

© Е.В. Шипицына¹,
Н.Е. Воробьева²,
А.М. Савичева¹,
Е.В. Соколовский², А.Е. Гущин³,
П.Г. Рыжих³, Г.А. Шипулин³,
П.Н. Кротин⁴, Л.В. Меркулова⁴,
О.Ю. Ландина⁴

¹ НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург;

² Государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург;

³ ФГУН Центральный НИИ
эпидемиологии Роспотребнадзора,
Москва;

⁴ Молодежный центр «Ювента»,
Санкт-Петербург

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (NASBA-REAL-TIME) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

■ Целью данного исследования явилась оценка метода NASBA-Real-Time (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification в реальном времени) для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. Всего были обследованы 193 пациента в возрасте от 16 до 42 лет (средний возраст 22,8 года), при этом большинство из них имели симптомы урогенитальной инфекции. Соскобы эпителия цервикального канала у женщин и уретры у мужчин были исследованы методами культуры клеток, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и NASBA-Real-Time. Хламидийная инфекция была диагностирована у 29 пациентов (15 %); у 21 из них хламидии были обнаружены всеми тремя методами, тогда как 8 проб были отрицательными в культуре. Рассчитанная диагностическая чувствительность обоих молекулярных методов составила 100 %, культурального – 78,4 %. Прогностическая значимость отрицательных результатов для ПЦР и NASBA составила 100 %, для КК – 95,3 %. Специфичность, а также прогностическая значимость положительных результатов всех трех методов равнялась 100 %. Таким образом, новый тест на основе метода NASBA в реальном времени обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может быть рекомендован в качестве подтверждающего метода для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции.

■ **Ключевые слова:** *Chlamydia trachomatis*; 16SpPHK; МАНК; ПЦР; NASBA-Real-Time

Введение

Урогенитальная хламидийная инфекция относится к числу самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). Быстрому распространению хламидий в популяции способствуют неспецифичность симптомов и частое бессимптомное течение заболевания. Современная диагностика урогенитальной хламидийной инфекции основана на выделении хламидий в культуре клеток (КК), выявлении их антигенов методами иммуноферментного анализа (ИФА-АГ) или прямой иммунофлуоресценции (ПИФ), а также выявлении их нуклеиновых кислот (НК). Сравнительные исследования существующих методов показывают, что в настоящее время только методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), обладающие очень высокой чувствительностью и специфичностью, способны обеспечить адекватную диагностику хламидийной инфекции, особенно в популяции бессимптомных пациентов [11]. К преимуществам этих методов относится также возможность использования клинических образцов, полученных неинвазивным путем, таких, как моча. Кроме того, автоматизация МАНК позволяет одновременно проводить анализ большого количества проб.

Помимо полимеразной цепной реакции (ПЦР), достаточно известного в нашей стране метода, к числу МАНК относятся методы амплификации нуклеиновых кислот, основанные на транскрипции — Transcription Mediated Amplification (ТМА[®], Gen-Probe, США) и Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA[®], BioMérieux, Франция). В основе метода NASBA лежит экспоненциальное накопление одноцепочечных фрагментов РНК за счет конкурентного действия трех ферментов — AMV-ревертазы, рибонуклеазы-Н и РНК-полимеразы фага Т7 с двумя специфическими праймерами в изотермических условиях. При начальном количестве 10–100 копий РНК-мишени в результате реакции может генерироваться до 10¹⁴ копий РНК-продукта [12]. Поскольку мишенью для амплификации методом NASBA служат НК, существующие в одноцепочечной форме — РНК, то основными областями применения этого метода являются диагностика инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами, изучение экспрессии бактериальных и вирусных генов, а также диагностика бактериальных инфек-

ций, основанная на выявлении рибосомной РНК (рРНК) [4]. Так как в живых микроорганизмах количество рибосом может находиться в пределах от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч на бактериальную клетку, то рРНК является идеальной мишенью с точки зрения высокой чувствительности теста. Использование технологии NASBA для диагностики хламидийной инфекции было описано Mahony J.B. с соавт. [7] и Morge S. с соавт. [9], однако достаточно трудоемкие методы детекции продуктов амплификации, используемые в данных работах, препятствовали широкому внедрению этой технологии. Не так давно для детекции продуктов NASBA была предложена технология флуоресцентно-меченых зондов — молекулярных маячков (molecular beacons) [6], используемая в современной модификации ПЦР — ПЦР в реальном времени. Данная технология позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации непосредственно в процессе реакции в режиме реального времени, что существенно сокращает время анализа, снижает риск контаминации и увеличивает специфичность теста.

