

УДК: 577.213/.215:579.882.11

Напівгніздова ПЛР-система для визначення ДНК *Chlamydia trachomatis*
О.О.ЛитовченкоДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» (Харків, Україна)
olya_abe@yahoo.com

З метою вдосконалення методів діагностики хламідійної інфекції було запропоновано використання напівгніздової ПЛР-системи для визначення *Chlamydia trachomatis* в клінічних зразках з використанням зворотного праймеру 5'-CTGCTGTAATCACCCAGTCG-3'. За допомогою розробленої системи було проведено обстеження 1010 хворих з підозрою на хламідіоз. У 288 з них було підтверджено наявність *C. trachomatis*. Було здійснено оцінку чутливості та специфічності запропонованої системи із використанням контрольних зразків та проведено порівняння тест-системи з комерційним аналогом.

Ключові слова: ПЛР-система, зворотний праймер, *C. trachomatis*, контрольні зразки.

Полугнездовая ПЦР-система для определения ДНК *Chlamydia trachomatis*
О.А.Литовченко

С целью усовершенствования методов диагностики хламидийной инфекции было предложено использование полугнездовой ПЦР-системы для определения *Chlamydia trachomatis* в клинических образцах с использованием обратного праймера 5'-CTGCTGTAATCACCCAGTCG-3'. С помощью разработанной системы было проведено обследование 1010 больных с подозрением на хламидиоз. У 288 из них было подтверждено наличие *C. trachomatis*. Были проведены оценка чувствительности и специфичности предложенной системы с использованием контрольных образцов и сравнение тест-системы с ее коммерческим аналогом.

Ключевые слова: ПЦР-система, обратный праймер, *C. trachomatis*, контрольные образцы.

Seminested PCR-assay for detection of *Chlamydia trachomatis*
O.A.Lytovchenko

The aim of the study was to develop a novel PCR assay to improve detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical samples using new reverse primer 5'-CTGCTGTAATCACCCAGTCG-3'. 1010 clinical samples were examined, 288 were positive for *C. trachomatis*. We assessed sensitivity and specificity of our PCR assay using control samples and compared nested PCR method with commercial PCR system.

Key words: PCR assay, reverse primer, *C. trachomatis*, control samples.

Вступ

Урогенітальні інфекції, що обумовлені *Chlamydia trachomatis*, є найчастішими причинами негонококових сечостатевих захворювань (Shattock et al., 1998). У багатьох випадках захворювання має асимптоматичний характер і без адекватного лікування може призводити до хронічного запалення органів малого тазу, позаматкової вагітності та безпліддя. Таким чином, вкрай важливим є своєчасне встановлення природи збудника, що викликає захворювання.

Лабораторна діагностика захворювань, пов'язаних з *C. trachomatis*, базується на комплексі методів, серед яких культивування збудника, яке вважалось раніше «золотим стандартом» діагностики, і більш швидкі імуноферментний і імунофлуоресцентний аналізи, ДНК гібридизація та інші (Xiong et al., 2006). Останнім часом в діагностиці урогенітальних хламідіозів все більше місце займають молекулярно-біологічні методи, засновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), які дозволяють значно підвищити чутливість і специфічність досліджень (Мавров, 2006).

Зазвичай для діагностики хламідіозів використовуються нуклеотидні послідовності декількох генів *C. trachomatis*, найчастіше гена головного білка зовнішньої мембрани *omp1*, генів рибосомальної РНК та криптичної плазмід. Ген *omp1* є хромосомним геном, кожна клітина *C. trachomatis* містить тільки одну копію цього гену, в той же час криптична плазміда, масою 7,5 kb, міститься в клітині в значно більших кількостях (5–10 копій плазмідної ДНК на кожную клітину), що робить методи ПЛР, засновані на ампліфікації фрагменту криптичної плазмід, значно більш чутливими, ніж ампліфікації інших генів (Herrmann, 2007). В Україні для діагностики хламідіозів використовуються переважно ПЛР-системи російського виробництва, серед яких зареєстровані діагностикуми фірм «Літех» та

«Амплісенс». На жаль, недостатньо охарактеризована чутливість цих систем, результати порівняльного дослідження з їх використанням не завжди співпадають.

