

РЕЗУЛЬТАТЫ АТТЕСТАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *Chlamydia trachomatis* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

¹Манзенюк И.Н., ¹Воробьева М.С., ¹Волкова Р.А., ¹Никитюк Н.М.,
²Воронцова Т.Н., ²Потапова Т.Н., ³Шипулин Г.Ю., ⁴Комаров А.Б., ⁵Черный О.В.
¹ГИСК им. Л.А. Тарасевича, ²ФЦ ГСЭН, ³ЦНИИЭ, ⁴ООО "Компания Биокон", ⁵ЗАО
"Лагис", Москва

По результатам клинических испытаний в условиях шифрованного опыта тест-системы "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis*-330p/630BC"; "СТ скрин™ ПЦР-тест" и "ДиаГен-*Chlamydia*" рекомендованы в практику здравоохранения для диагностики хламидийной инфекции в соскобах уrogenитального тракта в качестве подтверждающего теста. Показана необходимость автоматизации методов молекулярной диагностики и разработки коммерческих ПЦР-тест-систем следующего поколения.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, полимеразная цепная реакция, диагностика.

Решающее значение в выявлении хламидийных инфекций имеют методы лабораторной диагностики, которые основываются на прямом методе исследования: выявление возбудителя, его антигенов или ДНК/РНК, а также данных серологии: обнаружение антихламидийных антител.

До недавнего времени золотым стандартом в лабораторной диагностике инфекций, вызванных *C. trachomatis*, считался культуральный метод. Однако в ряде исследований было показано, что его чувствительность может составлять менее 85 %. Кроме этого культуральный метод имеет ряд ограничений, связанных как с трудностями, возникающими при культивировании данного возбудителя, так и с длительностью самого процесса культивирования.

Методы диагностики, направленные на определение антигена в иммуноферментном анализе, в прямой иммунофлуоресценции, а также в экспресс-тестах, по своей чувствительности уступают культуральному методу.

Генодиагностика инфекционных заболеваний прочно вошла в мировую диагностическую практику. Для выявления *C. trachomatis* используется ряд диагностических тестов, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью. Эти тест-системы направлены на выявление ДНК/РНК *C. trachomatis* и включают: гибридационные тесты (PAGE2, "Gen-Probe", США) и тесты, основанные на амплификационных технологиях нуклеиновых кислот: ПЦР-тест – на основе полимеразной цепной реакции ("Amplicor *Chlamydia trachomatis* Test", фирмы Хоффман ля Рош, имеющей сертификат US FDA); ЛЦР-тест на основе лигазной цепной реакции (LCR, LCx, ф. "Abbott laboratories", США, имеющей сер-

тификат US FDA), а также сравнительно недавние разработки: NASBA-тест, первоначальное название 3 SR – самоподдерживающаяся реакция репликации (Organon Teknica); BD Probe Tec ET System (SDA-тест), амплификация с вытеснением цепи ("Becton Dickinson", США); Q-beta (QB) – репликационный метод ("Gen-Track"), ТМА-тест, метод изотермической транскрипционной амплификации ("Gen-Probe", США) и др. [2,3]

Отличительная особенность перечисленных тестов – возможность автоматизации учета результатов и стандартизации. Использование тестов для выявления РНК позволяет детектировать живые клетки *C. trachomatis* и оценивать эффективность антибиотикотерапии.

В РФ широкое распространение получили амплификационные технологии на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Тест-системы от различных производителей, которые были представлены с целью внедрения в практику здравоохранения, относятся к тест-системам первого поколения, в которых продукт амплификации детектируется визуально (субъективно) при разделении в агарозном геле, с последующим сохранением результатов на пленке путем фотографирования или сканирования геля на компьютере с использованием видеосистем с программным обеспечением. Данные тест-системы отличаются друг от друга по несущественным технологическим признакам и в них используют стандартную схему проведения ПЦР-анализа.

