

ПУЛИРОВАНИЕ СОСКОБОВ ЭПИТЕЛИЯ ЦЕРВИКАЛЬНОГО КАНАЛА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* МЕТОДОМ ПЦР: ЭФФЕКТИВНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К РЕАЛИЗАЦИИ СКРИНИНГОВЫХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОГРАММ

Разработана методика пулирования соскобов эпителия цервикального канала для выявления *C. trachomatis* методом ПЦР. Эффективность пулирования проб по 5 и 10 проанализировали с точки зрения диагностической точности и экономии средств. Оценили возможность применения техники пулирования для определения распространенности хламидий в данной популяции. Было проанализировано 1500 цервикальных проб индивидуально и в пулах по 5 (300 пулов) и 10 (150 пулов). При сравнении результатов пулирования с результатами индивидуального тестирования показано, что пулирование не повлияло на чувствительность и специфичность анализа. Показатель распространенности хламидийной инфекции 6,6%, определенный индивидуальным тестированием, оказался в пределах 95% доверительных интервалов (95%CI), рассчитанных с использованием данных пулирования по 5 проб (95%CI:4,5%-7,7%) и по 10 (95%CI:4,3%-7,7%). Было показано, что при пулировании проб по 5 расход средств сокращается на 53,3%, по 10 – на 44%. Таким образом, пулирование цервикальных проб представляется надежным и экономичным диагностическим подходом к реализации скрининговых и эпидемиологических программ.

Генитальные инфекции, вызываемые *Chlamydia trachomatis*, относятся к числу самых распространенных инфекций, передающихся половым путем (ИППП). Отличительной особенностью хламидийной инфекции является то, что у 50–70% женщин и 30–50% мужчин заболевание протекает бессимптомно. Наиболее тяжелые последствия хламидийной инфекции – воспалительные заболевания органов малого таза, внематочная беременность и трубное бесплодие – связывают именно с этой ее характерной особенностью, так как вовремя не установленная, и поэтому не пролеченная инфекция может вызвать поражения органов малого таза. Кроме того, инфицированные *Chlamydia trachomatis* мужчины и женщины служат своего рода резервуаром хламидийной инфекции, обеспечивающим ее распространение в популяции. Проведение скрининга в пределах определенной популяции с целью выявления хламидийной инфекции представляется эффективным средством контроля над этим заболеванием и предотвращения его тяжелых последствий [15, 16]. Так, реализуемые в последние годы в США и некоторых странах Европы государственные скрининговые программы приводят к снижению распространенности хламидийной инфекции [1, 2, 5, 7, 18]. Методы, используемые в таких программах, должны быть как чувствительными, так и недорогими. Требованиям чувствительности в полной мере отвечают методы, основанные на

амплификации нуклеиновых кислот – полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция (ЛЦР) и другие. Однако высокая стоимость амплификационных методов делает весьма проблематичным использование их в эпидемиологических и скрининговых исследованиях.

Недавно был предложен новый подход к проведению таких исследований, способный решить проблему их высокой стоимости – пулирование. Пулирование представляет собой объединение проб от нескольких пациентов и выявление инфекционного агента в объединенной пробе (пуле) с последующим анализом каждой пробы в пуле, если он окажется положительным. Экономическая эффективность пулирования зависит от распространенности хламидий в исследуемой популяции и от размера пула. Так, в работе R. Peeling et al (1998) [14] показано, что пулирование не эффективно, когда распространенность инфекции составляет 20% и выше; напротив, экономия средств становится существенной при снижении распространенности инфекции и достигает 50% при 5%-м показателе распространенности.

Планируя данную работу, мы ставили перед собой следующие задачи:

- 1) определить оптимальный размер пула и методику пулирования для выявления *C. trachomatis* методом ПЦР, которые обеспечили бы максимальную экономию средств при минимальной, по сравнению с индивидуальным

тестированием, потере чувствительности;

2) проанализировать возможность использования пулирования для определения распространенности *S.trachomatis* в данной популяции;

3) с учетом полученных показателей оценить целесообразность использования пулирования для скрининга данной популяции.