Останнім часом доведено існування штаму хламідій, який уникає виявлення деякими розповсюдженими ПЛР-системами за рахунок делеції саме в тій частині криптической плазмиди, яка ампліфікується найбільш поширеними тест-системами (Herrmann, 2007; Magbanua et al., 2007). Це свідчить про необхідність використання ПЛР-систем для виявлення ДНК хламідій, заснованих на ампліфікації іншого фрагменту криптической плазмиди, віддаленого від участку делеції. Одна з таких систем була запропонована F.B.Hashemi et al. (2007), в ній ампліфікується фрагмент ДНК криптической плазмиди, віддалений від участку делеції, з подальшим використанням ДНК-зонду і імуоферментним виявленням ампліконів, утворених під час ПЛР. Система F.B.Hashemi et al. є високочутливою і специфічною, але процес дослідження характеризується значною складністю, вимагає застосування дорогих реагентів і апаратури.

Метою роботи була розробка простого у виконанні високочутливого і специфічного метода ПЛР-визначення ДНК *S. trachomatis* у клінічних зразках, заснованого на ампліфікації фрагменту ДНК криптической плазмиди збудника, віддаленого від ділянки делеції.

Матеріали і методи

Розроблена система використовує напівгніздовий варіант постановки ПЛР на фрагмент криптической плазмиди *S. trachomatis*; праймери першого туру ампліфікації такі ж, як у (Hashemi et al., 2007): 5'-AACCGTTTTTAATAGTGGCA-3' та 5'-TTCTGGCCAAGAATTATCC-3', 35 циклів; праймери другого туру: 5'-AACCGTTTTTAATAGTGGCA-3' та 5'-CTGCTGTAATCACCCAGTCG-3'. Послідовність зворотного праймеру другого туру ампліфікації розроблена за допомогою програми Primer-BLAST (Primer3 та BLAST) Національного центру біотехнологічної інформації США. Використовували реагенти фірми Fermentas (Литва), Сибензим (РФ) та Takara (Японія).

Ампліфікацію проводили на апараті «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) з використанням суміші наступного складу: Трис-НСІ, рН 8,5 – 10 мМ, хлористий калій – 50 мМ, хлористий магній – 2,5 мМ, дезоксинуклеотидтрифосфати – 0,2 мМ кожний, диметилсульфоксид – 1%, праймери – 0,1 нМ. До 25 мкл суміші додавали Taq-полімерази 0,5 од., 4 мкл виділеної ДНК і 15 мкл вазелінової олії.

Температурні режими ампліфікації: денатурація – 94°C 30 секунд, відпал – 54°C 30 секунд, елонгація – 72°C 30 секунд. 4 мкл суміші, отриманої після першого туру, вносили у пробірки із сумішшю для другого туру (суміші відрізнялись лише набором праймерів) і проводили ще 30 циклів.

Після ампліфікації зразки досліджували методом горизонтального електрофорезу в 1,5% гелі агарози з 0,5 нг/мл етидіуму броміду і аналізували на транслюмінаторі («Біоком», Росія) при довжині збуджувального світла 310 нм.

Оцінку чутливості і специфічності розробленої системи проведено з використанням контрольних зразків ФДНУ «Центральний науково-дослідний інституту епідеміології» (РФ), контрольна панель серія 11.03.10.

Виділення ДНК з клінічних зразків (зіскрібки з уретри і цервікса) проводили за методом Sachse, Holzel (2002) з використанням протеїнази К, а також гуанідиновим методом (набори фірми «Літех»).