Цель работы заключалась в оценке диагностической эффективности трех отечественных тест-систем, предназначенных для выявления ДНК *C. trachomatis* методом ПЦР, представленных для аттестации в ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Материалы и методы

В работе были использованы по 3 экспериментально-производственных серий следующих тест-систем:

- “АмплиСенс™ Chlamydia trachomatis-33Op/63OBC”, разработанная ЦНИИЭ МЗ РФ, представляющая собой многокомпонентный набор для выявления ДНК криптической плазмиды Chlamydia trachomatis методом ПЦР. Тест-система состоит из трех комплектов: комплект № 1 – “ДНК-сорб” для выделения ДНК; комплект № 2 – “АмплиСенс-2” для проведения ПЦР; комплект № 3 – “ЭФ-200” для электрофоретического анализа продуктов ПЦР. В качестве контролей используют: отрицательный контрольный образец – сыворотка крови крупного рогатого скота; положительный контрольный образец – водный раствор ДНК *S. trachomatis*, содержащий 5×10^5 копий/мл (по ДНК криптической плазмиды); ДНК внутреннего контрольного образца (водный раствор специфической рекомбинантной плазмиды); два отрицательных контроля на стадии амплификации – ДНК (ДНК-буфер) и ДНК плаценты человека. Тест-система предназначена для проведения 100 анализов, включая контрольные пробы. Заявленная чувствительность тест-системы – не менее 500 клеток Chlamydia trachomatis в пробе (100 мкл).
- “СТ скрин™ ПЦР тест”, разработанная ООО “Компания Биоком”, представляющая собой многокомпонентный набор для выявления 16S рДНК Chlamydia trachomatis методом ПЦР. Тест-система состоит из трех комплектов: комплект №1 для выделения ДНК; комплект №2 для амплификации ДНК; комплект № 3 для детекции ДНК. В качестве контролей используют: положительный контрольный образец – водный раствор рекомбинантной плазмиды, содержащей специфическую вставку ДНК *S. trachomatis*; отрицательный контрольный образец – плазида ДНК человека – водный раствор ДНК плаценты человека. Одна тест-система рассчитана на постановку 100 реакций, включая контрольные образцы. Заявленная чувствительность тест-системы – не менее 100 клеток Chlamydia trachomatis в пробе (100 мкл).
- “ДиаГен -Chlamydia”, разработанная ЗАО “ЛАГИС”, представляет собой многокомпонентный набор для выявления ДНК гена гликозилтрансферазы (*gseA*) Chlamydia trachomatis методом ПЦР. Разработанная тест-система состоит из трех комплектов: комплект №1 для выделения ДНК; комплект №2 для амплификации ДНК; комплект № 3 для детекции ДНК. В качестве контролей используют: положительный контрольный образец – водный раствор рекомбинантной плазмиды, содержащий специфическую вставку ДНК (*gseA*) *S. trachomatis* (концентрация 1 нг/мл); отрицательный контрольный образец – водный раствор ДНК плаценты человека. Одна тест-система рассчитана на постановку 100 реакций, включая контрольные образцы. Заявленная чувствительность тест-системы – не менее 100 клеток Chlamydia trachomatis в пробе (100 мкл).

Назначение всех трех тест-систем – выявление ДНК Chlamydia trachomatis в соскобах эпителия уrogenитального тракта.

В качестве референс-препарата использована тест-система фирмы Хоффман ля Рош “Amplior Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) Test”, которая является тест-системой второго поколения (PCR-ELISA), основанной на гибридизации специфической олигонуклеотидной пробой продукта амплификации с последующей инструментальной оценкой интенсивности окраски образовавшегося ампликон-биотин-авидин-ферментного комплекса с помощью плащечного фотометра. Тест-система состоит из следующих комплектов: Amplior CT/NG Specimen Preparation Kit, Amplior CT/NG Amplification Kit, Amplior Chlamydia trachomatis Detection Kit. Тест-система выявляет ДНК криптической плазмиды *S. trachomatis*. Аналитическая чувствительность 80 кл/мл. Учет реакции проводили при длине волны 450нм, при $OP_{крит} = 0,2$. Отрицательными образцами считались пробы с $OP < 0,2$; положительные образцы имели $OP > 0,8$; “серая” зона, сомнительные образцы, имели $OP 0,2-0,8$. Если при повторе данные образцы давали аналогичные результаты OP , их считали положительными.