Целью данного исследования явилась оценка метода NASBA-Real-Time для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. Были проанализированы диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, прогностическая значимость отрицательных и положительных результатов метода NASBA-Real-Time в сравнении с результатами, полученными при использовании методов КК и ПЦР.

Материалы и методы

Клинический материал

Клинический материал был получен от пациентов амбулаторных отделений НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта и молодежного центра «Ювента», Санкт-Петербург, обратившихся к врачу с симптомами урогенитальной инфекции (зуд, выделения из половых органов, дизурия), а также пациентов, чьи партнеры имели симптомы урогенитальной инфекции. Участвовать в исследовании были приглашены мужчины и небеременные женщины в возрасте от 16 до 45 лет, не принимавшие антибиотики в течение последнего месяца. На всех пациентов были заполнены анкеты с вопросами о возрасте, сексуальном поведении, причине обращения к врачу, перенесенных в прошлом урогенитальных инфекциях. Соскобы эпителия цервикального канала у женщин и уретры у мужчин собирали в пластиковые пробирки объемом 5 мл (ELKAY, США), содержащие 1 мл транспортной среды (сахарозо-фосфатный буфер), затем транспортировали в лабораторию при

4 °С и до анализа замораживали до –70 °С. От каждого пациента был также взят мазок для анализа методом прямой микроскопии после окраски по Граму. Диагноз цервицита/уретрита ставили на основании клинической картины и данных прямой микроскопии (при количестве лейкоцитов в материале из цервикального канала > 10 при 1000-кратном увеличении и материале из уретры > 5).

Выделение *Chlamydia trachomatis* в культуре клеток McCoу

Клетки линии McCoу выращивали в пластиковых 75 см² матрасах (Sarstedt, США) при 36 °С в среде RPMI 1640 (ICN Pharmaceuticals, США) с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов коров (ICN Pharmaceuticals, США), 20 mM HEPES (ICN Pharmaceuticals, США) и 2 mM глутамина (ICN Pharmaceuticals, США). Для культивирования хламидий клетки вносили в 96-луночные пластиковые планшеты (Sarstedt, США) в количестве ~10⁴ на лунку и инкубировали в течение 24 часов при 36 °С в 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе HERA cell (Heraeus, Германия). Затем среду удаляли, в лунки вносили по 0,2 мл клинического материала (каждую пробу тестировали в двух лунках) и центрифугировали планшеты при 1700 g в течение 1 часа в центрифуге BR 3.11 (Jouan, Франция). После этого пробы инкубировали при 36 °С в 5 % CO₂ в течение 2 часов, затем среду удаляли, добавляли в лунки по 0,2 мл инкубационной среды [среда RPMI 1640, содержащая 0,5 % глюкозы, 10 % сыворотки эмбрионов коровы, 25 мкг/мл ванкомицина (ICN Pharmaceuticals, США), 25 мкг/мл гентамицина (ICN Pharmaceuticals, США), 2,5 мкг/мл амфотерицина В (ICN Pharmaceuticals, США) и 1 мкг/мл циклогексимида (ICN Pharmaceuticals, США)]. После инкубации в течение 72 часов при 36 °С в 5 % CO₂ среду удаляли и фиксировали клетки 96 % этанолом в течение 10 минут, после чего промывали клетки фосфатно-солевым буфером и окрашивали видоспецифическими моноклональными антителами, мечеными флуоресцеином (*Chlamydia Direct IF*, BioMerieux, Франция). Визуализацию хламидийных включений проводили при 200-кратном увеличении с использованием инвертированного микроскопа Olympus CKX41 (Olympus, Япония).

Выделение нуклеиновых кислот

Выделение нуклеиновых кислот из клинических проб проводили с помощью комплекта реагентов NucliSens® Isolation Reagents (BioMerieux, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Для контроля эффективности выделения ДНК/РНК, а также контроля амплификации ПЦР и NASBA-Real-Time использовали внутренние контрольные образцы (ВКО), предусмотренные

в обеих амплификационных тест-системах. Оба ВКО вносили в каждую пробирку с клиническим материалом и в пробирки для отрицательного и положительного контролей непосредственно перед добавлением лизирующего раствора. В качестве отрицательного контроля использовали среду для транспортировки клинических проб, в положительный контроль добавляли рекомбинантные положительные контрольные образцы (ПКО), входящие в состав тест-систем ПЦР и NASBA-Real-Time. Таким образом, для обеих реакций амплификации — ПЦР и NASBA-Real-Time — готовили общие препараты нуклеиновых кислот из клинических образцов.

