

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.61: 616-022.7
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-4-315-324>

Поступила в редакцию 29.12.2022
Received 29.12.2022

Ю. М. Капустина, Л. В. Рубаник, Н. П. Шмелева, Н. В. Сивец, Е. Е. Григорьева

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА CHLAMYDIALES: НЕОБХОДИМОСТЬ РАЗРАБОТКИ И ОСНОВНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Аннотация. Заболевания органов дыхания занимают доминирующее положение в структуре болезней, этиология которых зачастую остается невыясненной. Во многом это обусловлено недостаточной изученностью всего спектра патогенов, вызывающих респираторные заболевания, а также отсутствием подходов к их индикации и идентификации. Благодаря постоянному прогрессу молекулярной биологии идентифицирован ряд родственных хламидиям бактерий, включая хламидияподобные микроорганизмы, часть из которых связана с респираторными заболеваниями человека. Роль атипичных возбудителей, таких как хламидияподобные микроорганизмы *Parachlamydia acanthamoebae* и *Simkania negevensis*, в патологии респираторного тракта человека активно изучается.

Разработан и оптимизирован метод на основе ПЦР в режиме реального времени, который способен выявлять ДНК как хламидий, так и хламидияподобных микроорганизмов (*Parachlamydia acanthamoebae* и *Simkania negevensis*). Метод характеризуется высокой специфичностью и воспроизводимостью, а также аналитической чувствительностью на уровне $8,7 \cdot 10^3$ ГЭ/мл. Его применение даст возможность оценить вклад данных атипичных возбудителей в этиологическую структуру инфекционных заболеваний респираторного тракта.

Ключевые слова: хламидии, хламидияподобные микроорганизмы, полимеразная цепная реакция, бронхит, пневмония

Для цитирования: ПЦР в режиме реального времени для индикации представителей порядка Chlamydiales: необходимость разработки и основные аналитические характеристики метода / Ю. М. Капустина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 4. – С. 315–324. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-4-315-324>

Yulia M. Kapustina, Lyudmila V. Rubanik, Natalia P. Shmeleva, Natalia V. Sivets, Elena E. Grigorieva

Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

REAL-TIME PCR FOR INDICATION OF REPRESENTATIVES OF CHLAMYDIALES ORDER: NEEDS FOR DEVELOPMENT AND MAIN ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE METHOD

Abstract. Respiratory diseases occupy a dominant position in the structure of morbidity, often the etiology of which remains unclear. This situation is largely due to the lack of knowledge of the entire spectrum of pathogens that cause respiratory diseases, as well as the lack of approaches to their indication and identification. Thanks to constant progress of molecular biology, a number of bacteria related to chlamydia have been identified, some of which are associated with human respiratory diseases, including chlamydia-like microorganisms. The role of atypical pathogens such as chlamydia-like microorganisms *Parachlamydia acanthamoebae*, and *Simkania negevensis* in the pathology of the human respiratory tract is still not fully understood.

A real-time PCR-based method has been developed and optimized. It is capable of detecting the DNA of both chlamydia and chlamydia-like microorganisms (*Parachlamydia acanthamoebae* and *Simkania negevensis*). The method is characterized by high specificity and reproducibility, as well as by analytical sensitivity at a level of $8.7 \cdot 10^3$ GE/ml. Its use will make it possible to assess the contribution of these atypical pathogens to the etiological structure of infectious diseases of the respiratory tract.

Keywords: chlamydia, chlamydia-like organisms, polymerase chain reaction, bronchitis, pneumonia

For citation: Kapustina Yu. M., Rubanik L. V., Shmeleva N. P., Sivets N. V., Grigorieva E. E. Real-time PCR for indication of representatives of Chlamydiales order: needs for development and main analytical characteristics of the method. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 4, pp. 315–324 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-4-315-324>

Введение. Заболевания органов дыхания как бактериальной (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* и др.), так и вирусной (грипп, парагрипп, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус, коронавирус, риновирус и др.) природы привлекают все большее внимание ученых и врачей разного профиля в связи с их широкой распространенностью, высокой частотой рецидивирования и перехода в хроническую форму [1]. Лабораторная диагностика этих респираторных патогенов достаточно хорошо налажена. Однако, несмотря на это, в 20–30 % случаев, а по мнению ряда авторов, в 50 % случаев заболеваний верхних и нижних дыхательных путей человека этиологическая причина остается неустановленной [2–4]. Это обусловлено, с одной стороны, недостаточной изученностью всего спектра патогенов, вызывающих респираторные заболевания, с другой стороны – отсутствием подходов к их индикации и идентификации. В последние годы рядом исследователей установлен вклад атипичных возбудителей, таких как хламидияподобные микроорганизмы *Parachlamydia acanthamoebae* и *Simkania negevensis*, в респираторную патологию человека [5–7].

Хламидияподобные микроорганизмы (Chlamydia Like Organisms – CLO) получили свое название ввиду сходного двухэтапного цикла развития, включающего внеклеточное инфекционное элементарное тельце и внутриклеточное вегетативное ретикулярное тельце, и идентичности последовательности 16S рРНК не менее чем на 92,5 % и 23S рРНК не менее чем на 91,0 % с семейством Chlamydiaceae [8]. Семейство Chlamydiaceae входит в порядок Chlamydiales и широко известно ввиду того, что включает в себя патогенные для человека микроорганизмы – *S. pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum* и др. Однако благодаря многолетним медико-биологическим исследованиям были получены сведения и о других представителях этого порядка и кроме семейства Chlamydiaceae было описано еще 8 новых семейств, куда вошли облигатные внутриклеточные бактерии (*Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, *Clavichlamydiaceae*, *Parilichlamydiaceae*) [6]. Некоторые из представителей хламидияподобных микроорганизмов в настоящее время относятся к малоизученным, но имеющим медицинскую значимость микроорганизмам. *P. acanthamoebae* и *S. negevensis* рассматриваются как эмерджентные патогены респираторного тракта человека.