Материалы и методы

Клинические пробы: сбор, транспортировка и хранение. Соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала были получены от пациенток женских консультаций ($n=1500$), расположенных в 16 районах Ленинградской области, в возрасте от 15 до 36 лет. Пробы собирали с помощью дакронных тампонов [6], помещали в сухие пластиковые пробирки объемом 5 мл, плотно закрывали и отправляли в лабораторию микробиологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН. В лаборатории пробы регистрировали и тестировали индивидуально и в пулах по 5 и 10 проб. До анализа пробы хранили при 4°C до 3–7 дней.

Индивидуальное тестирование. Подготовку проб для амплификации проводили с использованием реагентов ДНК-ЭКСПРЕСС (Литех, Москва). К пробе добавляли 1 мл физиологического раствора и, после встряхивания пробы на вортексе в течение 15 с, 100 мкл переносили в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл. Затем пробу центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин, супернатант отбрасывали и добавляли к осадку 200 мкл лизирующего буфера; после встряхивания осадка на вортексе пробу инкубировали при 95°C в течение 10 мин и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 с. 5 мкл обработанной пробы использовали в реакции амплификации с использованием тест-систем ПОЛИМИК *S.trachomatis* (Литех, Москва). Амплификацию проводили в следующем температурном ре-

жиме: $93^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$; $93^{\circ}\text{C} - 10\text{ с}$, $60^{\circ}\text{C} - 10\text{ с}$, $72^{\circ}\text{C} - 10\text{ с}$ (35 циклов); $72^{\circ}\text{C} - 1\text{ мин}$. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Индикатором ингибирования реакции служило отсутствие внутреннего контроля, включенного производителем тест-систем в реакционную смесь. В случае ингибирования амплификации пробу разводили в соответствии с инструкцией производителя: 100 мкл обработанной пробы переносили в пробирку, содержащую 200 мкл лизирующего буфера, пробу встряхивали на вортексе, инкубировали 10 мин при 95°C и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 с.

Пулирование. Пулы формировали в порядке поступления проб, объединяя аликвоты по 100 мкл от 5 и 10 проб и получая, таким образом, пулы объемом 500 мкл и 1 мл, соответственно. Пулы центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин, супернатант отбрасывали, к осадку добавляли 200 мкл лизирующего буфера (ДНК-ЭКСПРЕСС, Литех, Москва). Следующие этапы выделения ДНК, амплификацию и электрофорез проводили в соответствии с процедурой, описанной выше (см. Индивидуальное тестирование).

Определение распространенности *S.trachomatis* с использованием методики пулирования. Для определения распространенности хламидий в исследуемой популяции, основываясь на данных пулирования, использовали следующие формулы [10]:

$$(1) p = \{1 - [1 - (s/n)]^{1/c}\} \times 100\%$$

$$(2) SD = \{[s/n \{1 - (s/n)\}^{(2/c) - 1}] / c^2 n\}^{0.5} \times 100\%$$

$$(3) 95\% CI = p \pm (2\sqrt{SD}),$$

где p — распространенность хламидий, SD — стандартное отклонение, 95% CI — 95% доверительный интервал, s — количество положительных пулов, n — общее количество пулов, c — количество проб в пуле.

Анализ экономии средств.

Процент экономии средств, связанной с уменьшением количества тестов при пулировании по сравнению с индивидуальным тестированием, рассчитывали с применением следующей формулы [11]:

$$CS = n - (P + pr) / n \times 100\%,$$

где P — общее количество пулов, pr — количество тестов, необходимых для идентификации положительных проб во всех положительных пулах, n — общее количество тестов. Стоимость расходных материалов и оплаты труда лабораторных работников в расчет не принимались.

