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна. - 2011. - №947. – С.98-104.
5. Sachse K, Holzel H. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR. In.: Methods in Molecular Biology, vol.216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. Ed.by Sachse K. and J.Frey, Humana. - Press Inc., Totowa, NJ, 2002. - P.123-136.
6. Hashemi F.B., Pourakbari B., Yazdi J.Z. / Frequency of *Chlamydia trachomatis* in Women with Cervicitis in Tehran, Iran // Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. – 2007, V. 2007, p.1-4.
7. Шинский Г.Э., Мерзляков В.А., Тимофеева С.Б. Эпидемиологические аспекты хламидийной инфекции // Вестн.дерматол.венерол., 1999. - N 1. – С. 11-13.
8. Барановская Е.И., Жаворонок С.В., Захаренкова Т.Н., Шаргаева Н.В. Диагностика различных клинических форм хламидийной генитальной инфекции у женщин // Мед. Новости, 2004. – №2. – С. 46-51
9. Seth-Smith NM, Harris SR, Persson K et al. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain // BMC Genomics., 2009. – v.21,N.10. – P. 239-249.
10. Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами", Наказ Міністерства охорони здоров'я України Від 24.01.2008 № 26.

УДК: 577.213/.215:579.882.11

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛУГНЕЗДНОГО МЕТОДА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Литовченко О.А.

Применение высокочувствительного полугнездного метода ПЦР-диагностики позволило выявить *S. trachomatis* у 31,12 ± 1,4% больных с урогенитальной патологией, наиболее высокая частота отмечена при эрозии шейки матки (47,05 ± 6,05%), уретрите (33,18 ± 2,22%), эндоцервиците (32,84 ± 2,54%). Получаемые результаты верифицированы с помощью амплификации дополнительного фрагмента ДНК криптической плазмиды *S. trachomatis* с помощью дополнительной полугнездной системы праймеров. Показано, что чувствительность разработанного метода превосходит тест-системы „Полимик Хл”

(„Литех”, РФ) и „АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-EPh”(РФ).

Ключевые слова: ПЦР, *Chlamydia trachomatis*, урогенитальная патология.

УДК: 577.213/.215:579.882.11

АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛУГНІЗДНОГО МЕТОДУ ПЛР-ДІАГНОСТИКИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Литовченко О.А.

Застосування високочутливого полугніздного методу ПЛР-діагностики дозволило виявити *S. trachomatis* у 31,12 ± 1,4% хворих на урогенітальну патологію, найбільш висока частота відзначена при ерозії шийки матки (47,05 ± 6,05%), уретриті (33,18 ± 2,22%), ендоцервіциті (32,84 ± 2,54%). Одержувані результати верифіковані ампліфікацією додаткового фрагменту ДНК криптичної плазмиди *S. trachomatis* за допомогою додаткової полугніздної системи праймерів. Показано, що чутливість розробленого методу перевершує тест-систему „Полімік Хл” („Літех”, РФ) і „Амплісенс *Chlamydia trachomatis*-EPh”(РФ).

Ключеві слова: ПЛР, *Chlamydia trachomatis*, урогенітальна патологія.

UDK: 577.213/.215:579.882.11

SEMINESTED PCR FOR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN PATIENTS WITH UROGENITAL PATHOLOGY Litovchenko O.A.

Investigation with seminested PCR detected *Chlamydia trachomatis* infection in 31,12 ± 1,4% of patients with urogenital pathology, the highest prevalence was registered in erosion of cervix (47,05 ± 6,05%), urethritis (33,18 ± 2,22%), endocervicitis (32,84 ± 2,54%). The results were verified by amplification of additional fragment of *C. trachomatis* cryptic plasmid with additional seminested primers. It was shown that the developed method exceeds test-system "AmpliSens *Chlamydia trachomatis*-EPh" (Russia) in sensitivity.

Key words: PCR, *Chlamydia trachomatis*, urogenital pathology