

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУГНЕЗДНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *TREPONEMA PALLIDUM* У БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ

О.А. Сокол¹, А.П. Белозоров¹, Е.И. Милютин¹, Т.В. Частий¹,
О.А. Демедецкая¹, Г.И. Мавров¹, С.В. Унучко¹, Т.В. Губенко¹,
Г.М. Бондаренко¹, Г.А. Дунаева², Э.Л. Баркалова³,
И.В. Свистунов³, В.Г. Радионов⁴, А.В. Шатилов⁴

ГУ „Институт дерматологи и венерологии НАМН Украины”

Харьковская медицинская академия последипломного образования²

Донецкий кожно-венерологический диспансер³

Луганский государственный медицинский университет⁴

Резюме. Цель работы - апробация полугнездной тест-системы для выявления ДНК *Treponema pallidum* в клинических образцах. Методом полимеразной цепной реакции исследованы 86 клинических образцов крови, плазмы крови, соскобов, спинномозговой жидкости, полученные у 65 больных сифилисом. Изучена возможность выявления ДНК *Treponema pallidum* у больных сифилисом с помощью полугнездной ПЦР с высокоспецифичными праймерами к участкам гена ДНК-полимеразы *I polA*. Показано, что разработанный метод характеризуется высокой чувствительностью. ДНК *Treponema pallidum* была выявлена в 66,7% образцов периферической крови, а также в 100% образцов соскобов из первичного аффекта при первичном сифилисе и в 50% образцов плазмы крови при вторичном сифилисе.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, *Treponema pallidum*, кровь, спинномозговая жидкость

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) начали применять для выявления ДНК *Treponema pallidum* у больных сифилисом с начала 90-х годов прошлого столетия, к настоящему времени накоплен определенный опыт ее использования. Выпускаются стандартизированные ПЦР-системы для определения ДНК *Treponema pallidum* с детекцией продуктов реакции по конечной точке или в реальном времени. Классический вариант ПЦР с детекцией ампликонов электрофорезом в геле агарозы позволяет выявить 10-50 копий ДНК *Treponema pallidum* в исследуемом образце [1]; по данным ряда других авто-

ров чувствительность для разных систем может быть значительно ниже - от 100 до 1000 копий ДНК в образце [2,4]. Вариант ПЦР в реальном времени характеризуется более высокой чувствительностью, метод Taqman может выявлять порядка 10 копий в образце. Liu H. и др. [9] увеличили чувствительность ПЦР-определения ДНК *Treponema pallidum* до 1-2 копий ДНК в образце за счет использования меченных флуорохромом праймеров с детекцией ампликонов на флуориметре ABI 310 Prism Genetic Analyser. Наиболее высокие показатели чувствительности были получены для обратнo-транскрипционной ПЦР - 10⁻³ организмов в образце для исследования [9], однако эти показатели не удает-

ся получить при исследовании клинических образцов, по-видимому, в связи с быстрым разрушением РНК.

Одним из наиболее чувствительных и сравнительно простых вариантов ПЦР является гнездовая (вложенная) ПЦР, которая включает дополнительный тур амплификации с внутренними праймерами, комплементарными фрагментам ампликона, образующегося в первом туре. Использование дополнительного тура позволяет стабильно получать чувствительность исследования на уровне одиночных копий ДНК в исследуемом образце.

Литературные данные о применении гнездовой ПЦР для выявления ДНК *Treponema pallidum* в клинических образцах, полученных у больных сифилисом сравнительно немногочисленны. Одна из первых работ с использованием этого метода принадлежит Noordhoek G.Т. и др., обнаруживших с помощью гнездовой ПЦР ДНК *Treponema pallidum* в спинномозговой жидкости у 24% больных нейросифилисом [6]. У некоторых больных ДНК *Treponema pallidum* обнаруживали в спинномозговой жидкости через несколько лет после терапии антибиотиками.