Результаты и обсуждение

При индивидуальном анализе 1500 цервикальных проб методом ПЦР установлена частота встречаемости *Chlamydia trachomatis*, равная 6,6%. Результаты исследования, приведенные в таблице, показали, что пулирование не повлияло на чувствительность и специфичность анализа цервикальных проб методом ПЦР. Так, сопоставляя результаты индивидуального тестирования и тестирования пулированных проб, мы не выявили ни одного как ложноположительного, так и ложноотрицательного пула. Было зарегистрировано только 2 случая ингибирования амплификации при индивидуальном тестировании. Интересно отметить, что при анализе пулов, в том числе тех, которые содержали пробы, ингибирующие ПЦР при индивидуальном тестировании, не было зарегистрировано ни одного случая ингибирования; объяснить этот факт можно разбавлением ингибиторов при пулировании. В целом, такой низкий показатель ингибирования, по нашему мнению, является результатом выбранных нами условий проведения исследования, а именно, процедуры сбора, хранения и подготовки проб к амплификации. С одной стороны, такие условия, как хранение тампонов с цервикальными соскобами в сухих пробирках при 4°C до 7 дней, ресуспендирование

Результаты пулирования цервикальных соскобов для выявления *S. trachomatis* методом ПЦР

	Пулирование проб		Индивидуальное определение <i>S. trachomatis</i>
	по 5	по 10	
Количество проб	1500	1500	1500
Количество пулов	300	150	—
Количество положительных пулов	80	69	—
Чувствительность	100%	100%	—
Специфичность	100%	100%	—
Распространенность хламидийной инфекции (95% CI)	6,1 (4,5-7,7)	6,0 (4,3-7,7)	6,6%
Экономия средств для выявления индивидуальных случаев хламидийной инфекции	53,3%	44,0%	—
Экономия средств для оценки распространенности хламидий	80%	90%	—

в физиологическом растворе непосредственно перед анализом и центрифугирование суспензий, были выбраны нами для того, чтобы сделать работу по транспортировке и хранению проб менее громоздкой, а аликвоты, отобранные для индивидуального тестирования и пулирования, равноценными. С другой стороны, некоторые процедуры обработки проб, такие как длительное хранение (до 3–7 дней) при 4 °С перед амплификацией и ресуспендирование соскобов клеток в физиологическом растворе с последующим центрифугированием клеточных суспензий, уменьшают количество случаев ингибирования и, таким образом, повышают чувствительность ПЦР, как показано в некоторых работах [3, 4, 9, 12, 13, 17]. Авторы приведенных здесь исследований объясняют это тем, что, во-первых, использование только осадка клеток после центрифугирования клеточной суспензии уменьшает влияние на реакцию растворимых ингибиторов. Во-вторых, ингибирующая активность некоторых нестабильных соединений, таких как гормоны и ферменты, может со временем снижаться.

Распространенность хламидийной инфекции в определенной популяции является предпосылкой для анализа целесообразности использования пулирования в скрининге данной популяции. Пулирование может служить экономичным средством точной и быстрой оценки распространенности хламидий [8]. В исследуемой нами популяции показатель распространенности хламидий, определенный индивидуальным тестированием, составил 6,6%, что находится в пределах 95% доверительных интервалов (95% CI), определенных пулированием по 5 проб – 6,1% (95% CI: 4,4-7,7) и по 10 – 6% (95% CI: 4,3-7,7). Кроме того, в результате использования пулирования в качестве методики определения распространенности хламидий количество тестов, и, следовательно, расход средств, уменьшилось на

80% (300 вместо 1500), когда пробы пулировали по 5, и на 90% (150 вместо 1500), когда пробы пулировали по 10.

Наше исследование показало, что пулирование цервикальных проб по 5 и 10 не повлияло существенно образом ни на качество диагностики хламидий, ни на точность оценки распространенности хламидий в исследуемой популяции. Пулирование по 5 и 10 проб снизило расход средств для выявления *Chlamydia trachomatis* методом ПЦР с целью диагностики на 53,3% и 44%, с целью оценки распространенности хламидий – на 80% и 90%, соответственно. Учитывая приведенные выше показатели, можно заключить, что оптимальный размер пула для использования пулирования с целью диагностики хламидий – 5 проб, для оценки распространенности хламидий – 10 проб.

Таким образом, принимая во внимание ограниченность бюджетного финансирования медицинских учреждений, в обязанности которых входит контроль

над ИППП, можно утверждать, что пулирование проб представляет собой эффективный диагностический подход к осуществлению контроля над некоторыми ИППП, в частности, над хламидийной инфекцией и может быть рекомендовано для проведения как обширных эпидемиологических исследований, так и скрининговых программ.