Лабораторный контроль серий тест-систем проводили, используя биомассу штаммов *S. trachomatis*, *S. psittaci* – концентрация 5×10^7 кл/мл (материалы были предоставлены Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН и Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН), очищенной ДНК *S. trachomatis* – концентрация 5×10^6 , ДНК плаценты человека (ЗАО ЛАГИС), гетерологичных микроорганизмов.

Материалом исследования служили соскобы эпителия уrogenитального тракта больных и здоровых лиц, полученных из ФЦ ГСЭН РФ и 1-инфекционной больницы. Забор проб производился согласно инструкциям по применению препаратов. Пробы перед формированием опытной и контрольной групп были подвергнуты скринингу референс тест-системой – Хоффман ля Рош, Швейцария, “Amplior Chlamydia trachomatis Test”. Таким образом, были отобраны положительные (опытная группа) и отрицательные (контрольная группа) образцы с наличием или отсутствием ДНК Chlamydia trachomatis (табл. 1).

Опытная группа (64 человека) была сформирована из лиц с различными заболеваниями уrogenитального тракта хламидийной этиологии. Материалом исследования служили соскобы слизистой из очагов поражения уrogenитального тракта (уретры, цервикального канала) от больных с клинически установленными диагнозами (уретрит, простатит, цервицит и т.д.).

В контрольную группу (116 человек) были включены соскобы от лиц с клинически и лабораторно установленными диагнозами заболеваний мочеполовой сферы нехламидийной этиологии (уреаплазмоз, микоплазмоз, гоноррея, герпес, трихомониаз, гарднереллез), а также здоровых людей при обследовании которых ПЦР-анализ на основные возбудители инфекций, передающихся половым путем не выявил ни одного из них.

Оценку диагностической ценности тест-систем проводили по показателям чувствительности и специфичности в сравнении с референс-тест-системой, а также по воспроизводимости. Вычисляли показатели чувствительности, специфичности, воспроизводимости в

процентном отношении для испытуемой тест-системы в сравнении с референс-тест-системой.

Воспроизводимость оценивали путем десятикратной постановки шифрованных образцов (2 положительных и 2 отрицательных образца). Положительные образцы №1 (аналогично и №2) готовили путем объединения трех заведомо положительных (установлено с референс-тест-системой) проб по 120 мкл каждая, с последующим разведением пула до необходимого объема в 10 раз телячьей сывороткой. Каждый из приготовленных образцов был разделен на 30 одинаковых проб по 100 мкл (по 10 проб для каждой из испытуемых тест-систем). Аналогично готовили и отрицательные образцы.

Клинические испытания были проведены в соответствии с требованиями контролируемого шифрованно-го опыта.

Образцы (соскобы) от лиц опытной и контрольной групп были зашифрованы сотрудниками эпидотдела

ГИСК им. Л.А. Тарасевича и до начала работ хранились при минус 20 °С.

Исследования были проведены в период срока годности препаратов. После проведения исследований образцы были расшифрованы и проведен анализ результатов для оценки чувствительности, специфичности и воспроизводимости.