Так, в Иордании при тестировании назофарингеальных мазков от взрослых с внебольничной пневмонией и бронхитом в 57,1 % случаев обнаружена ДНК *S. negevensis* [9]. Только 1 % составила выявляемость ДНК *P. acanthamoebae* у взрослых с респираторными патологиями [10, 11]. Многочисленные исследования показывают, что *P. acanthamoebae* может выживать и размножаться в макрофагах человека, фибробластах легких и пневмоцитах и вызывать тяжелую пневмонию после интраназального заражения мышей в экспериментах *in vivo* [10, 12, 13]. Кроме того, эти облигатные внутриклеточные бактерии могут присутствовать как в каротидных, так и в аортальных атеросклеротических поражениях у пожилых пациентов. Это подтверждается исследованием, в котором в 11,1 % образцов аорты и сонных артерий, полученных от пациентов, перенесших операцию на аорте в связи с атеросклерозом, был выявлен генетический материал *P. acanthamoebae* [14].

Большое количество исследований свидетельствуют о важном значении хламидияподобных микроорганизмов в этиологии заболеваний респираторного тракта у детей. Анализ образцов из носоглотки детей с бронхитами в Израиле показал, что *S. negevensis* явилась причиной заболевания в 25 % случаев [15]. Более поздние исследования того же автора показывают высокую частоту инфицирования *S. negevensis* как у детей с пневмонией (91 %), так и у детей из контрольной группы (97 %) [16]. Также высокий процент детекции данного хламидияподобного патогена отмечен в Канаде – у 63 % детей с бронхитом выявлялась ДНК *S. negevensis* [17]. В США и Великобритании распространенность отмечена на уровне от 16 до 45 % [18, 19]. У 31–33 % детей с респираторно-синцитиальным вирус-негативным бронхитом и респираторным дистресс-синдромом в аспиратах из носоглотки и респираторных секретах обнаруживалась ДНК *P. acanthamoebae* [20, 21].

В то же время встречаются исследования, в которых показано отсутствие ДНК хламидияподобных микроорганизмов при различных патологиях респираторного тракта [7, 22, 23]. Таким образом, можно отметить, что доступные литературные данные отображают широкий

диапазон выявляемости атипичных хламидияподобных микроорганизмов. Вероятно, что такое расхождение результатов может быть связано либо с различиями в подходах к диагностике, либо с географическими вариациями распространенности инфекции.

Учитывая облигатный внутриклеточный цикл репродукции, классические микробиологические методы не способны обнаружить *P. acanthamoebae* и *S. negevensis*. Серологические методы, позволяющие исследовать сыворотку крови на наличие видоспецифических антител, можно применять только при наличии в лаборатории штаммов данных возбудителей и специально приготовленного антигена, так как стандартные диагностические тест-системы не разработаны. Культуральный метод требует специальных клеточных линий или систем и занимает длительное время (7–10 дней). Молекулярно-биологический метод детекции является методом выбора, однако он не апробирован, не стандартизирован и не применяется в нашей стране. Коммерческие ПЦР-тесты используются только для обнаружения *C. pneumoniae* и *C. trachomatis*. Наборы для молекулярно-биологической индикации других представителей порядка Chlamydiales и идентификации *P. acanthamoebae* и *S. negevensis* не доступны. Соответственно, исследования, направленные на обнаружение не только хламидий, но и хламидияподобных микроорганизмов, не проводятся, данные о распространенности новых атипичных возбудителей при респираторной патологии отсутствуют.

Цель работы – разработать и оптимизировать условия проведения ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ДНК представителей порядка Chlamydiales в клиническом материале.

Материалы и методы исследования. В качестве мишени для детекции ДНК представителей порядка Chlamydiales выбран специфичный для всех представителей участок гена, кодирующего *I6S* рРНК. Для амплификации целевого фрагмента использовали праймеры, описанные J. Lienard с соавт. [5]. Вариация размера ампликона зависит от вида и составляет от 207 до 215 п. н.

В качестве контрольных образцов при обработке ПЦР использовались депонированные в Республиканскую коллекцию патогенных биологических агентов штаммы – *C. trachomatis* СТ-3271/Гродно/2015 и СТ-1391/Минск/2014 (№ СКВБ 528 и 530 от 09.11.2018), а также изоляты генотипов E, F, D, G, ДНК выделенного в лаборатории изолята *Waddlia chondrophila* 5320/Беларусь/Минск/2021, пробы ДНК *C. Pneumoniae*, изолят 3398/20 (предоставлены группой ПЦР-диагностики БелМАПО, возглавляемой д-ром мед. наук, профессором С. А. Костюк), и ДНК *C. psittaci*, изолят НЖ (предоставлен заведующим кафедрой эпизоотологии и инфекционных болезней П. А. Красочко УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»). Кроме того, получен контрольный образец на основе рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей фрагмент гена *I6S* рРНК *C. trachomatis*, полученный по методике, описанной ранее [24].