Литература

1. Aavitsland P. Use of laboratory testing for genital chlamydial infection in Norway//Quality health care – 1993. – Vol. 2. – P. 91–95.
2. Addis DG, Vaughan ML, Ludka D, Pfister J, Davis JP. Decreased prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection associated with a selective screening program in family planning clinics in Wisconsin//Sex. Transm. Dis. – 1993. – Vol. 20. – P. 28–35.
3. Bass CA, Jungkind DL, Silverman NS, Bondi JM. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 2648–2653.

4. Bawens JE, Clark AM, Stamm WE. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* endocervical infection by a commercial polymerase chain reaction assay // *J. Clin. Microbiol.*— 1993.— Vol. 31.— P. 3023–3027.
5. Crowley T, Horner PJ, Nelki J, Caul FO. Screening associated with reduced infection rates // *BMJ* — 1994.— Vol. 308.— P. 716–717.
6. Domeika M, Bassiri M, Butrimiene I, Venalis A, Ranceva J, Vasjanova V. Evaluation of vaginal introital sampling as an alternative approach for the detection of genital *C. trachomatis* infection in women // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 1999.— Vol. 78.— P. 131–136.
7. Herrmann B, Egger M. Genital chlamydial infection in Uppsala County, Sweden, 1985–1993: declining rates for How Much Longer // *Sex. Transm. Dis.* — 1995.— Vol. 22.— P. 253–260.
8. Kacena KA, Quinn SB, Howell MR, Madico GE, Quinn TC, Gaydos CA. Pooling urine samples for ligase chain reaction screening for genital *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic women // *J. Clin. Microbiol.*— 1998.— Vol. 36.— P. 481–485.
9. Kellogg JA, Seiple JW, Keinedinst JL, Stroll ES, Cavanaugh SH. Improved PCR detection of *Chlamydia trachomatis* by using an altered method of specimen transport and high-quality endocervical specimens // *J. Clin. Microbiol.*— 1995.— Vol. 33.— P. 2765–2767.
10. Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence surveys using pooled sera // *J. Clin. Microbiol.*— 1989.— Vol. 27.— P. 1449–1452.
11. Krepel J, Patel J, Sproston A, Hopkins F, Jang D, Mahony J, et al. The impact on accuracy and cost of ligase chain reaction testing by pooling urine specimens for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections // *Sex. Transm. Dis.* — 1999.— Vol. 26.— P. 504–507.
12. Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA, Buonagurio DA, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction // *J. Clin. Microbiol.*— 1992.— Vol. 30.— P. 2847–2851.
13. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Pickard L, Chong S, Jang D, et al. Role of confirmatory PCRs in determining performance of *Chlamydia* AmpliCor PCR with endocervical specimens from women with a low prevalence of infection // *J. Clin. Microbiol.*— 1994.— Vol. 32.— P. 2490–2493.
14. Peeling R, Toye B, Jessamine P, Gemmill I. Pooling of urine specimens for PCR testing: a cost saving strategy for *Chlamydia trachomatis* control programmes // *Sex. Transm. Inf.*— 1998.— Vol. 74.— P. 66–70.
15. Scholes D, Stergachis A, Heidrich FE, Andrilla H, Holmes KK, Stamm WE. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydial infection // *New England J. Med.*— 1996.— Vol. 334.— P. 1362–1366.
16. Stamm WE. Expanding efforts to prevent chlamydial infection // *New England J. Med.*— 1998.— Vol. 339.— P. 768–769.
17. Verkooyen RP, Luijendijk A, Huisman WM, et al. e. Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the AmpliCor *Chlamydia trachomatis* assay // *J. Clin. Microbiol.*— 1996.— Vol. 34.— P. 3072–3074.
18. Walckiers D, Piot P, Stroobant A, van der Veken J, Declercq E. Declining trends in some sexually transmitted diseases in Belgium between 1983–1989 // *Genitourin. Med.*— 1991.— Vol. 67.— P. 374–377.