Результаты и обсуждение

При титровании штаммов *S.trachomatis* (от 5×10^6 кл/мл до 5 кл/мл) было показано, что тест-система "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis*-330p/630BC" выявляет ДНК *S.trachomatis* в заявленной концентрации не менее 5×10^3 копий /мл (500 копий в 100 мкл образца для выделения), тест-система "СТ скрин™ ПЦР-тест" выявляет ДНК *S.trachomatis* в количестве не менее 1×10^3 копий/мл (100 копий в 100 мкл образца для выделения), тест-система "ДиаГен-*Chlamydia*" выявляет ДНК

Таблица 1

Результаты скрининга клинического материала референс тест-системой – Хоффман ля Рош, Швейцария, "Amplicor Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) Test"

"Amplicor Chlamydia trachomatis Test"

| Общее количество | Положительные ОП>0,8 | Слабоположительные (сомнительные (±) ОП 0,2-0,8 | Отрицательные ОП<0,2 |
|------------------|----------------------|---|----------------------|
| 180 | 57 | 7 | 116 |

Таблица 2

Результаты испытания чувствительности и специфичности ПЦР-тест-систем "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis* – 330p/ВКО", "СТ скрин™ ПЦР-тест", "ДиаГен-*Chlamydia*", на образцах, предварительно отобранных с помощью референс тест-системы "Amplicor Chlamydia trachomatis Test"

| Тест-системы | "АмплиСенс™ <i>Chlamydia trachomatis</i> – 330p/ВКО-630", ЦНИИЭ МЗ РФ | "СТ скрин™ ПЦР тест", ООО "Компания Биоком" | "ДиаГен- <i>Chlamydia</i> ", ЗАО "ЛАГИС" |
|---|---|---|--|
| Опытная группа (чувствительность) | | | |
| Положительные образцы от больных урогенитальным хламидиозом | 58/64 (90,6 %) | 57/64 (89,1 %) | 54/64 (84,4 %) |
| Контрольная группа (специфичность) | | | |
| Отрицательные образцы к <i>S.trachomatis</i> от больных с различной инфекционной и соматической патологией нехламидийной этиологии; от здоровых доноров | 115/116 (99,1 %) | 115/116 (99,1 %) | 115/116 (99,1 %) |
| Воспроизводимость | 100,0 % | 90,0 % | 100,0 % |

C. trachomatis в количестве не менее 1×10^3 копий/мл (100 копий в 100 мкл образца для выделения). Таким образом, представленные тест-системы соответствовали требованиям, заложенным в проекте нормативной документации.

Результаты последующих клинических испытаний апробируемых тест-систем представлены в табл. 2. Постановка реакций со всеми тремя испытуемыми тест-системами проходила одновременно в течение ограниченного периода времени.

Так, исследование образцов, позитивных на наличие ДНК *C. trachomatis* в референс-тест-системе в испытуемых тест-системах выявило, что шесть образцов из 64 образцов позитивных в ПЦР ("АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis-330p/630BC*"), семь образцов из 64 ("СТ скрин™ ПЦР-тест"), десять образцов из 64 ("ДиаГен-*Chlamydia*") давали ложноотрицательные результаты. Таким образом, чувствительность "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis-330p/630BC*" по отношению к референс тест-системе составила 90,6 %, "СТ скрин™ ПЦР-тест" – 89,6 %, 64 "ДиаГен-*Chlamydia*" – 84,4 % (табл. 2).

Необходимо отметить, что большинство из ложноотрицательных образцов для "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis-330p/630BC*" (5 из 6); для "СТ скрин™ ПЦР-тест" (4 из 7) и для "ДиаГен-*Chlamydia*" (6 из 10) образцов давали в референс-тест-системе сомнительный (слабоположительный результат). Причем только 4 образца (три из них сомнительные) не выявлялись ни в одной из испытуемых тест-систем. Большинство из сомнительных образцов (4 из 7), давали позитивный результат на ДНК *C. trachomatis* в 1 или 2 из испытуемых тест-систем, совпадая с данными референс препарата.