О важности диагностического применения гнездовой ПЦР свидетельствует работа Talha E. и др. [7], обнаруживших ДНК *Treponema pallidum* в 5,7% образцов, полученных у больных серонегативным сифилисом, часто наблюдаемом у ВИЧ-инфицированных.

Выявление ДНК *Treponema pallidum* с помощью гнездовой и обратнотранскрипционной ПЦР на представительной группе из 292 больных различными формами сифилиса было проведено Родионовой Е.Н. и др. [1]. Аналитическая чувствительность разработанной методики составила 400 копий ДНК *Treponema pallidum* в мл (1-2 копии в исследуемом образце).

Приведенные данные литературы свидетельствуют о перспективности применения гнездового варианта ПЦР для выявления ДНК *Treponema pallidum* у больных сифилисом. Учитывая необходимость оптимизации многих элементов этого высокочувствительного метода в ГУ «Институт дерматологии и вен-

нерологии НАМН» была разработана полугнездовая тест-система для выявления ДНК *Treponema pallidum* в клинических образцах. В тест-системе использованы высоко специфичные для ДНК *Treponema pallidum* праймеры к участку гена ДНК-полимеразы I *polA*, предложенные Liu H. и др. [9].

В настоящем сообщении приводятся результаты апробации разработанной тест-системы на клиническом материале, полученном у больных различными формами сифилиса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы 86 клинических образцов крови, плазмы крови, соскобов, спинномозговой жидкости, полученные у 65 больных сифилисом до начала этиотропной терапии. Из них 4 больных с первичным сифилисом, 4 – с вторичным сифилисом, 1 – с третичным сифилисом, 6 – с ранним скрытым сифилисом, 14 – с поздним скрытым сифилисом, 33 – с нейросифилисом, 3 – со скрытым сифилисом с неустановленным сроком заражения. Клинические образцы исследовали сразу или хранили при температуре –20°С до исследования. Выделение ДНК *Treponema pallidum* из клинических образцов проводили гуанидиновым методом [3,10].

Для амплификации использовали 2 пары праймеров к фрагменту гена ДНК-полимеразы I *polA*, предложенные Liu H. и др. [9]: прямой праймер F1 TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC (1759 – 1783 нп); обратный праймер R1 CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG (2111 – 2135 нп); прямой праймер F2, CGTCTGGTCGATGTGCAAATGAGTG (1539 – 1563 нп); обратный праймер R2 TGCACATGTACACTGAGTTGACTCGG (1908 – 1933 нп). Использовались сочетания праймеров: F1-R1, F2-R2, F1-R2, F2-R1.

Амплификация проводилась в 25 мкл реакционной смеси с 0,5 ед Taq-полимеразы (Сибэнзим). Первый тур амплификации проводили с использованием горячего старта. Температурный режим амплификации пер-

вого тура: начальный этап 95°C 2 мин, 65°C 40 сек, 72°C 40 сек, следующие 40 циклов при 95°C 25 сек, 65°C 25 сек, 72°C 40 сек, заключительная инкубация при 72°C в течение 4 мин. Температурный режим амплификации второго тура: начальный этап 95°C 2 мин, 65°C 40 сек, 72°C 40 сек, следующие 40 циклов при 95°C 25 сек, 65°C 25 сек, 72°C 40 сек, заключительная инкубация при 72°C в течение 4 мин. Детекция ампликона проводилась электрофорезом в 1,8%-ном геле агарозы с бромистым этидием.

В качестве положительного контроля использовали ДНК *Treponema pallidum* штамм Никольса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В методе Liu H. и др. праймеры использовались для амплификации двух частично перекрывающихся фрагментов гена ДНК-полимеразы *I polA* [9]. В настоящем исследовании эти же праймеры применили для нескольких схем полугнездной амплификации (рис. 1), были выделены диагностический и контрольные (верифицирующие) варианты исследования. Последние были необходимы для исключения ложноположительных результатов, связанных с контаминацией.

