

Сорока Н.Ф.<sup>1</sup>, Костюк С.А.<sup>2</sup>, Полуян О.С.<sup>2</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ТРИГГЕРНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ЗАБОЛЕВА- НИЯХ СУСТАВОВ

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск;

<sup>2</sup>Белорусская академия последипломного образования, Минск

Молекулярно-биологические технологии, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), в настоящее время получили широкое распространение в клинической лабораторной диагностике для выявления ДНК патогенных микроорганизмов, в том числе и *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). Данный внутриклеточный бактериальный паразит долгое время ассоциировался с патологическим процессом урогенитального тракта, заканчивающимся реактивным артритом (РеА). Позднее выяснилось, что *C. trachomatis* может персистировать непосредственно в суставе [1,2]. Излюбленная локализация возбудителя -- фибробласты синовиальной мембраны с вовлечением в патологический процесс и хрящевой ткани [3]. Инфекция *C. trachomatis* может быть ассоциирована также с ревматоидным артритом (РА), изменяя клиническую картину заболевания [4,5].

**Материалы и методы.** На ПЦР-диагностику инфекций направлялись пациенты с РеА и РА, у которых клинически можно было предполагать наличие инфекционного процесса, в том числе хламидийной инфекции [4]. Исследования проводились у 142 пациентов с РеА и 218 пациентов с клиническим диагнозом «ревматоидный артрит».

Диагноз РеА был достоверным и основывался на критериях, предложенных на IV Международном рабочем совещании по реактивным артритам в Берлине (1999). Длительность суставного синдрома у пациентов с РеА составляла 5 – 6 месяцев.

Пациенты с РА соответствовали диагностическим критериям ACR/EULAR (2010). Возраст пациентов составлял 25–45 лет, средний возраст -

35,1±7,3 года. Все пациенты с РеА и РА лечились в условиях республиканского ревматологического центра (стационарно или амбулаторно).

С целью выявления предполагаемых триггерных факторов у всех пациентов осуществлялся забор биологического материала из урогенитального тракта. У лиц женского пола производился соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала и уретры; у лиц мужского пола осуществлялось взятие сока простаты и/или производился соскоб эпителиальных клеток из уретры. Дополнительно для исследования использовались синовиальная жидкость пораженного сустава и соскоб эпителиальных клеток из ротоглотки. Получение синовиальной жидкости проводилось при пункции коленных суставов.

В виду отсутствия условий для проведения культурального метода исследования в большинстве клиничко-диагностических лабораторий, низкой информативности стандартных микроскопических методов исследования, предпочтение в детекции *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydoghila pneumoniae*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes simplex virus I, II* типов было отдано полимеразной цепной реакции (ПЦР), как высокоинформативному и чувствительному методу.

Для эффективной качественной детекции *C. trachomatis* использовали методику ПЦР с применением праймеров, связывающихся со специфическими зонами гена криптической плазмиды *C. trachomatis* рСНL1 (диагностические наборы «Полимик», НПФ Литех, г.Москва).

Для определения специфического фрагмента *ompA* гена *Chlamydia trachomatis*, кодирующего главный поверхностный протеин *C. trachomatis* (МОМР), методом ПЦР в реальном времени исследования проводились с использованием диагностических наборов «АмплиСенс-FRT *Chlamydia trachomatis*» и с использованием ТаqMan проб и видоспецифических праймеров (НИИ ЭиМ МЗРФ, г.Москва). Определение специфических фрагментов гена *Trichomonas vaginalis* Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFO D) методом ПЦР в реальном времени

проводилось с использованием диагностических наборов «АмплиСенс-FRT *Trichomonas vaginalis*» и TaqMan проб и видоспецифичных праймеров. Для эффективной качественной детекции *Herpes simplex virus I, II* типов использовали методику ПЦР в режиме реального времени с применением диагностических наборов «АмплиСенс-FRT *Herpes simplex virus I, II*» и TaqMan проб и видоспецифичных праймеров. Пробы метились флуорохромом 6-carboxyfluorescein [FAM] на 5' конце и гасителем флуоресценции 6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA] на 3' конце. Пробы были комплиментарны участку амплифицируемой области. Гаситель поглощал испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокировала полимеразу.

Все данные, полученные в ходе исследований, вносились в соответствующую компьютерную базу с последующей статистической обработкой при помощи стандартного статистического пакета программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Для количественных параметров, распределение которых не подчинялось нормальному закону (при использовании критерия Колмогорова-Смирнова), вычислялись медиана  $Me$  и (25/75) процентиля. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест) с целью сравнения величин измерений признака. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** В ходе работы были проведены параллельные исследования различного биологического материала на выявление ДНК *S. trachomatis*. Образцы ДНК, полученные из уrogenитальных соскобов, сока простаты и синовиальной жидкости были использованы для проведения ПЦР-анализа с использованием двух независимо разработанных наборов праймеров для ПЦР.