Проведение всех экспериментов осуществляли на амплификаторе планшетного типа QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США). При проведении ПЦР в зависимости от цели опыта использовались различные составы реакционной смеси: 2,5 мкл 10× буфер, 1U SmArt ДНК-полимеразы (ООО «АртБиоТех»), 0,5 мкл смеси dNTP 10 ммоль, праймеры (10–15 пмоль прямого (panChl6F2 5'-CCGCCAACACTGGGACT-3') и 10–15 пмоль обратного праймера (panChl6R2 5'-GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTAC-3')), 10–15 пмоль зонда (panChl6S 5'-FAM [6-carboxyfluorescein]-CTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATC-BHQ1[BlackHole Quencher 1]-3'), от 1,5 до 4 ммоль MgCl₂, бидистиллированная вода до объема 20 мкл, 1–15 нг ДНК-матрицы.

Оптимизация ПЦР проводилась с использованием реагентов отечественного производства (ООО «АртБиоТех», ОДО «Праймтех»). С целью наиболее эффективной наработки целевого фрагмента опытным путем осуществляли подбор необходимой концентрации ионов магния, соотношения количества праймеров и гибридизационных зондов, а также количества матрицы. Температурный оптимум отжига праймеров определяли с использованием градиента температур в диапазоне от 62 до 67 °С.

Для оценки аналитической чувствительности готовили последовательные 10-кратные разведения положительного контрольного образца (концентрация плазмиды, содержащей участок гена *I6S* рРНК – 30 нг/мкл). Титрование продолжали до получения разведения 10⁻¹⁰ степени, что соответствует 8,8 копиям/мл плазмиды, содержащей фрагмент гена *I6S* рРНК. Далее проводили амплификацию с оптимизированным составом реакционной среды и условиями ПЦР.

Вычисляли количество копий ДНК в каждом титре образца (от 10^{-1} до 10^{-10}) по формуле [25]:

$$\text{Количество копий ДНК} = \frac{\text{Количество ДНК, нг} \cdot 6,022 \cdot 10^{23}}{\text{Длина ДНК} \cdot 1 \cdot 10^9 \text{ нг/мл} \cdot 650 \text{ Да}},$$

где количество ДНК = 1 нг, $6,022 \cdot 10^{23}$ – число Авогадро, длина ДНК – плазмидная ДНК с клонированной мишенью фрагмента гена *I6S* рРНК (3182 п. н., из них 208 п. н. фрагмента гена *I6S* рРНК, а 2974 – вектор pJet), $1 \cdot 10^9$ – коэффициент пересчета, 650 Да – молекулярная масса одной нуклеотидной пары.

При оценке аналитической специфичности в качестве ДНК матрицы использовали образцы, содержащие ДНК патогенов человека стандартной панели нуклеиновых кислот негриппозных респираторных возбудителей FR-674 (Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Атланта, Джорджия, США): *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Herpes simplex virus-1*, *Herpes simplex virus-5*. Данное исследование проводилось на базе лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (зав. лабораторией канд. мед. наук Н. П. Шмелева). Параллельно с этим изучали способность реакции обнаруживать ДНК как хламидий (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*, разных генотипов *C. trachomatis* (E, F, D, G)), так и хламидияподобного микроорганизма (*W. chondrophila*). Результат считался отрицательным, если не наблюдалось накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM и пересечения экспоненциальной кривой пороговой линии, соответствующей анализируемому образцу. При этом регистрировалось присутствие флуоресцентного сигнала для образца, содержащего ДНК *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* и *W. chondrophila*.

Воспроизводимость результатов ПЦР оценивали на клинических образцах – 10 содержащих и 10 не содержащих ДНК представителей порядка Chlamydiales. Исследования проводили путем трехкратного тестирования всех образцов. Полученные результаты сравнивали для каждого образца и делали вывод о высокой, средней или низкой воспроизводимости оптимизированной ПЦР.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности, затем вычисляли средние значения и стандартное отклонение. Для обработки данных применяли методы анализа результатов и описательной статистики с использованием встроенных графических модулей программы Excel (Microsoft Corporation, США).

Результаты и их обсуждение. Апробирована ПЦР с праймерами к *I6S* рРНК для одновременной детекции как хламидий, так и хламидияподобных микроорганизмов. В качестве положительных контролей протекания реакции использованы образцы ДНК хламидий *C. trachomatis* СТ-3271/Гродно/2015 и СТ-1391/Минск/2014, *C. pneumoniae* (изолят 3398/20) и *C. psittaci* (изолят НЖ); ДНК хламидияподобного микроорганизма *W. chondrophila* 5320/Беларусь/Минск/2021. В результате показана способность праймеров и гибридационных зондов амплифицировать фрагмент гена *I6S* рРНК с заведомо положительными образцами.

С целью оптимизации и повышения эффективности ПЦР исследовали влияние концентрации ионов магния, разного количества праймеров, зондов и ДНК, а также температурного режима отжига праймеров на амплификацию искомого участка.

Одним из важных компонентов буферной смеси является хлорид магния. Концентрация MgCl_2 влияет на отжиг праймеров и денатурацию ДНК. Повышение концентрации реагента увеличивает выход продукта, но более высокими темпами понижает специфичность. Кроме того, повышение концентрации Mg^{2+} увеличивает температуру плавления ДНК, а при значительном избытке ионов магния (до 10 мМ) на 40–50 % ингибируется Taq-полимераза. Понижение концентрации реагента вызывает низкий выход ПЦР-продукта.