В диагностическом исследовании в первом туре праймерами F2-R2 амплифицировали фрагмент ДНК размером 395 нп, во втором туре амплификации использовали пару праймеров F1-R2, при этом образовывался ампликон размером 175 нп. Несмотря на сравнительно небольшие размеры ампликона второго тура амплификации, он был хорошо различим при электрофорезе в агарозе (рис. 2). В образцах, содержащих значительное количество ДНК, можно было видеть два ампликона, соответствующие первому и второму турам амплификации.

Для контрольного (верифицирующего) варианта ПЦР в первом туре использовали пару праймеров F2-R1 (ампликон размером 597 нп), а во втором туре праймеры F1-R1 (ампликон размером 377 нп).

Использован еще один вариант полугнездной ПЦР-системы, в первом туре которого используются праймеры F1-R1 (ампликон размером 377 нп), во втором туре используются праймеры F1-R2 (ампликон размером 175 нп). Однако этот вариант постановки часто давал отрицательные результаты. Возможно, это было связано с тем, что пара праймеров F1-R1 характеризуется меньшей эффективностью амплификации, чем праймеры F2-R2 [1,9].

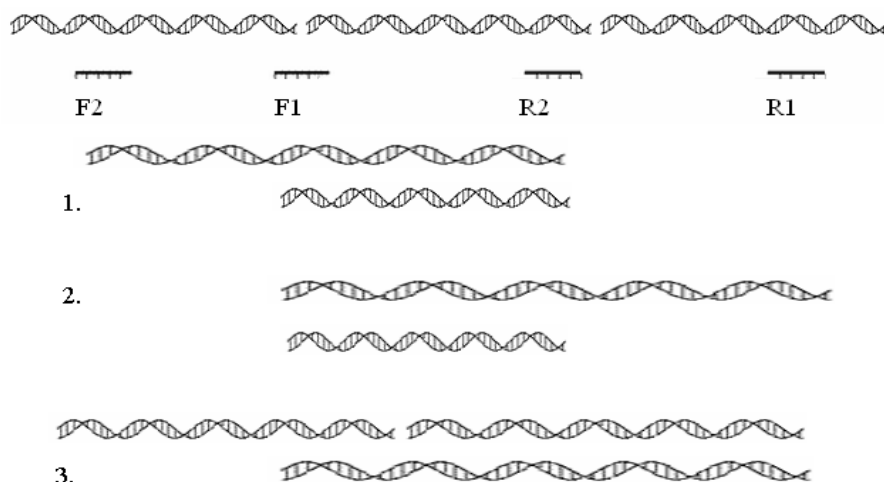


Рисунок 1 – Схема вариантов амплификации фрагмента гена ДНК-полимеразы *I polA*. 1 – диагностический вариант, праймеры первого тура F2-R2, второго тура – F1-R2. 2 – альтернативный вариант ПЦР, праймеры первого тура F1-R1, второго тура – F1-R2. 3 – верифицирующий вариант, праймеры первого тура F2-R1, второго тура – F1-R1.

На рисунке 2 приводится пример электрофореграммы диагностической ПЦР с использованием системы праймеров F2-R2 и F1-R2.

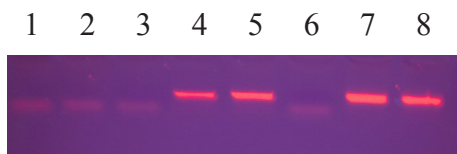


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена ДНК-полимеразы *I proA T.pallidum* в образцах спинномозговой жидкости больных нейросифилисом.

Примечание: трек 1 - отрицательный контроль; трек 2 - отрицательный образец спинномозговой жидкости; трек 3 - отрицательный образец спинномозговой жидкости; трек 4 – положительный образец спинномозговой жидкости; трек 5 – положительный образец спинномозговой жидкости; трек 6 - отрицательный образец спинномозговой жидкости; трек 7 – положительный контрольный образец (штамм Никольса); трек 8 - положительный контрольный образец (штамм Никольса).

Результаты применения разработанного метода приведены в таблице 1.