ДНК *S. trachomatis* была обнаружена в биологических образцах из уrogenитального тракта 73,9% пациентов с **реактивным артритом**. При этом и

78,8% проб синовиальной жидкости пораженного сустава были позитивны в отношении этого возбудителя при проведении ПЦР в режиме реального времени. Одновременно классический ПЦР с электрофоретической схемой детекции позволил выявить ДНК этого возбудителя в 60% образцов сока простаты и соскобах уретры, цервикального канала и в 50% образцов синовиальной жидкости.

Таким образом, процент *S. trachomatis*-положительных биологических проб от пациентов с РеА варьирует в широких пределах в зависимости от вида биологического материала. По нашему мнению, для получения наиболее достоверных результатов по диагностике *S. trachomatis* при РеА целесообразнее использовать синовиальную жидкость пораженного сустава. С другой стороны, если у пациента с реактивным артритом в полости сустава обнаруживается хламидийная инфекция, вправе ли мы считать такой артрит реактивным. Это типичный инфекционный артрит. Хотя общепринятым является положение, что хламидийная инфекция вызывает реактивный артрит. Этот вопрос требует отдельного обсуждения.

Аналитическая чувствительность определения ДНК *S. trachomatis* с использованием диагностических наборов «Полимик» составила не менее 1000 молекул ДНК возбудителя в 5 мкл прошедшей обработку (выделение ДНК) биологической пробе, тогда как данный показатель при проведении исследований методом ПЦР в реальном времени - не менее 50 молекул ДНК возбудителя в 5 мкл прошедшей обработку (выделение ДНК) биологической пробе.

Нами установлено, что в условиях частичного ингибирования и присутствия в инкубационной смеси 50 элементарных телец *S. trachomatis* на образец, селективное ингибирование амплификации основного фрагмента *S. trachomatis* при преимущественной амплификации *S. trachomatis* внутреннего контроля имеет место. С учетом этого исследователям необходимо учитывать, что сигнал положительного внутреннего контроля может вводить в заблуждение в услови-

ях присутствия ингибиторов в образце, и наличия малого количества ДНК *C. trachomatis*.

Проведенные исследования доказывают, что нередко отрицательные результаты ПЦР детекции *C. trachomatis* в синовиальной жидкости являются следствием наличия в биологическом образце малого количества инфекционных элементарных телец (ЭТ), продуцируемых организмом во время персистенции инфекции. Невзирая на необычные молекулярные генетические характеристики, обусловленные персистенцией *C. trachomatis* в синовиальной жидкости, число бактериальных клеток, присутствующих в воспаленных суставах пациентов с РеА может быть крайне мало (до 100 копий ДНК\мл). По данной причине, а также вследствие получения отрицательных результатов при проведении классического ПЦР с электрофоретической схемой детекции, ПЦР в режиме реального времени является наиболее предпочтительными для выявления ДНК *C. trachomatis* в синовиальной жидкости в клинической лабораторной диагностике.

Таким образом, по результатам проведенных ПЦР-исследований у пациентов с РеА было выявлено, что уровень инфицированности пациентов *C. trachomatis* составил 73,9% случаев (рис. 1).

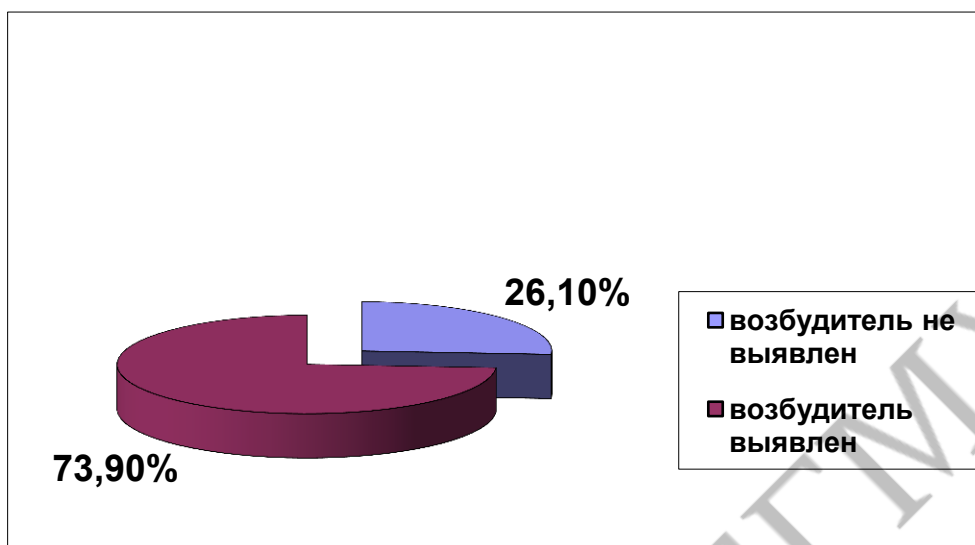


Рисунок 1- Частота выявления возбудителя *C. trachomatis* в группе пациентов (n=142) с реактивным артритом