Оптимальная молярность подбиралась эмпирическим путем в процессе оптимизации условий реакции. При сопоставлении полученной информации для каждого образца было отмечено, что изменение концентрации соли в пределах 1,5–4,00 ммоль влияет на процесс амплификации.

Выход специфического ПЦР-продукта был обнаружен при концентрации $MgCl_2$ начиная с 2 и до 4,0 ммоль. На основании полученных опытных данных в дальнейших экспериментах при проведении ПЦР для приготовления реакционных смесей использовали концентрацию соли 2,5 ммоль.

В результате экспериментов по оценке влияния количества в реакционной смеси праймеров и гибридизационных зондов установлено их оптимальное соотношение (рис. 1).

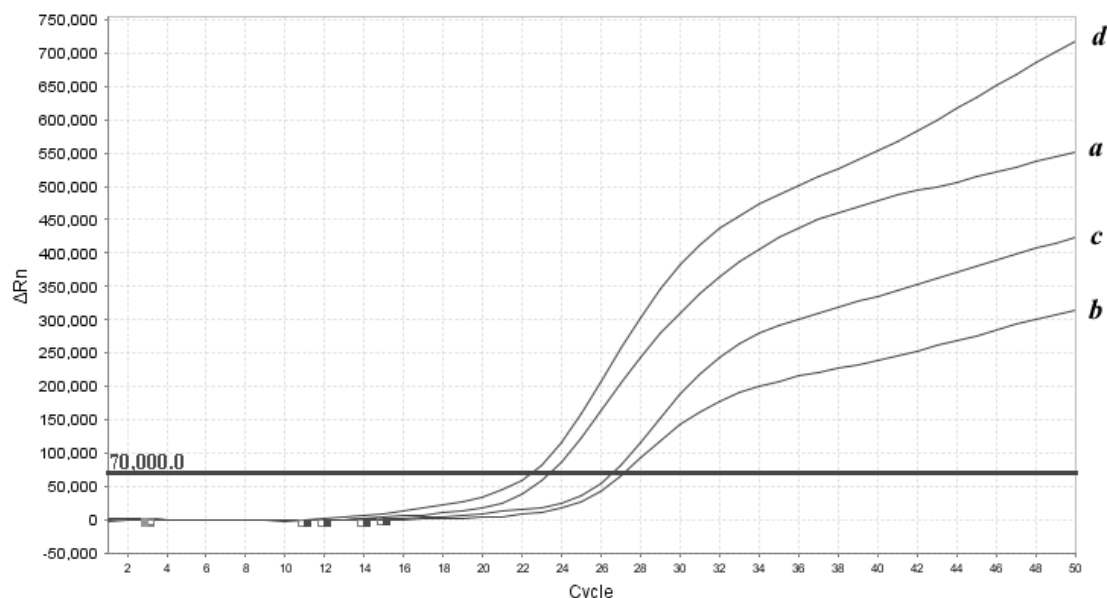


Рис. 1. Кривые роста интенсивности флуоресценции по каналу FAM, соответствующие фрагменту гена *16S* рРНК при использовании в системе различного количественного соотношения праймеров и зонда (*a* – 15 пмоль праймеров и 15 пмоль зонда, *b* – 10 пмоль праймеров и 10 пмоль зонда, *c* – 15 пмоль праймеров и 10 пмоль зонда, *d* – 10 пмоль праймеров и 15 пмоль зонда)

Fig. 1. Fluorescence intensity growth curves along the FAM channel corresponding to the *16S* rRNA gene fragment when using different quantitative ratios of primers and probe in the system (*a* – 15 pmol primers and 15 pmol probe, *b* – 10 pmol primers and 10 pmol probe, *c* – 15 pmol primers and 10 pmol probe, *d* – 10 pmol primers and 15 pmol probe)

Увеличение специфической флуоресценции (ΔRn) происходит по мере возрастания концентрации зонда (рис. 1, *a*, *d*), поэтому для достижения наилучшей эффективности анализа, особенно при необходимости выявления малого числа копий мишени, необходимо избегать ограничения концентрации зонда. Большие величины ΔRn свидетельствуют о высокой эффективности анализа и большей наработке продукта, что наблюдается при внесении в реакционную среду 15 пмоль зонда. При этом наименьшие средние значения порогового цикла амплификации наблюдаются при внесении в реакционную среду по 10 пмоль ($Ct\ 23,17 \pm 0,08$), а также по 15 пмоль ($Ct\ 23,45 \pm 0,11$) прямого и обратного праймеров. Таким образом, определено, что нет статистически значимой разницы при внесении в реакционную смесь по 10 или 15 пмоль праймеров, так как внесение как большего, так и меньшего количества олигонуклеотидов обеспечивает сопоставимый уровень накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующий об образовании продукта реакции. Однако для минимизации расходования реагентов и в целом для уменьшения стоимости реакции рациональным является использование 10 пмоль праймеров.

Количество матрицы, необходимое для оптимальной ПЦР, зависит от источника ДНК, степени ее очистки, длины получаемого ампликона и др. В случае недостаточного количества эпителиальных клеток вследствие неправильного забора биоматериала велика вероятность получения ложноотрицательных результатов. Согласно литературным данным, диапазон используемых в ПЦР концентраций ДНК бактерий составляет от 1 до 10 нг/мкл [26]. В ходе исследования из положительного контрольного образца известной концентрации (30 нг/мкл) готовили рабочие растворы ДНК-матрицы (от 1 до 15 нг/мкл). В результате проведения ПЦР отмечено достаточное

и детектируемое количество ПЦР-продукта при исходном количестве ДНК от 1 до 15 нг/мкл с наилучшим результатом при внесении 5 нг/мкл (среднее значение C_t $13,14 \pm 0,23$, среднее значение максимального уровня флуоресценции $1116667,0 \pm 1153,16$) (рис. 2).