Для порівняння при дослідженні частини зразків поряд з розробленою системою використовували комерційну тест-систему «Полемік Хл» фірми «Літех». Дослідження реагентами фірми «Літех» проводили відповідно до умов виробника, а саме при таких температурних режимах: денатурація при 95°C впродовж однієї хвилини – один цикл, 35 циклів за наступною схемою: 94°C – 20 секунд, 60°C – 20 секунд, 72°C – 35 секунд, один цикл при 72°C впродовж однієї хвилини. Результати ампліфікації визначали горизонтальним електрофорезом в 1,5% гелі агарози.

Результати

При застосуванні розробленої системи для дослідження 12 зашифрованих зразків контрольної панелі ФДНУ «Центральний науково-дослідний інституту епідеміології» отримані результати повністю співпадали з референтними значеннями, що свідчить про високу чутливість і специфічність тест-системи. Дані відносно абсолютного вмісту копій ДНК *S. trachomatis* в позитивних зразках (10^5 – 10^3 копій в мл) дозволили визначити граничну чутливість розробленої системи. Для цього зробили серію двократних розчинів в буфері ТЕ зразка ДНК, що вміщував 10^3 копій в мл, усього 7 зразків, і визначили в них наявність ДНК хламідій за допомогою розробленої системи. Позитивні результати були отримані для зразків з концентрацією 500–32 копії ДНК в мл, наступний зразок (16 копій в мл) давав негативний результат, а ще один (4 копії в мл) – позитивний. Враховуючи те, що кожна копія ДНК хламідій вміщує до 10 копій ДНК криптической плазмиди, а для дослідження відбирається 4 мкл зразка, можна вважати, що система дозволила визначити наявність ДНК криптической плазмиди при вмісті її в зразку в кількості

20, 10, 5, 2,5 і 1,25 копій, при подальшому розведенні зразка і вмісті 0,63 копій результат був негативний, але наступний зразок із вмістом 0,32 копії дав позитивний результат. Отримані результати свідчать, що система має чутливість на рівні поодиноких молекул ДНК криптичної плазмиди, що відповідає концентрації 32 копій *C. trachomatis* в мл. Для подальших розчинів результат залежить від вірогідності влучення молекули плазмиди в реакційну суміш. Тому можливе чергування негативних і позитивних результатів, як це відбувається в методі цифрової ПЛР (digital PCR) (Pohl, Shih, 2004).

За допомогою розробленого методу нами було досліджено зразки, отримані у 1010 хворих з підозрою на хламідіоз, що відвідали поліклініку ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», серед них було 515 чоловіків та 495 жінок, вік хворих становив від 4 до 70 років. Як позитивний контроль використовували культуральні зразки лабораторного штаму *C. trachomatis* 434/Ві. Треба відзначити також, що амплікони, утворені після другого туру ампліфікації в позитивних зразках, були достатньо чіткими, що значно зменшувало сумніви щодо характеру реакції і кількість так званих «сумнівних» зразків.

При дослідженні 1010 зразків, отриманих у хворих з підозрою на хламідіоз, у 288 з них (28,5%) були виявлені ДНК *C. trachomatis* (табл. 1).

Таблиця 1.
Результати дослідження на ДНК *C. trachomatis* за допомогою розробленої тест-системи залежно від статі хворих

№	Характеристика групи	Кількість	Позитивні зразки		Сумнівні зразки		Негативні зразки	
			Абсолютна кількість	%	Абсолютна кількість	%	Абсолютна кількість	%
1	Усього хворих	1010	288	28,51	21	2,07	701	69,4
2	Чоловіки	515	143	14,2	13	1,29	360	35,6
3	Жінки	495	145	14,36	8	0,79	341	33,76

Отримані результати свідчать про досить високу чутливість системи, в середньому позитивні результати були отримані у 28,5% хворих, що збігається з даними літератури щодо можливості виявлення ДНК *C. trachomatis* у 30% хворих з групи підвищеного ризику (Schachter et al., 2005).