Однако моно-инфекция хламидийной этиологии детектировалась только в 49,5% случаев (n=52). В 50,5% случаев (n=53) выявлялась микст-инфекция (*C. trachomatis* в ассоциации с *Trichomonas vaginalis* и/или *Herpes simplex virus* I, II типов) (рис.2.).

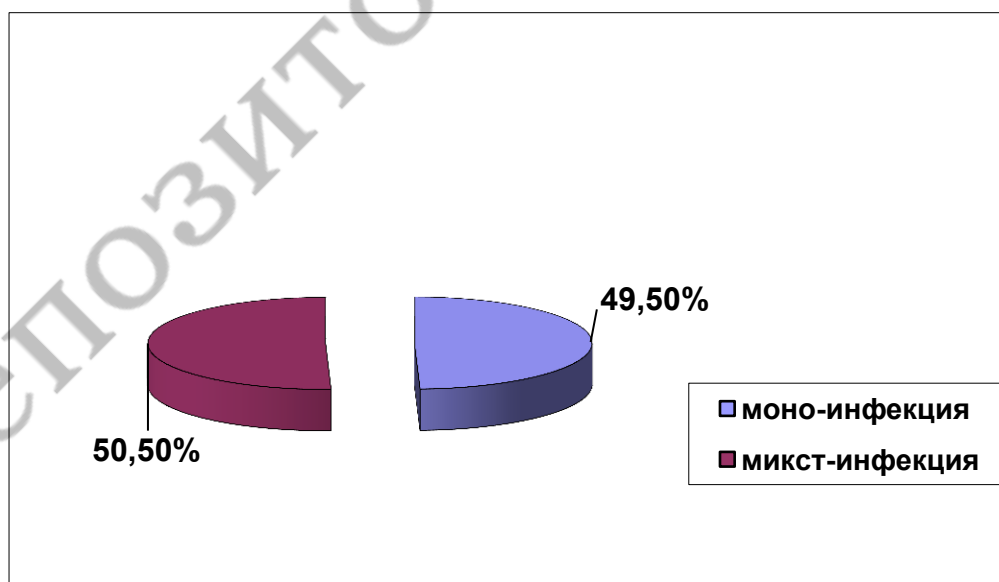


Рисунок 2 - Частота встречаемости возбудителя *C. trachomatis* в виде моно- или микст-инфекции.

При проведении молекулярно-биологических исследований у пациентов с ревматоидным артритом с использованием метода ПЦР в режиме реального времени было установлено, что в соскобах эпителиальных клеток из уrogenитального тракта возбудитель *C. trachomatis* выявлялся в 71,1% (n=155) случаев, *Trichomonas vaginalis* – в 9,17% (n=20) случаев. При этом в соскобах из ротовой полости обследованных пациентов возбудитель *C. trachomatis* выявлялся в 26,61% (n=58) случаев и *Chlamydomphila pneumonia* 11,93% (n=26) случаев. Обращает на себя внимание тот факт, что у всех пациентов, у которых в соскобах из ротовой полости была выявлена ДНК *C. trachomatis*, данный возбудитель обнаруживался также в соскобах из уrogenитального тракта.

В ходе проведенных исследований было показано, что в синовиальной жидкости пораженного сустава возбудитель *C. trachomatis* выявлялся у 41 пациента, а в соскобе из полости ротоглотки – у 32 пациентов. Еще раз напомним, что для ПЦР диагностики отбирались пациенты, которые на этапе отбора имели клинические, лабораторные или рентгенологические признаки хламидийной инфекции [6]. В связи с этим, столь высокий процент ПЦР-положительных результатов не отражает истинное распространение хламидийной инфекции в популяции пациентов с РеА и РА.

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-биологические исследования методом ПЦР в режиме реального времени по определению концентрационных уровней ДНК *C. trachomatis* в различном биологическом материале пациентов с ревматоидным артритом.

Для проведения количественного определения ДНК *C. trachomatis* в исследуемом биологическом материале использовался разработанный калибратор *C. trachomatis*.