ПЦР

Для тестирования клинических образцов методом ПЦР использовали тест-систему «Ампли-Сенс *Chlamydia trachomatis*» с электрофоретической детекцией продуктов амплификации (ЦНИИ эпидемиологии, Россия), в которой в качестве мишени для амплификации используется фрагмент криптической плазмиды *C. trachomatis*. Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

NASBA-Real-Time

Для детекции *C. trachomatis* использовали универсальные реагенты – NucliSens® Basic Kit (BioMerieux, Франция) и реагенты, специфические для мишени – праймеры и флуоресцентно-меченые гибридизационные зонды, специфические для участка 16S рРНК *C. trachomatis*, рекомбинантные препараты ВКО и ПКО на основе РНК-содержащего MS2-фага, а также флуоресцентно-меченый зонд к ВКО (ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Анализ клинических проб методом NASBA-Real-Time проводили в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию NASBA с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени проводили в анализаторе NucliSens® EasyQ Analyser (BioMerieux, Франция). Интерпретацию результатов осуществляли согласно инструкции по применению тест-системы.

Результаты

Всего было обследовано 193 пациента – 156 женщин и 37 мужчин в возрасте от 16 до 42 лет (средний возраст 22,8 года). Большинство пациентов (145 или 75 %) обратились к врачу с жалобами на зуд, выделения из половых органов, дизурию, остальные 48 человек жалоб не имели: причинами их обращения к врачу служили выявление ИППП у партнера или желание обследоваться после перенесенной в прошлом урогенитальной инфекции. Диагноз цервицита/уретрита был поставлен 94 из 145 пациентов (65 %) с симптомами урогенитальной инфекции. Соскобы эпителия цервикального канала у женщин и уретры у мужчин исследовали методами КК, ПЦР и NASBA-Real-Time.

Результаты тестирования в разных группах пациентов представлены в табл. 1. Хламидийная инфекция была диагностирована у 27 из 145 пациентов (18,6 %) с симптомами урогенитальной инфекции. При этом амплификационными методами хламидии выявлялись в 1,4 раза чаще, чем методом КК. Из 94 пациентов, которые имели лабораторные признаки цервицита/уретрита, у 25 человек (26,6 %) были обнаружены хламидии. В этой группе всеми тремя методами возбудитель обнаруживался у 19 человек (20 %) и дополнительно с помощью МАНК — у 6 пациентов (6,3 %). Среди пациентов с различными жалобами, но без лабораторных признаков цервицита/уретрита (n = 51), хламидии были выявлены у двух пациентов (3,9 %) только методами ПЦР и NASBA-Real-Time. У двух из 48 пациентов (4,2 %), не имевших симптомов урогенитальной инфекции и признаков цервицита/уретрита, всеми тремя лабораторными методами также были обнаружены хламидии: оба пациента указали в анкете, что перенесли хламидийную инфекцию в прошлом.

Анализ результатов всех обследованных пациентов показал, что у 21 человека (11 %) хламидии обнаруживались всеми тремя методами — КК, ПЦР и NASBA-Real-Time. Дополнительно, у 8

Таблица 1

Выявление *Chlamydia trachomatis* в разных группах пациентов

Метод	Пациенты (n = 193)		
	С симптомами урогенитальной инфекции (n = 145)		Без симптомов (n = 48)
	с цервицитом/уретритом (n = 94)	без цервицита/уретрита (n = 51)	
Только КК	0	0	0
Одновременно КК/ПЦР/ NASBA	19 (20,2 %)	0	2 (4,2 %)
Только ПЦР/NASBA	6 (6,3 %)	2 (3,9 %)	0
Всего:	25 (26,6 %)	2 (3,9 %)	2 (4,2 %)

Таблица 2

Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительных и отрицательных результатов методов культуры клеток, ПЦР и NASBA

Метод	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Прогностическая значимость	
			положительных результатов (%)	отрицательных результатов (%)
КК	78,4	100	100	95,3
ПЦР	100	100	100	100
NASBA	100	100	100	100

пациентов, были обнаружены НК *C. trachomatis* с помощью ПЦР и NASBA-Real-Time. Во всех случаях результаты ПЦР и NASBA-Real-Time совпали друг с другом. В итоге наличие хламидийной инфекции можно считать установленным у 29 (15 %) пациентов. Таким образом, чувствительность обоих молекулярных методов равнялась 100 %, культурального — 78,4 %. Прогностическая значимость отрицательных результатов для ПЦР и NASBA-Real-Time в данной группе составила 100 %, для КК — 95,3 %. Специфичность, а также прогностическая значимость положительных результатов всех трех методов равнялась 100 % (табл. 2).