Исследование 116 образцов, отрицательных на наличие ДНК к *C. trachomatis*, выявило, что каждая из испытуемых тест-систем давала по 1 ложноположительному результату (табл. 2). Таким образом, специфичность каждой из испытуемых тест-систем по отношению к референс-тест-системе составила 99,1 %.

Изучение воспроизводимости показало, что в двух тест-системах все образцы выявлялись в соответствии с их первоначальными характеристиками. Только в тест-системе "СТ скрин™ ПЦР-тест" был выявлен 1 ложноотрицательный результат и 3 ложноположительных. Таким образом, воспроизводимость для "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis-330p/630BC*" и "ДиаГен-*Chlamydia*" составила 100,0 %, а для "СТ скрин™ ПЦР-тест" – 90 %.

По данным литературы, при сравнении коммерческих тест-систем, основанных на иных методах амплификации нуклеиновых кислот, показатели чувствительности и специфичности между ними могут варьировать в зависимости от вида взятого на исследование клинического образца, места забора и т.д. [4-7]

Выявленные нами дискордантные результаты могут быть связаны с различными причинами: в первую очередь – отсутствием отраслевых стандартных образцов (ОСО) для оценки качества тест-систем для ПЦР; отсутствием интерпретации результатов выявления слабоположительных образцов и их связь со временем

инфицирования пациента и индикации остаточной ДНК в клетках эпителия после проведенной этиотропной терапии. Кроме этого следует учитывать, что в ряде случаев из-за низкой концентрации хламидий в месте взятия проб ПЦР-тест-системы неспособны обнаружить возбудителя из-за недостаточной чувствительности тест-систем данного поколения. Так, в наших исследованиях, заявленная чувствительность испытуемых ПЦР-тест-систем составляла $1-5 \times 10^3$ кл/мл, в то время как у референс-тест-системы она составляла 80 кл/мл.

На основании проведенных исследований тест-системы "АмплиСенс™ *Chlamydia trachomatis-330p/630BC*"; "СТ скрин™ ПЦР-тест" и для "ДиаГен-*Chlamydia*" рекомендованы в практику здравоохранения в комплексной диагностике хламидийной инфекции в качестве подтверждающего теста. Все испытуемые тест-системы обладали высокой специфичностью, сходной чувствительностью и более низкой чувствительностью к выявлению слабоположительных образцов по сравнению с референс-тест-системой. Все апробированные тест-системы допущены к выявлению ДНК *C. trachomatis* только в соскобах урогенитального тракта. Для оценки возможности использования данных тест-систем для детекции ДНК *C. trachomatis* в других биологических жидкостях (кровь, моча, слюна, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость и т.д.) необходимы дополнительные исследования. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости создания тест-систем, обладающих большей диагностической эффективностью, более стандартизованных по своим параметрам, автоматизации тестов с целью минимизации ошибок при проведении реакции персоналом, а также возможной инструментальной оценке результатов (переход к гибридной форме регистрации) и их интерпретации.

Список литературы

- Schachter J. /Abstracts of Proceedings of the IVth Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Helsinki, Finland. 20-23 August 2000, pp. 307-310.
- Stary A. /Abstracts of Proceedings of the IVth Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Helsinki, Finland. 20-23 August 2000, pp. 61-64.
- Black C. M. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan 1997, pp. 160-184.
- Bas S., Ninet B. et al. /Abstracts of Proceedings of the 3rd Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Vienna. Austria. 11-14 September 1996; p. 191.
- DeBonville D., Rosenstraus M. et al / Abstracts of Proceedings of the 3rd Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Vienna. Austria. 11-14 September 1996; p. 292.
- Pasternack P., Vuorinen P. et al. /Abstracts of Proceedings of the 3rd Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Vienna. Austria. 11-14 September 1996; p. 285.
- Kuchinka-Koch A., Bilina A. et al /Abstracts of Proceedings of the IVth Meeting of the European Society for Chlamydial Research. Helsinki, Finland. 20-23 August 2000, p. 144.