В ходе проведения количественных ПЦР-исследований было установлено, что значение Me (25/75 процентиля) концентрации ДНК *C. trachomatis* в соскобах из уrogenитального тракта составляет 57440 (23873/84100) копий/мл, то-

гда как в соскобах из ротовой полости данный показатель составил 1623 (1145/7189) копий/мл соответственно (рис. 3).

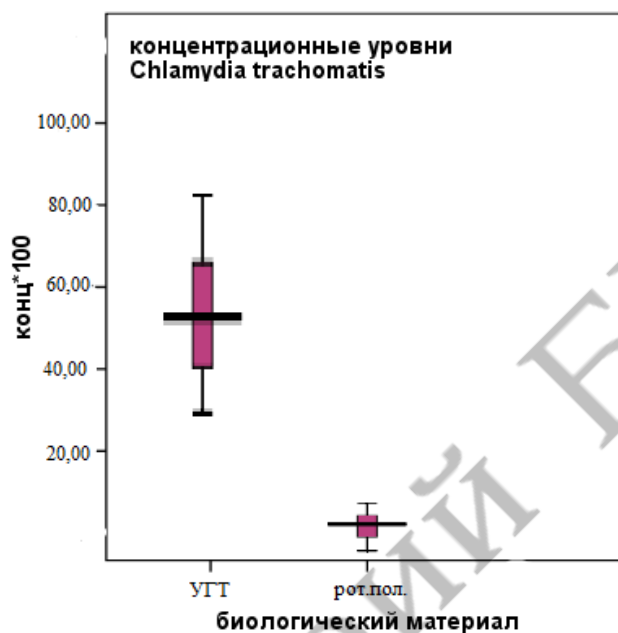


Рисунок 3 - Концентрационные уровни ДНК *C. trachomatis* в соскобах из уrogenитального тракта и ротовой полости пациентов с ревматоидным артритом

Полученные значения критерия Манна-Уитни ( $Z = -6,247$ ,  $p = 0,000$ ) свидетельствуют о статистически достоверно значимой разнице по концентрационным уровням возбудителя в зависимости от вида исследуемого биологического материала

### Заключение

Проведенные исследования демонстрируют высокую степень соответствия полученных результатов по выявлению возбудителя *Chlamydia trachomatis* в месте первичной локализации патогена – уrogenитальном тракте, и других биологических жидкостях, в частности в полости ротоглотки и синовиальной жидкости пораженного сустава (61,5% и 78,8% соответственно). ПЦР диагностика инфекций в режиме реального времени имеет преимущества перед



классическим методом ПЦР с электрофоретической схемой детекции. ПЦР в режиме реального времени имеет более высокую чувствительность и является наиболее предпочтительным методом для выявления ДНК *C. trachomatis* в синовиальной жидкости.

В половине случаев у пациентов с реактивным и ревматоидным артритом хламидийная инфекция присутствует в виде микст-инфекции (*C. trachomatis* в ассоциации с *Trichomonas vaginalis* и/или *Herpes simplex virus I, II* типов). В последние месяцы мы нередко выявляем присутствие в суставе и парвовируса В19.

Несомненно, требуются дальнейшие исследования по выяснению роли инфекционных агентов в возникновении, развитии и течении воспалительных заболеваний суставов. Необходима разработка современных методов лечения хронических триггерных инфекций, влияющих на эффективность проводимой патогенетической терапии основного заболевания. Методы детекции инфекционных агентов в настоящее время разработаны и внедрены в медицинскую науку и практику.

## Литература

- 1.Талако Т.М., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н., Сорока Н.Ф. Особенности изолятов *Chlamydia trachomatis*, выделенных из синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом // I Евразийский конгресс ревматологов. Тезисы конгресса. – Алматы, Республика Казахстан, 2012:98.
- 2.Сорока Н.Ф., Костюк С.А. Реактивные артриты вчера и сегодня. Научно-практическая ревматология 2014;52(прилож 1):118.
- 3.Костюк С.А., Полуян О.С., Асташонок А.Н., Полещук Н.Н., Рубаник Л.В., Сорока Н.Ф. Молекулярно-биологические и ультраструктурные характеристики возбудителя *Chlamydia trachomatis*, выделенного из клеточных элементов и суставной жидкости пациентов с реактивным артритом. Молекулярная диагностика 2018. Сборник трудов Международной научно-практической конференции. Минск, 2018:544-545.
- 4.Сорока Н.Ф. Ревматоидный артрит, ассоциированный с хламидийной инфекцией. Здоровоохранение 2009;1:4-9.
- 5.Soroka N.F. Rheumatoid arthritis associated with Chlamydia infection. Ann. Rheum. Dis.2009;68 (Suppl.3):736.].
- 6.Сорока Н.Ф. Ревматоидный артрит и *Chlamydia trachomatis*. Клиницист 2010;1:74-80.