Обсуждение результатов

Инфекция мочеполовых органов, вызванная *C. trachomatis*, не имеет специфических клинических признаков и в значительном проценте случаев протекает бессимптомно, в связи с чем в постановке этиологического диагноза урогенитальной хламидийной инфекции ключевая роль отводится методам лабораторной диагностики.

В последние годы МАНК постепенно вытесняют другие методы, используемые в рутинной диагностике урогенитальной хламидийной инфекции, благодаря высокой чувствительности, специфичности, воспроизводимости и высокой пропускной способности. Проведенные Battle T. J. и соавт. [2] расчеты показали, что при использовании неамплификационных методов диагностики хламидийной инфекции (КК, ПИФ, ИФА-АГ) пропускается от 20 до 40 % случаев инфицирования *C. trachomatis*.

В нашей стране из всего спектра МАНК, используемых для выявления *C. trachomatis*, до последнего времени метод ПЦР был единственным. В то же время высокая аналитическая чувствительность ПЦР с электрофоретическим методом анализа продуктов амплификации и несоблюдением правил организации ПЦР-лаборатории часто ведут к получению ложно-положительных результатов. Это означает, что использование ПЦР как единственного лабораторного инструмента диагностики хламидийной инфекции может вести к диагностическим ошибкам. На данный момент в

отечественной практике общепринятым считается использование двух методов диагностики хламидийной инфекции, один из которых — ПЦР. Выбор второго метода пока никак не регламентирован и осуществляется, как правило, исходя из текущих возможностей диагностической лаборатории (чаще это метод ПИФ) или на основании существующих стереотипов, рассматривающих метод КК как идеальный метод подтверждения, другими словами — «золотой стандарт». Бесспорно, КК обладает специфичностью и прогностической значимостью положительных результатов, близкими к 100 %. Однако, как свидетельствуют результаты зарубежных исследований, например, мультицентрового сравнения амплификационных и неамплификационных тестов для выявления *C. trachomatis* на материале, полученном от более трех тысяч женщин, диагностическая чувствительность КК находится в пределах от 74,7 до 81,5 % [3]. Еще раньше, на материале, полученном от почти пяти тысяч женщин, было показано, что чувствительность ПИФ и ИФА-АГ, в свою очередь, по отношению к КК варьировала от 62 до 75 % [10]. В связи с этим представляется некорректным для подтверждения результатов высокочувствительного метода ПЦР использовать методы, имеющие меньшую чувствительность. В частности, в современных руководствах ведущей международной организации по контролю над заболеваниями CDC (Centers for Disease Control and Prevention) подчеркивается, что для подтверждения положительных результатов при диагностике хламидийной инфекции, полученных с использованием МАНК, не должны использоваться методы, обладающие более низкой чувствительностью, такие как КК, ПИФ или ИФА-АГ [5].

В работе Morge S. и соавт. [9] было показано, что аналитическая чувствительность теста на выявление 16S рРНК хламидий на основе метода NASBA на один-два порядка превышает аналитическую чувствительность теста на выявление криптической плазмиды *C. trachomatis* с применением метода ПЦР, поскольку даже в метаболически неактивных элементарных тельцах содержится порядка тысячи рибосом на клетку [1]. Аналогичные результаты были получены нами при сравнении предела детекции методов

NASBA-Real-Time и ПЦР (неопубликованные данные). При этом следует добавить, что метод NASBA-Real-time в полной мере соответствует и другим критериям, используемым при выборе дополнительного (подтверждающего) теста при ПЦР-диагностике хламидийной инфекции: другая мишень для амплификации (для ПЦР – фрагмент криптической плазмиды, для NASBA-Real-Time — фрагмент 16SpPHK), другой тип НК (для ПЦР — ДНК, для NASBA-Real-Time — РНК) и иной принцип амплификации (ПЦР — моноферментная термоциклическая реакция, NASBA-Real-Time — мультиферментная изотермическая амплификация) [8].