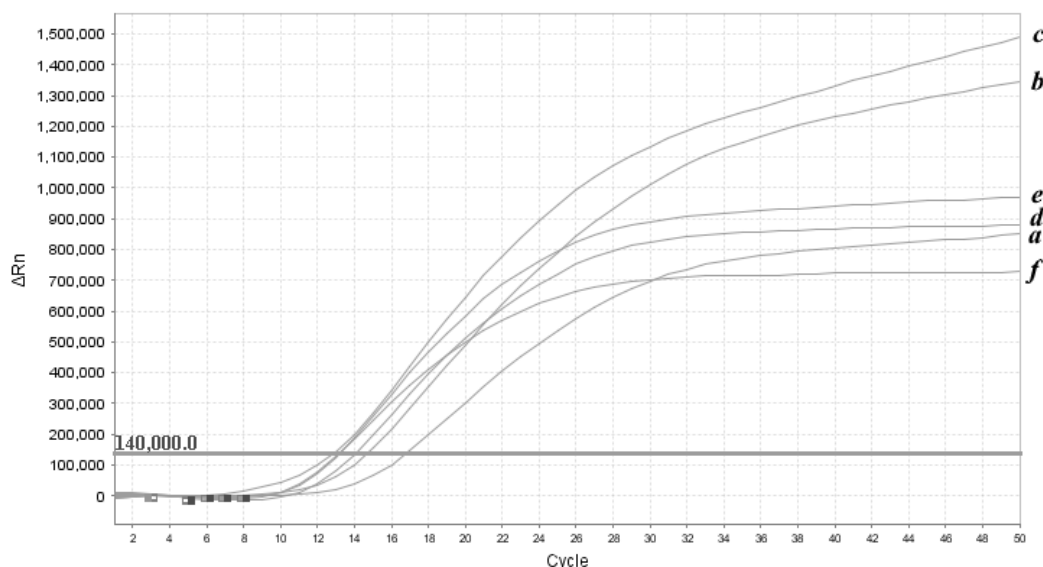


Рис. 2. Влияние концентрации ДНК матрицы (a – 1 нг/мкл; b – 2,5; c – 5; d – 7,5; e – 10; f – 15 нг/мкл) на эффективность ПЦР

Fig. 2. Effect of template DNA concentration (a – 1 ng/ μ l; b – 2.5; c – 5; d – 7.5; e – 10; f – 15 ng/ μ l) on the PCR efficiency

Важным параметром, определяющим основные аналитические характеристики ПЦР, является температура отжига праймеров. Выбор правильной (оптимальной) температуры отжига праймеров для обеспечения специфичности и эффективности ПЦР крайне важен. В случае применения заниженной температуры возрастает вероятность возникновения ложнопозитивной ПЦР, а при завышенной температуре может иметь место плохая наработка целевых ампликонов, что грозит ложнонегативной ПЦР.

Оптимальные температурные условия реакции определяли с использованием градиента температур отжига праймеров в диапазоне от 62 до 67 °С. Были получены сходные результаты для всех температур от 62 до 67 °С, что говорит о возможности амплификации целевого участка в широком диапазоне температур. Однако наилучшее соотношение уровня флуоресценции, порогового цикла амплификации и максимальная эффективность реакции наблюдались при температуре отжига 63 °С.

После оптимизации условий постановки ПЦР в режиме реального времени определены важные характеристики реакции – аналитическая чувствительность, специфичность, а также воспроизводимость.

Для исследования аналитической чувствительности реакции использовали положительный контрольный образец. На его основе готовили пробы 10-кратных разведений последовательного титрования до единичных копий. Проводили ПЦР с образцами в разведении от 10^{-1} до 10^{-10} степени, что соответствует от $8,7 \cdot 10^9$ до $8,8 \cdot 10^9$ ГЭ/мл.

Как видно из данных, представленных на рис. 3, сигмовидные кривые накопления флуоресцентного сигнала имели характерный экспоненциальный рост, что свидетельствовало об образовании специфического продукта амплификации фрагмента гена *16s* рРНК в разведении до 10^{-7} , что соответствует $8,7 \cdot 10^3$ ГЭ/мл.

Полученные результаты оценки аналитической специфичности при исследовании образцов ДНК патогенов человека стандартной панели нуклеиновых кислот негриппозных респираторных возбудителей были отрицательными, за исключением образца, содержащего ДНК *S. pneumoniae*, штамм P1 1428. Вместе с этим показана возможность амплификации ДНК изолятов *S. pneumo-*

niae, *C. psittaci*, разных генотипов *C. trachomatis* (E, F, D, G) и *W. chondrophila*. Таким образом, экспериментально установлено отсутствие неспецифических реакций при тестировании образцов ДНК вирусов и бактерий, потенциально вызывающих респираторные инфекции и выявление ДНК как хламидий (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*), так и хламидияподобных микроорганизмов (*W. chondrophila*), что говорит о высоком уровне специфичности разработанной ПЦР для выявления генетического материала представителей порядка Chlamydiales.