Для виключення можливості ампліфікації розробленою системою будь-яких інших ДНК, що були присутні в досліджуваних зразках, амплікони в частині досліджень піддавали рестриктивному аналізу – отриманий у першому турі ПЛР амплікон масою 377 п.н. обробляли рестриктазою HinfI фірми Takara, Японія. Для цього до ампліфікаційної суміші після першого туру ПЛР додавали 5 одиниць рестриктази і проводили інкубацію впродовж ночі при 37°C, після чого аналізували зразки шляхом горизонтального електрофорезу в гелі агарози. Приклад електрофореграми амплікону, отриманого у першому турі ампліфікації, після обробки рестриктазою HinfI наведений на рис. 1.

На електрофореграмі видно, що після рестрикції амплікону молекулярною масою 377 п.н. утворюються два менші фрагменти (222 п.н. та 155 п.н.), що співпадає з даними «теоретичної рестрикції» амплікону на сайті «Rebase» (<http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html>). Цей факт може слугувати додатковим доказом специфічності утворених при ампліфікації продуктів.

Для додаткової характеристики розробленої системи було проведено її порівняння з тест-системою Полемік-Хл фірми «Літех». За допомогою обох систем було протестовано 87 зразків, отриманих у хворих.

Результати порівняльної характеристики комерційної та запропонованої нами тест-системи наведені у табл. 2.

Таблиця 2.
Результати порівняння двох систем на визначення ДНК *Chlamydia trachomatis*

Тест-системи	Усього	Співпадіння результатів		Розходження результатів		Чутливість	Специфічність
		позитивні	негативні	позитивні	негативні		
Запропонована система	87 (100%)	10	63	14	0	100%	100%
«Літех»	87 (100%)	10	63	0	14	41,6%	100%

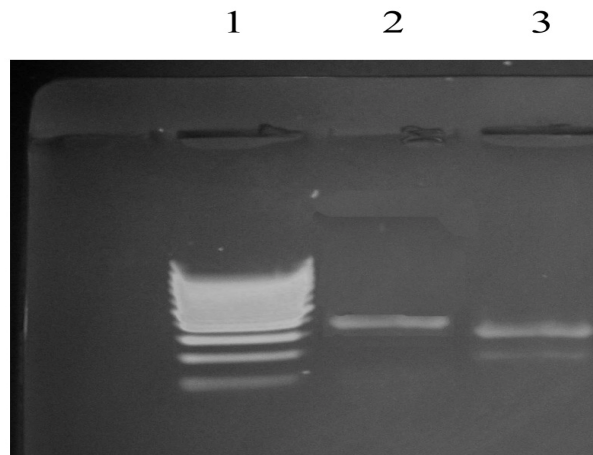


Рис. 1. Приклад електрофореграми продуктів ендонуклеазного розщеплення амплікону криптичної плазмиди *C. trachomatis* після обробки рестриктазою Hinf I

Примітки: трек 1 – маркер молекулярної ваги з фрагментами від 100 до 1000 п.н., трек 2 – амплікон криптичної плазмиди *C. trachomatis* з молекулярною масою 377 п.н., трек 3 – продукт ендонуклеазного розщеплення амплікону криптичної плазмиди *C. trachomatis* рестриктазою Hinf I.

Можна бачити, що співпадіння результатів було у 68 випадках, з котрих 10 були позитивні, а 58 – негативні. В той же час у 14 випадках визначалось розходження результатів, за даними нашої системи вони були позитивні, а за результатами системи «Літех» – негативні. Таким чином, за допомогою нашої системи було виявлено значно більше позитивних зразків, що свідчить про її високу чутливість.

Приклади електрофореграм результатів ПЛР на визначення *C. trachomatis* двома різними системами представлено на рис. 2 та 3. Слід зазначити, що наведені фотографії ілюструють результати діагностики одних й тих же хворих. Виходячи із задокументованих на фотографіях результатів, можна зробити висновок про хибно негативні результати після ампліфікації в декількох хворих з використанням комерційної тест-системи.

Таким чином, розроблена ПЛР-система відрізняється високою чутливістю, що дає змогу проводити виявлення *C. trachomatis* в клінічному матеріалі ще на початкових стадіях захворювання. Цей факт передусім позитивно відіб'ється на схемі лікування хворого, призводячи до зменшення медикаментозного навантаження на нього.