Полученные в данной работе результаты еще раз подчеркивают роль хламидийной инфекции в этиологии цервицита и уретрита. Показатель распространенности хламидийной инфекции среди пациентов с диагнозом цервицита/уретрита составил 26,6 %, что в несколько раз выше частоты выявления хламидий у пациентов с симптомами урогенитальной инфекции, но без цервицита/уретрита (3,9 %), а также у бессимптомных пациентов (4,2 %). В исследованной нами группе пациентов диагностическая чувствительность обоих амплификационных тестов оказалась одинаковой и выше, чем КК (100 и 78,4 %, соответственно), что позволило выявить дополнительное число инфицированных лиц. Таким образом, полученные нами результаты дают основание утверждать, что метод NASBA-Real-Time, обладающий высокой специфичностью и не уступающий в чувствительности методу ПЦР, может применяться в качестве дополнительного (подтверждающего) метода при диагностике урогенитальной хламидийной инфекции.

Литература

1. *An Q., Radcliffe G., Vassallo R., et al.* Infection with a plasmid-free variant of chlamydia related to *Chlamydia trachomatis* identified by using multiple assays for nucleic acid detection // *J. Clin. Microbiol.* — 1992. — Vol. 30. — P. 2814–2821.
2. *Battle T.J., Golden M.R., Suchland K.L., et al.* Evaluation of laboratory testing methods for *Chlamydia trachomatis* infection in the era of nucleic acid amplification // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 2924–2927.
3. *Black C.M., Marrazzo J., Jonson R.E., et al.* Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 3757–3763.
4. *Deiman B., van Aarle P., Sillekens P.* Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) // *Mol. Biotech.* — 2002. — Vol. 20. — P. 163–179.
5. *Johnson R.E., Newhall W.J., Papp J.R., et al.* Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections // *Morbidity and Mortality Weekly Reports.* — 2002. — Vol. 51 (RR-15). — P. 1–38.
6. *Leone G., van Schijndel H., van Gemen B., et al.* Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA // *Nucleic Acids Res.* — 1998. — Vol. 26. — P. 2150–2156.
7. *Mahony J.B., Song X., Chong S., et al.* Evaluation of the NucliSens Basic kit for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 1429–1435.
8. *McAdam A.J.* Discrepant analysis: how can we test a test? // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 43. — P. 2027–2029.
9. *Morre S., Sillekens P., Jacobs M.V., et al.* RNA amplification by nucleic acid sequence-based amplification with an internal standard enables reliable detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapings and urine samples // *J. Clin. Microbiol.* — 1996. — Vol. 34. — P. 3108–3114.
10. *Newhall W. J., Johnson R.E., Delisle S. et al.* Head-to-head evaluation of five *Chlamydia* tests relative to a quality-assured culture standard // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 681–685.
11. *Stary A.* Diagnosis of genital chlamydial infections in the era of amplification technologies // In: *Proceedings of the Fifth Meeting of the Society for Chlamydia Research* (Deak J. ed.). — Budapest: University of Szeged. — 2004. — P. 61–63.
12. *Weusten J.J., Carpay W.M., Oosterlaken T. et al.* Principles of quantification of viral load using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Vol. 30. — P. 6–26.

EVALUATION OF A REAL-TIME NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION (NASBA) ASSAY FOR DIAGNOSIS OF UROGENITAL CHLAMYDIAL INFECTION

Shipitsyna E.V., Vorobyova N.E., Savicheva A.M., Sokolovsky E.V., Guschin A.E., Ryzhikh P.G., Shipulin G.A., Krotin P.N., Merculova L.V., Landina O.Y.

■ **Summary:** This study was aimed to evaluate a new real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA-Real-Time) assay for diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. A total of 193 patients aged 16 to 42 (mean age, 22,8 years) were examined, with most of them having symptoms of urogenital infection. Cervical and urethral swabs from women and men, respectively, were investigated with the use of cell culture method, polymerase chain reaction (PCR) and NASBA-Real-Time. *C. trachomatis* infection was diagnosed in 29 patients (15 %): in 21 patients – by all the three methods, whereas 8 samples were culture negative. Sensitivity of PCR and NASBA-Real-Time methods were 100 %, cell culture method – 78,4 %. Negative predictive value of PCR and NASBA-Real-Time was found to be 100 %, and that of cell culture – 95,3 %. Specificity as well as positive predictive values of all the three methods equaled 100 %. Thus, the new real-time NASBA-Real-Time assay was shown to be a very sensitive and specific test, which can be recommended as a confirmatory method for diagnosis of urogenital chlamydial infection.

■ **Key words:** *Chlamydia trachomatis*; 16S rRNA; NAAT; PCR; NASBA-Real-Time