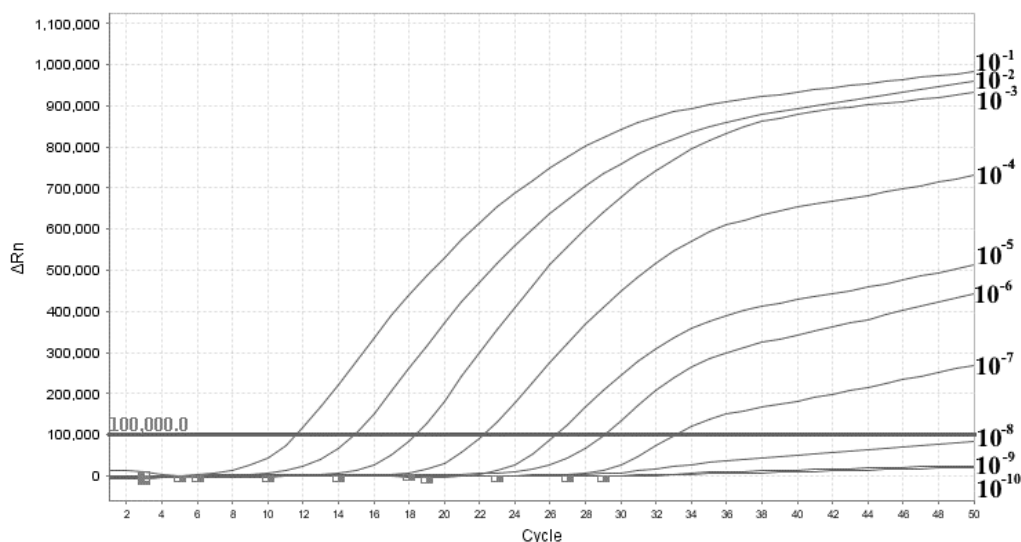


Рис. 3. Результаты исследования аналитической чувствительности ПЦР для детекции ДНК представителей порядка Chlamydiales

Fig. 3. Results on the analytical sensitivity of PCR for the DNA detection of representatives of Chlamydiales order

Одним из важных параметров диагностической ценности ПЦР является воспроизводимость получаемых результатов. Для ее оценки при выявлении ДНК представителей порядка Chlamydiales сформирована отдельная панель образцов ($n = 20$), составленная из 10 содержащих и 10 не содержащих образцов ДНК представителей порядка Chlamydiales. Все образцы были исследованы трехкратно в различных опытах для определения варьирования результатов. Во всех случаях были отмечены идентичные результаты: ПЦР позволила корректно выявить все отрицательные и положительные пробы и получить сходные данные для всех образцов, что свидетельствует о высокой воспроизводимости результатов при использовании разработанной ПЦР для обнаружения ДНК представителей порядка Chlamydiales.

Заключение. Разработан, оптимизирован и успешно апробирован метод на основе ПЦР в режиме реального времени и показана его способность одновременно выявлять ДНК как хламидий, так и хламидияподобных микроорганизмов на основании амплификации специфичного для всех представителей порядка Chlamydiales фрагмента гена *16s* рРНК. С помощью реагентов отечественного производства установлен оптимальный состав реакционной смеси, определены режим постановки и аналитические характеристики ПЦР в режиме реального времени. Наилучшая наработка целевого фрагмента-мишени в геноме наблюдается при содержании в реакционной смеси 2,5 ммоль $MgCl_2$, 10 пмоль прямого и обратного праймеров, 15 пмоль зонда, 5 нг/мкл образца и амплификации при температуре отжига праймеров 63 °С.