Таблица 1

**Результаты полимеразной цепной реакции
в зависимости от стадии сифилиса и типа клинического образца**

Стадия сифилиса	Количество клинических образцов, положительных по <i>proA</i> , по отношению к общему количеству полученных образцов			
	кровь	плазма	соскобы	спинномозговая жидкость
Первичный сифилис	2/3 (66,7%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	-
Вторичный сифилис	1/3 (33,3%)	1/2 (50,0%)	-	-
Ранний скрытый сифилис	0/1 (0%)	1/6 (16,7%)	-	1/2 (50,0%)
Поздний скрытый сифилис	0/1 (0%)	1/12 (8,3%)	-	1/5 (20,0%)
Третичный сифилис	-	0/1 (0%)	-	-
Нейросифилис	0/4 (0%)	2/5 (40,0%)	-	5/31 (16,1%)
Скрытый сифилис с неустановленным сроком заражения	1/3 (33,3%)	-	-	0/3 (0%)
В общем	4/15 (26,7%)	5/28 (17,9%)	2/2 (100%)	7/41 (17,1%)

Несмотря на сравнительно небольшое количество обследованных больных в отдельных группах полученные результаты позволяют дать предварительную оценку разработанного метода.

В целом ДНК *Treponema pallidum* была обнаружена в 18 из 86, или в 20,9% образцов. Чаще всего положительные результаты отмечались при первичном сифилисе, составляя 66,7% для периферической крови и 100% для соскобов из первичного аффекта. При вторичном сифилисе количество положительных результатов ДНК *Treponema pallidum* составило 33,3% для периферической крови и 50% для плазмы крови. У больных ранним скрытым сифилисом положительные результаты были получены в 16,7% образцах плазмы крови и в 50% образцов спинномозговой жидкости. При позднем скрытом сифилисе ДНК *Treponema pallidum* была обнаружена в 8,3% образцов плазмы и 20% образцов спинномозговой жидкости. При нейросифилисе количество положительных образцов плазмы крови составляло 40%, количество положительных образцов спинномозговой жидкости - 16%. При скрытом сифилисе з неустановленным сроком заражения количество положительных образцов периферической крови составляет 33,3%.

Полученные в настоящем исследовании показатели, в основном, совпадают с данными литературы, отражая общую тенденцию

к снижению вероятности обнаружения ДНК *Treponema pallidum* в клинических образцах с увеличением длительности заболевания. При некоторых формах сифилиса частота определения ДНК была несколько ниже, чем сообщают в литературе. Родионова Е.Н и др. выявляли ДНК *Treponema pallidum* у 70% больных вторичным сифилисом и 16,3 % больных скрытым сифилисом [1]. Особенно высокие показатели были получены Castro R. и др. [8], обнаружившими ДНК *Treponema pallidum* у 71% больных при вторичном и в 34% случаев при латентном сифилисе, однако эти данные не были пока подтверждены другими исследователями.

ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты позволяют считать, что разработанный метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определять ДНК *Treponema pallidum* в крови и спинномозговой жидкости у достаточно большого числа больных, однако для его более полной характеристики необходимо исследование более представительных групп больных различными формами сифилиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выявление ДНК и РНК *Treponema pallidum* в клиническом материале у пациентов с различными стадиями сифилиса / Е.Н. Родионова, А.Е. Гушин, Г.А. Шипулин [и др.] // Журн. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 43-50.
2. Жукова И.Ю. Геномика бледной трепонемы и ПЦР-диагностика сифилиса / И.Ю. Жукова, Р.А. Магазова, Д.А. Чемерис, А.Р. Мавзютов // Биомика. – 2011. – Том 1, № 1. – С. 101-111.
3. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
4. Применение полимеразной цепной реакции для увеличения достоверности лабораторной диагностики ранних форм сифилиса / А.Е. Гушин, Н.В. Фриго, Л.А. Дударева [и др.] // Клин. Дерматол. Венерол. – 2008. – № 1. – С. 6.
5. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR / J.C. Salazar, A. Rathi, N.L. Michael [et al.] // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75, No. 6. – P. 2954–2958.
6. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment / G.T. Noordhoek, E.C. Wolters, E.J. Marjolijn [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29, No. 9. – P. 1976-1984.
7. Molecular detection of *Treponema pallidum* by PCR in seronegative cases / E. Talha, E. Juhász, S. Kanizsai, K. Nagy // Acta Microbiol. Immunol. Hung. – 2009. – Vol. 56, No. 2. – P. 181-189.

8. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal / R. Castro, E. Prieto, M.J. A'guas [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 2009. - Vol. 47, No. 8. - P. 2510-2512.

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

**ВИКОРИСТАННЯ
ГНІЗДНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ
РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ
ДНК ТРЕПОНЕМА
PALLIDUM У ХВОРИХ
НА СИФІЛІС**

**Сокол О.А.¹,
Білозоров О.П.¹,
Мілютіна О.Й.¹,
Частій Т.В.¹,
Демедецька О.А.¹,
Маєров Г.І.¹,
Унучко С.В.¹,
Губенко Т.В.¹,
Бондаренко Г.М.¹,
Дунаєва Г.О.²,
Баркалова Е.Л.³,
Свістунов І.В.³,
Радіонов В.Г.⁴,
Шатілов О.В.⁴**

*ДУ „Інститут дерматології
та венерології НАМН України”¹*

*Харківська медична академія
післядипломної освіти²*

*Донецький шкірно-
венерологічний диспансер³*

*Луганський державний
медичний університет⁴*

Резюме. *Мета роботи - апробація полугніздної тест-системи для виявлення ДНК *Treponema pallidum* в клінічних зразках. Методом полімеразної ланцюгової реакції досліджені 86 клінічних зразків крові, плазми крові, зішкрябів, спинномозкової рідини, які*

**USE OF NESTED-
POLYMERASE
CHAIN REACTION
FOR DETECTION OF
TREPONEMA PALLIDUM
IN PATIENTS WITH
SYPHILIS**

**Sokol O.A.¹,
Belozorov A.P.¹,
Milutina E.I.¹,
Chastii T.V.¹,
Demedetska O.A.¹,
Mavrov G.I.¹,
Unuchko S.V.¹,
Gubenko T.V.¹,
Bondarenko G.M.¹,
Dunaeva G.A.²,
Barkalova E.L.³,
Svistunov I.V.³,
Radionov V.G.⁴,
Shatilov O.V.⁴**

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

*Kharkov Medical Academy
of Postgraduate Education²*

*Donetsk Skin and Venereal
Diseases Department³*

Lugansk State Medical University⁴

Abstract. *The aim of this study was to investigate the possibility of using nested- polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum* in patients with syphilis. The new nested-PCR test system for detection of *Treponema pallidum* in clinical samples was*

були отримані від 65 хворих на сифіліс. Вивчено можливість виявлення ДНК *Treponema pallidum* у хворих на сифіліс за допомогою полугніздної ПЛР з високо специфічними праймерами до ділянок гена ДНК-полімерази I роА. Показано, що розроблений метод характеризується високою чутливістю. ДНК *Treponema pallidum* була виявлена в 66,7% зразків периферичної крові, а також в 100% зразків зішкрябів з первинного афекту при первинному сифілісі та в 50% зразків плазми крові при вторинному сифілісі.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, *Treponema pallidum*, кров, спинномозкова рідина

developed. 86 clinical samples of blood, blood plasma, swabs, cerebrospinal fluid obtained from 65 patients with syphilis were studied of using PCR. PCR primers were used based on unique regions of the DNA polymerase I gene polA. The developed method is highly sensitive. DNA of Treponema pallidum was detected in primary syphilis in 66,7% of peripheral blood samples and 100% of the samples of scrapings from the primary lesions, and in 50% of specimens obtained from patients with secondary syphilis.

Key words: polymerase chain reaction, *Treponema pallidum*, blood, cerebrospinal fluid