Виходячи з результатів проведеного нами дослідження, можна зробити висновок, що хламідійна інфекція виявляється з однаковою частотою і в чоловіків, і в жінок, число виявлених випадків в цих двох групах майже однакове. В той же час, число сумнівних зразків значно вище серед чоловіків, що може бути пов'язано з труднощами забору клінічного матеріалу і недостатньою кількістю копій ДНК для проведення дослідження. За результатами дослідження було отримано патент на корисну модель (Мавров та ін., 2010).

Обговорення

В дослідженнях, що передували розробці тест-системи, для визначення ДНК хламідій використовували один тур ампліфікації з праймерами, запропонованими F.B.Hashemi et al. (2007), але незадовільні результати ампліфікації – занадто низька чутливість дослідження і слабкі амплікони в більшості позитивних зразків – вимусли шукати можливості підвищити чутливість дослідження. Лише 5–7 % зразків, отриманих від хворих з групи підвищеного ризику, давали позитивну реакцію на ДНК хламідій. Тому було введено додатковий тур ампліфікації за принципом напівгніздової ПЛР з використанням прямого праймеру, що був запропонований F.B.Hashemi et al. (2007), і розробленого нами зворотного праймеру. Останній вибрали, виходячи з необхідності такої ж температури відпалу, як і в прямого праймеру, а також відсутності утворення димерів з ним, що перевіряли за допомогою програми Oligo Analyzer 3.1. Це дозволило зупинитись на послідовності для другого праймера 5'-CTGCTGTAATCACCCAGTCG-3'.

Використання принципу напівгніздової ПЛР дозволило значно спростити дослідження і зменшити його вартість, зробити його більш доступним для ПЛР-лабораторій із звичайним методом детекції результатів реакції електрофорезом в агарозі.

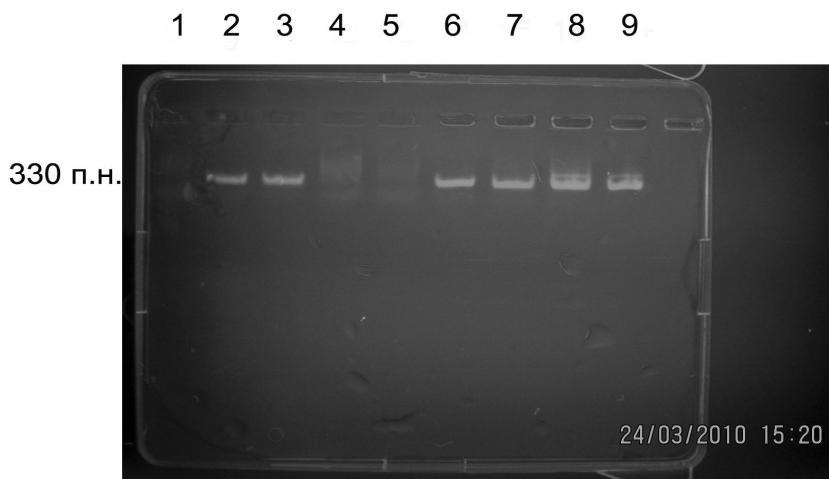


Рис. 2. Приклад електрофореграми продуктів ПЛР для діагностики *C. trachomatis* з використанням розробленої тест-системи

Примітки: трек 1 – негативний контроль ампліфікації; треки 2, 3, 6, 7, 8 – хворі, в яких діагностовано *C. trachomatis* методом ПЛР (в результаті другого туру ампліфікації утворюється амплікон з молекулярною масою 330 п.н.); треки 4, 5 – хворі, в яких не було виявлено ДНК *C. trachomatis* методом ПЛР; трек 9 – позитивний контроль ПЛР.

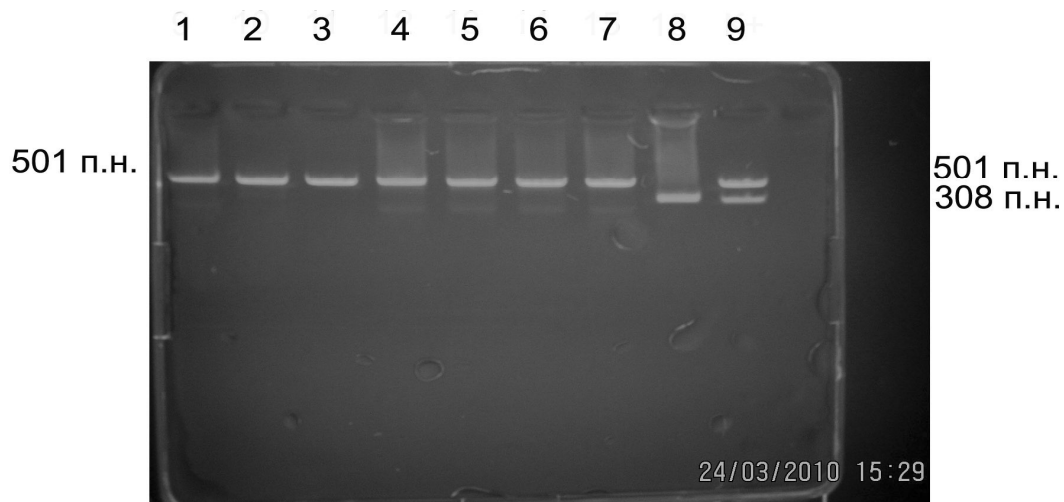


Рис. 3. Приклад електрофореграми продуктів ПЛР для діагностики *C. trachomatis* з використанням тест-системи фірми «Літех»

Примітки: трек 1 – негативний контроль ПЛР; треки 2, 3, 4, 5, 6, 7 – хворі, в яких не було виявлено ДНК *C. trachomatis*; трек 8 – клінічний зразок, в якому було діагностовано *C. trachomatis*; трек 9 – позитивний контроль ПЛР.

Як можна побачити з наведених результатів, проведення додаткового етапу ампліфікації забезпечує значне підвищення чутливості та специфічності визначення *C. trachomatis* у клінічних зразках, дозволяє уникнути впливу інгібіторів ампліфікації, які призводять до хибно негативних результатів. Результати реакції при цьому мають значно більшу визначеність. Введення в реакцію нового праймеру значно зменшує можливість утворення артефактів ампліфікації і дає можливість точніше визначити результати методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі.

Отримані дані свідчать про те, що розроблена система має значно вищу чутливість, ніж звичайні методи ПЛР-діагностики хламідіозу, які виявляють звичайно серед 100 досліджених зразків від 10 до 15% позитивних. В той же час сучасні ПЛР-тест-системи, засновані на принципі ПЛР в реальному часі або ПЛР-ІФА, виявляють до 28–30 % позитивних зразків, що цілком збігається з отриманими нами результатами (Schachter et al., 2005).

Крім підвищеної чутливості розроблена тест-система має і підвищену специфічність, бо включає додатковий етап ампліфікації із залученням додаткового праймеру.

Треба відзначити, що вказані переваги досягаються за рахунок дещо більшої трудомісткості дослідження, потрібно більше часу для постановки правильного діагнозу, що може призводити до незначної затримки у лікуванні хворих, але все це компенсується можливістю майже вдвічі збільшити кількість виявлених хворих на хламідіоз.

Дещо збільшена в новому методі можливість перехресної контамінації за рахунок додаткового етапу ампліфікації, але включення в дослідження контрольних зразків дозволяє своєчасно її виявляти.

Можна вважати, що необхідність в саме такому методі викликана тим, що останніми роками, у зв'язку з широким застосуванням сучасних антибактеріальних препаратів, значно змінились прояви хламідійної інфекції, збільшилась кількість прихованих форм інфекції, випадків персистенції хламідій. У цих випадках зменшується кількість збудників в клінічних зразках, змінюються їх властивості, в літературі існують дані навіть про можливість генетичних змін збудника, які заважають виявленню його звичайними методами ПЛР-дослідження.

Слід відзначити також досить високу чутливість розробленої ПЛР-системи, що, поза сумнівом, відіграє дуже важливу роль у своєчасній діагностиці та лікуванні уrogenітальної патології, викликаній таким збудником, як *C. trachomatis*.

Серед переваг тест-системи фірми «Літех» слід відмітити наявність внутрішнього контролю ампліфікації (у кожному зразку утворюється амплікон довжиною 501 п.н.), що виключає можливість отримання хибно-негативних результатів дослідження внаслідок присутності в зразках ДНК інгібіторів ампліфікації. В той же час присутність внутрішнього контролю може сприяти зменшенню чутливості дослідження за рахунок конкуренції з ДНК-мішенню під час ампліфікації. Але основною причиною, що обумовлює більш високу чутливість розробленої системи, безумовно, є додатковий тур ампліфікації, він забезпечує додатково високий рівень специфічності результату і дає можливість виявити хламідійну інфекцію при наявності значно меншої кількості збудника в зразку. Одночасно з цим треба зазначити, що висока чутливість системи вимагає постійної профілактики контамінації зразків і реагентів ампліконами, відокремлення перших етапів дослідження від постановки другого туру і електрофорезу.

Отримані результати клінічних досліджень свідчать, що розроблений ПЛР-метод виявлення ДНК *C. trachomatis* дозволяє значно підвищити рівень діагностики хламідійної інфекції, його перевагами, крім високої чутливості, можна вважати відносну простоту, малу вартість і можливість виконання в рамках традиційного ПЛР-обладнання із звичайним методом детекції результатів реакції електрофорезом в агарозі.

Список літератури

- Мавров Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. – К., 2006. – 524с. /Mavrov G.I. Khlamidiynnye infektsii: biologiya vzbuditeley, patogenez, klinika, diagnostika, lecheniye, profilaktika. – K., 2006. – 524s./
- Мавров І.І., Білосорзов О.П., Мілютина О.Й. Детекція *Chlamydia trachomatis* у клінічних зразках. Патент на корисну модель №47755 від 25.02.2010, бюл. №5. /Mavrov I.I., Bilosorov O.P., Milyutina O.Y. Detektsiya Chlamydia trachomatis u klinichnykh zrazkakh. Patent na korysnu model' №47755 vid 25.02.2010, byul. №5./
- 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. – P. 1–4.
- Herrmann B. A new genetic variant of *Chlamydia trachomatis* // Sex. Transm. Inf. – 2007. – Vol.83. – P. 253–254.

Magbanua J.P., Goh B.T., Michel C.E. Chlamydia trachomatis variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: molecular characterization and failure of single dose azithromycin // Sex. Transm. Infect. – 2007. – Vol.83. – P. 339–343.

Pohl G., Shih I-M. Principle and applications of digital PCR // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2004. – Vol.4 (1). – P. 41–47.

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 K.Sachse and J.Frey, Humana. – Press Inc., Totowa, NJ, 2002. – P. 123–136.

Schachter J., Hook E., Martin D. et al. Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: all NAATs are not created equal // J. Clin. Microbiology. – 2005. – Vol.43, №3. – P. 1372–1373.

Shattock R., Patrizio C., Simmonds P., Sutherland S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in genital swabs: comaration of commercial and in house amplification methods with culture // Sex. Transm. Inf. – 1998. – Vol.74. – P. 289–293.

Xiong L., Kong F., Zhou H., Gilbert G. Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis* // J. Clin.Microbiol. – 2006. – Vol.44 (4). – P. 1413–1418.

Представлено: С.І.Похил / Presented by: S.I.Pokhyl

Рецензент: Н.В.Багацька / Reviewer: N.V.Bagatskaya

Подано до редакції / Received: 01.03.2011.