Высокие специфичность и воспроизводимость метода, а также его чувствительность на уровне $8,7 \cdot 10^3$ ГЭ/мл свидетельствуют о возможности применения разработанной и оптимизированной ПЦР с детекцией в режиме реального времени для одновременной индикации как хламидий, так хламидияподобных микроорганизмов. Использование данной разработки в качестве дополнительного метода диагностики респираторных патогенов даст возможность оценить вклад хламидияподобных микроорганизмов в этиологическую структуру инфекционных заболеваний респираторного тракта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Очилова, С. С. Роль *Mycoplasma pneumoniae* в качестве этиологического агента при заболеваниях респираторного тракта / С. С. Очилова, Н. Т. Ёдгорова, Г. Х. Эрнаева // Биология и интегратив. медицина. – 2017. – № 4. – С. 110–128.
2. Greub, G. *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia / G. Greub / J. Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – Vol. 15, N 1. – P. 18–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02633>
3. Косяков, С. Я. Острые респираторные инфекции в практике оториноларинголога / С. Я. Косяков, И. Б. Анготоева // Мед. совет. – 2013. – № 7. – С. 26–31.
4. *Parachlamydia acanthamoebae* detected during a pneumonia outbreak in southeastern Finland, in 2017–2018 / K. Hokyнар [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, N 5. – P. 141. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050141>
5. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples / J. Lienard [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49, N 7. – P. 2637–2642. <https://doi.org/10.1128/JCM.00114-11>
6. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae* / A. Taylor-Brown [et al.] // Pathog. Dis. – 2015. – Vol. 73, N 1. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu009>
7. Vouga, M. *Simkania negevensis*, an insight into the biology and clinical importance of a novel member of the *Chlamydiales* order / M. Vouga, D. Baud, G. Greub // Crit. Rev. Microbiol. – 2017. – Vol. 43, N 1. – P. 62–80. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1165650>
8. Taxogenomics of the order *Chlamydiales* / T. Pillonel [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 1381–1393. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000090>
9. Al-Younes, H. M. Molecular evidence for the absence of an association between *Simkania negevensis* and respiratory diseases / H. M Al-Younes, W. Al-Zereini, N. M. Obeidat // J. Med. Microbiol. – 2017. – Vol. 66, N 9. – P. 1324–1327. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000564>
10. Greub, G. *Parachlamydia acanthamoeba* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis / G. Greub, J.-L. Mege, D. Raoult // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71, N 10. – P. 5979–5985. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5979-5985.2003>
11. Corsaro, D. New chlamydial lineages from freshwater samples / D. Corsaro, D. Venditti, V. Valassina // Microbiology. – 2002. – Vol. 148, N 2. – P. 343–344. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-343>
12. *Parachlamydia acanthamoebae* enters and multiplies within pneumocytes and lung fibroblasts / N. Casson [et al.] // Microbes Infect. – 2006. – Vol. 8. – P. 1294–1300. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.011>
13. Severe pneumonia due to *Parachlamydia acanthamoebae* following intranasal inoculation: A mice model / L. Pilloux [et al.] // Microbes Infect. – 2015. – Vol. 17, N 11–12. – P. 755–760. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.08.007>
14. Chlamydialike organisms and atherosclerosis / G. Greub [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12, N 4. – P. 705–706. <https://doi.org/10.3201/eid1204.050751>
15. High prevalence of “*Simkania Z*”, a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis / S. Kahane [et al.] // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 177, N 5. – P. 1425–1429. <https://doi.org/10.1086/517830>
16. Domestic water supplies as a possible source of infection with *Simkania* / S. Kahane [et al.] // J. Infect. – 2007. – Vol. 54, N 1. – P. 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.011>
17. High rate of *Simkania negevensis* among Canadian inuit infants hospitalized with lower respiratory tract infections / D. Greenberg [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 35. – P. 506–508. <https://doi.org/10.1080/00365540310014648>
18. Infection with *Simkania negevensis* in Brooklyn, New York / S. Kumar [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2005. – Vol. 24, N 11. – P. 989–992. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000183755.24578.0b>
19. Detection of *Simkania negevensis* by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK / M. G. Friedman [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2006. – Vol. 59, N 3. – P. 331–333. <http://doi.org/10.1136/jcp.2004.025601>
20. New diagnostic real-time PCR for specific detection of *Parachlamydia acanthamoebae* DNA in clinical samples / N. Casson [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 4. – P. 1491–1493. <https://doi.org/10.1128/JCM.02302-07>
21. *Parachlamydia* and *Rhodo-chlamydia* in premature neonates / F. Lamoth [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15, N 12. – P. 2072–2075. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090267>
22. *Simkania negevensis*: Is it a real respiratory pathogen? / M. Kose [et al.] // Acta Microbiol. Immunol. Hung. – 2015. – Vol. 62, N 2. – P. 161–166. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.6>
23. Niemi, S. Chlamydia-related bacteria in respiratory samples in Finland / S. Niemi, G. Greub, M. Puolakkainen // Microbes Infect. – 2011. – Vol. 13, N 10. – P. 824–827. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.04.012>
24. Получение генно-инженерных конструкций, содержащих диагностически значимые фрагменты генома *Chlamydia trachomatis* / Е. Г. Фомина [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. В. А. Горбунова. – Минск, 2020. – Вып. 13. – С. 104–109.
25. Lorenz, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies / T. C. Lorenz // J. Visual. Experiments. – 2012. – Vol. 22, N 63. – P. e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
26. Водчиц, Н. В. Подбор условий проведения ISSR–ПЦР для сортовой голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum*) / Н. В. Водчиц, Е. О. Юрченко, А. А. Волотович // Весн. Палес. дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук. – 2015. – № 1. – С. 3–7.

References

1. Ochilova S. S., Edgorova N. T., Ernaeva G. Kh. The role of *Mycoplasma pneumonia* as etiological agent in disease of respiration tracts. *Biologiya i integrativnaya meditsina* [Biology and Integrative medicine], 2017, no. 4, pp. 110–128 (in Russian).
2. Greub G. *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009, vol. 15, no. 1, pp. 18–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02633>
3. Kosyakov S. Ya., Angotoeva I. B. Acute respiratory infections in ENT practice. *Meditsinskii sovet* [Medical Council], 2013, no. 7, pp. 26–31 (in Russian).
4. Hokynar K., Kurkela S., Nieminen T., Saxen H., Vesterinen E. J., Mannonen L., Pietikäinen R., Puolakkainen M. *Parachlamydia acanthamoebae* detected during a pneumonia outbreak in southeastern Finland, in 2017–2018. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 5, p. 141. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050141>
5. Lienard J., Croxatto A., Aeby S., Jatton K., Posfay-Barbe K., Gervaix A., Greub G. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 7, pp. 2637–2642. <https://doi.org/10.1128/JCM.00114-11>
6. Taylor-Brown A., Vaughan L., Greub G., Timms P., Polkinghorne A. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *Pathogens and Disease*, 2015, vol. 73, no. 1, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu009>
7. Vouga M., Baud D., Greub G. *Simkania negevensis*, an insight into the biology and clinical importance of a novel member of the *Chlamydiales* order. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, vol. 43, no. 1, pp. 62–80. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1165650>
8. Pillonel T., Bertelli C., Salamin N., Greub G. Taxogenomics of the order *Chlamydiales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, vol. 6, pp. 1381–1393. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000090>
9. Al-Younes H. M., Al-Zereini W., Obeidat N. M. Molecular evidence for the absence of an association between *Simkania negevensis* and respiratory diseases. *Journal of Medical Microbiology*, 2017, vol. 66, no. 9, pp. 1324–1327. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000564>
10. Greub G., Mege J.-L., Raoult D. *Parachlamydia acanthamoeba* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis. *Infection and Immunity*, 2003, vol. 71, no. 10, pp. 5979–5985. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5979-5985.2003>
11. Corsaro D., Venditti D., Valassina V. New chlamydial lineages from freshwater samples. *Microbiology*, 2002, vol. 148, no. 2, pp. 343–344. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-343>
12. Casson N., Medico N., Bille J., Greub G. *Parachlamydia acanthamoebae* enters and multiplies within pneumocytes and lung fibroblasts. *Microbes and Infection*, 2006, vol. 8, pp. 1294–1300. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.011>
13. Pilloux L., Casson N., Sommer K., Klos A., Stehle J. C., Pusztaszeri M., Greub G. Severe pneumonia due to *Parachlamydia acanthamoebae* following intranasal inoculation: A mice model. *Microbes and Infection*, 2015, vol. 17, no. 11–12, pp. 755–760. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.08.007>
14. Greub G., Hartung O., Adekambi T., Alimi Y. S., Raoult D. Chlamydialike organisms and atherosclerosis. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, vol. 12, no. 4, pp. 705–706. <https://doi.org/10.3201/eid1204.050751>
15. Kahane S., Greenberg D., Friedman M. G., Haikin H., Dagan R. High prevalence of “*Simkania Z*”, a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases*, 1998, vol. 177, no. 5, pp. 1425–1429. <https://doi.org/10.1086/517830>
16. Kahane S., Greenberg D., Newman N., Dvoskin B., Friedman M. G. Domestic water supplies as a possible source of infection with *Simkania*. *Journal of Infection*, 2007, vol. 54, no. 1, pp. 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.011>
17. Greenberg D., Banerji A., Friedman M. G., Chiu C. H., Kahane S. High rate of *Simkania negevensis* among Canadian inuit infants hospitalized with lower respiratory tract infections. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2003, vol. 35, pp. 506–508. <https://doi.org/10.1080/00365540310014648>
18. Kumar S., Kohlhoff S. A., Gelling M., Roblin P. M., Kutlin A., Kahane S., Friedman M. G., Hammerschlag M. R. Infection with *Simkania negevensis* in Brooklyn, New York. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2005, vol. 24, no. 11, pp. 989–992. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000183755.24578.0b>
19. Friedman M. G., Kahane S., Dvoskin B., Hartley J. W. Detection of *Simkania negevensis* by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK. *Journal of Clinical Pathology*, 2006, vol. 59, no. 3, pp. 331–333. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2004.025601>
20. Casson N., Posfay-Barbe K. M., Gervaix A., Greub G. New diagnostic real-time PCR for specific detection of *Parachlamydia acanthamoebae* DNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, vol. 46, no. 4, pp. 1491–1493. <https://doi.org/10.1128/JCM.02302-07>
21. Lamoth F., Aeby S., Schneider A., Jatton-Ogay K., Vaudaux B., Greub G. *Parachlamydia* and *Rhodo-chlamydia* in premature neonates. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, vol. 15, no. 12, pp. 2072–2075. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1512.090267>
22. Kose M., Ekinci D., Gokahmetoglu S., Elmas T., Öztürk M. K. *Simkania negevensis*: Is it a real respiratory pathogen? *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2015, vol. 62, no. 2, pp. 161–166. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.6>
23. Niemi S., Greub G., Puolakkainen M. Chlamydia-related bacteria in respiratory samples in Finland. *Microbes and Infection*, 2011, vol. 13, no. 10, pp. 824–827. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.04.012>
24. Fomina E. G., Rubanik L. V., Kapustina Yu. M., Grigor'eva E. E., Zverko V. V. Construction of recombinant plasmids containing diagnostically significant regions of the *Chlamydia trachomatis* genome. *Sovremennyye problemy infektsionnoi*

patologii cheloveka: sbornik nauchnykh trudov [Modern problems of human infectious pathology: a collection of scientific papers]. Minsk, 2020, vol. 13, pp. 104–109 (in Russian).

25. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, vol. 22, no. 63, p. e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>

26. Vodehits N. V., Yurchenko E. O., Volotovich A. A. Study of the optimal conditions for ISSR-PCR in marking of *Vaccinium corymbosum* cultivars. *Vesnik Paleskaga dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Natural Sciences Series], 2015, no. 1, pp. 3–7 (in Russian).

Информация об авторах

Капустина Юлия Михайловна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kapustinajm@gmail.com

Рубаник Людмила Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lab.dsbvi@gmail.com

Шмелева Наталья Петровна – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shmelevanataliya@mail.ru

Сивец Наталья Валерьевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sivets_n@mail.ru

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru

Information about the authors

Yulia M. Kapustina – Postgraduate student, Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kapustinajm@gmail.com

Lyudmila V. Rubanik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lab.dsbvi@gmail.com

Natalia P. Shmeleva – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmelevanataliya@mail.ru

Natalia V. Sivets – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sivets_n@mail.ru

Elena E. Grigorieva – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru