

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028686**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.12.29

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(21) Номер заявки
201401195

(22) Дата подачи заявки
2014.11.14

(54) **НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК CHLAMYDIA TRACHOMATIS И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(43) **2016.05.31**

(56) WO-A2-2007056398

(96) **2014000136 (RU) 2014.11.14**

EP-A2-0336412

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

RU-C1-2443782

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ИНТЕРЛАБСЕРВИС" (RU)**

RU-C1-2385946

RU-C1-2245369

RU-C1-2385945

(72) Изобретатель:

**Гущин Александр Евгеньевич,
Шипулин Герман Александрович
(RU)**

(57) Группа изобретений относится к медицине, более конкретно к лабораторной диагностике, и может быть использована для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах методом полимеразной цепной реакции. Предложенный набор реагентов включает по меньшей мере два олигонуклеотидных праймера для полимеразной цепной реакции, обеспечивающих специфическую амплификацию фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis*, лежащего внутри участка криптической плазмиды *Chlamydia trachomatis* последовательности SEQ ID NO:1. Размер амплифицируемого фрагмента составляет от 70 до 110 пар нуклеотидов. Также предложено применение описанного набора реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах. Группа изобретений позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять все клинически значимые штаммы/генотипы/серовары уrogenитального биоара *Chlamydia trachomatis* с помощью единственной мишени полимеразной цепной реакции.

B1

028686

028686

B1

Область техники

Группа изобретений относится к медицине, более конкретно к лабораторной диагностике и может быть использована для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах.

Уровень техники

Chlamydia trachomatis - облигатный внутриклеточный бактериальный патоген человека. Инфекция *Chlamydia trachomatis* (хламидиоз) является самой распространённой бактериальной инфекцией, передаваемой половым путём, инфицируя ежегодно свыше 90 миллионов человек [Lanjouw E. et al. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections, 2010].

В настоящее время в пределах вида *Chlamydia trachomatis* выделяют 3 биовара и множество сероваров и генотипов: биовар трахома (серовары А-С), урогенитальный биовар (серовары D-K) и биовар венерическая лимфогранулема (ЛГВ, серовары L1-L3) [Lanjouw E. et al. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections, 2010]. Представители урогенитального биовара *Chlamydia trachomatis* могут являться причиной воспалительных заболеваний урогенитального тракта у мужчин и женщин, таких как уретриты, цервициты, эпидидимиты. Однако до 90% случаев урогенитального хламидиоза у женщин и более 50% случаев урогенитального хламидиоза у мужчин имеют бессимптомное течение [Lanjouw E. et al. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections, 2010]. Инфекции, протекающие бессимптомно, часто остаются не диагностированными и, следовательно, пациентам не назначается адекватная терапия в течение длительного периода времени. В отсутствие лечения хламидийная инфекция приводит к таким серьёзным последствиям, как воспалительные заболевания органов малого таза у женщин, патология беременности, мужское и женское бесплодие, пневмония и конъюнктивит у новорождённых [Lanjouw E. et al. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections, 2010; Jaton K. et al. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. *J Med Microbiol.* 2006 Dec; 55(Pt 12): 1667-1674].

В связи с затруднённой клинической диагностикой трудно переоценить важность надёжной и эффективной лабораторной диагностики хламидийной инфекции. Традиционные методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций бактериоскопический (микроскопический), бактериологический (культуральный) и иммунологический (серологический) - в настоящее время утратили свое доминирующее положение для диагностики *Chlamydia trachomatis* в развитых странах. Европейское руководство 2010 года по ведению больных с инфекциями, вызванными *Chlamydia trachomatis*, признает основными методами диагностики современные молекулярно-биологические методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) [Lanjouw E. et al. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections, 2010]. Наибольшее распространение среди МАНК получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Существует большое количество "in house" ("домашних") и серийно выпускаемых (коммерческих) наборов реагентов (тест-систем) для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции. Наборы различаются генами-мишенями для ПЦР, способами детекции продуктов амплификации, размерами продуктов амплификации, количеством одновременно выявляемых патогенов - от одного до семи [Gimenes F. et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One.* 2014 Jun 12; 9(6): e98862. doi: 10.1371/journal.pone.0098862. eCollection 2014].

Известен набор реагентов для обнаружения ДНК *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции ПОЛИМИК-ХЛ производства ООО НПФ "ЛИТЕХ" [Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00382 от 16.07.2007]. Детекция продуктов амплификации осуществляется методом гель-электрофореза.

Известны наборы реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции ХЛАМИ-ГЕН производства ООО "НПО ДНК-Технология" [Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03890 от 26.04.2010]. Наборы производятся в трёх модификациях, различающихся способами детекции продуктов амплификации: детекция методом гель-электрофореза, флуоресцентная детекция по конечной точке и флуоресцентная детекция в режиме реального времени.

В исследовании, посвященном сравнительной оценке тест-систем отечественного производства для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*, сообщается, что в наборе реагентов производства ООО НПФ "ЛИТЕХ" в качестве мишени для ПЦР используется криптолическая плаزمиды, а в наборах реагентов производства ООО "НПО ДНК-Технология" в зависимости от способа детекции используются различные мишени: в наборе с детекцией методом гель-электрофореза в качестве мишени используется криптолическая плазмиды, а в наборе с флуоресцентной детекцией по конечной точке и в режиме реального времени используется ген 16S rRNA [Shipitsyna E. et al. First evaluation of six nucleic acid amplification tests widely used in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in Russia. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009 Mar; 23(3): 268-276]. Однако более детальная информация, касающаяся конкретных фрагментов мишеней, размеров продуктов амплификации, нуклеотидных последовательностей используемых в наборах олигонуклеотидных праймеров и зондов, по сведениям авторов настоящих изобретений, не опубликована в общедоступных источниках информации.

На российском рынке присутствуют наборы реагентов (тест-системы) производства компании

Roche Molecular Systems, Inc. серии COBAS® AMPLICOR: для выявления ДНК одного патогена - Набор реагентов для детекции ДНК Хламидии Трахоматис (Cobas Amplicor Chlamydia trachomatis Detection kit), для одновременного выявления двух патогенов - Набор реагентов для амплификации Хламидии Трахоматис и Нейссерии Гонореи (Amplicor CT/NG Amplification kit) [Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09814 25.05.2011]. В наборах реализован принцип флуоресцентной детекции по конечной точке с использованием флуоресцентного интеркалирующего красителя SYBR GREEN. В данных наборах в качестве мишени для выявления Chlamydia trachomatis используется криптическая плаزمиды, и более конкретно фрагмент плазмиды в открытой рамке считывания ORF1 [EP 0420260 B1, EP 0630971 B1, EP 0875583 B1].

Данные тест-системы были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration) и были рекомендованы ВОЗ в качестве референсных тест-систем при валидации новых и модифицированных тест-систем [ПРОТОКОЛЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ ВЫЗВАННОЙ CHLAMYDIA TRACHOMATIS, (УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ) В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (проект), www.cnikvi.ru/files/xlamidioz.doc], что свидетельствует об их надёжности. Однако в 2007 году были обнаружены новые мутантные штаммы Chlamydia trachomatis (nvCT), содержащие делецию размером 377 пар нуклеотидов именно в том фрагменте ORF1 криптической плазмиды, который является мишенью полимеразной цепной реакции в данных диагностических наборах [Ripa T. and Nilsson P.A. A Chlamydia trachomatis strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. Sex Transm Dis. 2007 May; 34(5): 255-256]. Новые мутантные штаммы получили название "шведский вариант" по месту их обнаружения. Невозможность обнаружения данных штаммов наборами серии COBAS® AMPLICOR и другими наборами со сходной мишенью привело к тысячам ложноотрицательных результатов в диагностике хламидийной инфекции, что, вероятно, способствовало распространению мутантных штаммов [Steensels D. et al. Towards multitarget testing in molecular microbiology. Int J Microbiol. 2013; 2013:121057. doi: 10.1155/2013/121057. Epub 2013 Nov 25. Review].

Одним из путей решения проблемы "ухода" новых "шведских вариантов" Chlamydia trachomatis от обнаружения является введение дополнительной мишени для ПЦР в рамках одной тест-системы. Так, усовершенствованный набор реагентов для выявления Chlamydia trachomatis COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0 [Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07038] компании Roche Molecular Systems, Inc. содержит реагенты для амплификации и детекции в режиме реального времени двух мишеней Chlamydia trachomatis: помимо вышеупомянутого фрагмента криптической плазмиды, также хромосомного гена отр-1, кодирующего основной белок внешней мембраны (МОМР). Такой подход, несомненно, повышает надёжность выявления Chlamydia trachomatis (снижает количество ложноотрицательных результатов), однако усложняет и удорожает анализ, повышая требования к лабораторному оборудованию (а именно к числу каналов детекции прибора). Кроме того, данный подход - увеличение количества мишеней для выявления одного патогена - снижает возможности одновременного выявления нескольких патогенов в одной пробирке на имеющемся в лаборатории оборудовании, что не вполне отвечает современным потребностям лабораторной диагностики урогенитальных заболеваний, часто протекающих по типу микст-инфекций.

Сущность группы изобретений

Задачами настоящей группы изобретений являются: разработка и валидация набора реагентов, позволяющего выявлять все клинически значимые штаммы/генотипы/серовары урогенитального биовара Chlamydia trachomatis (в том числе nvCT) с помощью единственной мишени полимеразной цепной реакции, с возможностью как самостоятельного использования для выявления ДНК одного патогена - Chlamydia trachomatis, так и в составе мультиплексного набора для выявления ДНК нескольких патогенов, с возможностью количественного определения ДНК Chlamydia trachomatis; расширение арсенала тест-систем для выявления ДНК Chlamydia trachomatis.

В рамках настоящих изобретений в качестве мишени для полимеразной цепной реакции была выбрана криптическая плазмиды Chlamydia trachomatis. Плазмиды мультикопийна, то есть содержится в количестве 4-8 копий на клетку, что повышает аналитическую чувствительность тест-систем с данной мишенью по сравнению с тест-системами с однокопийными хромосомными мишенями. Кроме того, последовательность криптической плазмиды высококонсервативна: вариабельность среди представителей различных сероваров внутри одного биовара составляет менее 1% [Comanducci M. et al. Diversity of the Chlamydia trachomatis common plasmid in biovars with different pathogenicity. Plasmid. 1990 Mar; 23(2): 149-154], что делает эту мишень подходящей для выявления всех клинически значимых сероваров урогенитального биовара Chlamydia trachomatis при условии выбора фрагмента для амплификации с учётом данных о положении делеции в криптической плазмиде nvCT.

На основании анализа "выравниваний" нуклеотидных последовательностей криптических плазмид Chlamydia trachomatis из GenBank и имеющихся литературных данных о положении делеции в криптической плазмиде nvCT ("шведских вариантов" Chlamydia trachomatis) был определён высококонсервативный участок внутри открытой рамки считывания 8 (ORF8) криптической плазмиды, имеющий последо-

вательность SEQ ID NO:1, в качестве оптимальной "площадки" для дизайна олигонуклеотидных праймеров для специфической амплификации фрагмента ДНК внутри этой "площадки".

Помимо участка для дизайна олигонуклеотидных праймеров для специфической амплификации фрагмента ДНК криптической плазмиды *Chlamydia trachomatis* в рамках настоящих изобретений экспериментальным путём был определён оптимальный размер этого фрагмента (продукта амплификации) - от 70 до 110 пар нуклеотидов. Оказалось, что амплификация фрагментов такого размера обладает минимальной восприимчивостью как к примесям-ингибиторам ПЦР, так и к конкуренции со стороны других ПЦР мишеней. Последнее в свою очередь расширяет возможности мультиплексирования ПЦР, то есть одновременного выявления двух и более патогенов в одной реакции (в одной пробирке).

Таким образом поставленные задачи решены созданием набора реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце методом полимеразной цепной реакции, включающего по меньшей мере два олигонуклеотидных праймера для полимеразной цепной реакции, отличающего тем, что указанные два олигонуклеотидных праймера обеспечивают специфическую амплификацию фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis*, лежащего внутри участка криптической плазмиды *Chlamydia trachomatis* последовательности SEQ ID NO:1, причём размер фрагмента составляет от 70 до 110 пар нуклеотидов.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:2, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:3.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:2, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:3.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд для детекции фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis* в режиме реального времени, где указанный зонд на 5'-конце содержит флуоресцентный краситель, на 3'-конце содержит гаситель флуоресценции.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что флуоресцентный краситель выбран из группы: JOE, FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5, HEX.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что гаситель флуоресценции выбран из группы: BHQ1, BHQ2, BHQ3, RTQ.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что олигонуклеотидный зонд имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:4.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что олигонуклеотидный зонд имеет последовательность SEQ ID NO:4.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что олигонуклеотидный зонд представляет собой (FAM)-CCCCGCACGTGCTTCGAGCAACCGCG-(BHQ1).

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что олигонуклеотидный зонд представляет собой (JOE)-CCCCGCACGTGCTTCGAGCAACCGCG-(BHQ1).

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что дополнительно содержит термостабильную ДНК-полимеразу, буферный раствор для ПЦР, дезоксинуклеозидтрифосфаты.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что дополнительно содержит по меньшей мере один калибратор для количественной оценки содержания ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце, содержащий известные концентрации фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis*, используемого для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что дополнительно содержит реагенты для выявления в образце методом мультиплексной полимеразной цепной реакции ДНК по меньшей мере одного дополнительного микроорганизма, выбранного из группы: *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*.

В частном случае выполнения набор по изобретению характеризуется тем, что биологический образец для проведения исследования выбран из группы: мазок из влагалища, моча, семенная жидкость, соскоб из уретры, соскоб из цервикального канала.

Объём притязаний включает также применение вышеописанных наборов реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах.

Группа изобретений позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять все клинически значимые штаммы/генотипы/серовары уrogenитального биовара *Chlamydia trachomatis* (в том числе пvСТ) с помощью единственной мишени полимеразной цепной реакции. В частном случае выполнения группа изобретений позволяет определять ДНК *Chlamydia trachomatis* в количественном формате, что может быть полезно для уточнения диагноза при сомнительных/дискордантных результатах анализа. Кроме того, уровень бактериальной нагрузки может иметь патогенетическое и прогностическое значение и оказывать влияние на выбор тактики этиотропной терапии. В частном случае выполнения группа изобретений позволяет выявлять одновременно несколько возбудителей инфекций, передаваемых половым

путём, что может быть полезно для диагностики часто встречающихся микст-инфекций урогенитального тракта.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления группы изобретений

Пример 1. Выявление (качественное определение) ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах.

В исследование были включены 127 пациентов мужского пола с жалобами на наличие зуда/жжения в области половых органов и/или дизурии. От каждого пациента получали по два биологических образца - соскоба из уретры. Взятые у пациентов уретральные образцы помещали в 1 мл сахарозо-фосфатного буфера. Первый образец исследовали методом полимеразной цепной реакции с использованием двух референсных наборов реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* - COBAS® AMPLICOR (Roche Molecular Systems, Inc., США) и Light-Mix 480 HT (TIB MOLBIOL, Германия). Второй образец исследовали методом полимеразной цепной реакции с использованием набора реагентов по изобретению. Далее проводилось сопоставление результатов, полученных тремя наборами реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*.

Исследование образцов с использованием двух референсных наборов реагентов.

Выделение ДНК из биологических образцов проводили с использованием набора реагентов MagNa Pure LC DNA Isolation kit I (Roche Molecular Biochemicals, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Объем элюции составил 100 мкл, далее образец развели в 2 раза, добавляя еще 100 мкл буфера. Для амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции использовали 50 мкл полученного элюата. Постановку полимеразной цепной реакции и интерпретацию результатов исследования осуществляли в соответствии с инструкциями производителя.

Исследование образцов с использованием набора реагентов по изобретению.

Выделение ДНК из биологических образцов проводили с использованием набора реагентов ДНК-Сорб-АМ (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, кат. №102-22). До выделения ДНК в пробирку вносили по 10 мкл препарата внутреннего контрольного образца (ВКО). Для амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции использовали 10 мкл полученного элюата (объем полученного элюата после экстракции составлял 100 мкл).

Реакционную смесь для полимеразной цепной реакции готовили следующим образом. Сначала готовили ПЦР-смесь-1, содержащую олигонуклеотидные праймеры, олигонуклеотидные зонды для детекции и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты в буфере ТЕ. Состав ПЦР-смеси-1 приведен в табл. 1.

Таблица 1. Состав ПЦР-смеси-1.

Название	Последовательность	Количество (пмоль/реакцию)
Праймеры		
СТТ-1 (SEQ ID NO:2)	CAAGCAGGACTACAAGCTGCAAT	7.5
СТТ-2 (SEQ ID NO:3)	CCTAGGCGTTGTACTCCGTCA	7.5
СТИ-11	GCGTGCATGGTCCGACTTATT	0.4
СТИ-2	CGCACGTACGGCAACTTTCGTA	0.4
Зонды		
СТТЗ-2 (SEQ ID NO:4)	(FAM)-CCCCGCACGTGCTTCGAGCAACCGCG-(BHQ1)	2.5
VKO-Z-R6G	(R6G)-CTAGCTGGCGTCAGGAATCCCAGG-(RTQ)	0.2
Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты		
dNTP (4.4 mM)		4.4

Затем в каждую реакционную пробирку вносили по 10 мкл ПЦР-смеси-1, по 5 мкл ПЦР-смеси-2 red (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, кат. №863), содержащей Таq-полимеразу, и по 10 мкл элюата, полученного при выделении ДНК из биологических образцов.

Амплификацию проводили на приборе "Rotor-Gene Q" (QIAGEN, Германия).

Программа амплификации:

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	-	1
1 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
2 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	40
	60	20 с	FAM, R6G	
	72	15 с		

Полученные данные - кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам - анализировались с помощью программного обеспечения прибора "Rotor-Gene Q". Сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis*, детектировался по каналу Green, ДНК ВКО детектировался по каналу Yellow. Результаты интерпретировались на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла "Ct" в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретировались следующим образом.

ДНК *Chlamydia trachomatis* обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Green определено значение порогового цикла Ct. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

ДНК *Chlamydia trachomatis* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Green не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Yellow определено значение порогового цикла Ct, не превышающее 33.

Результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) или превышает 33 значение порогового цикла Ct по каналу для детекции Yellow и не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналу Green.

Результаты исследования уретральных образцов от 127 пациентов приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты исследования уретральных образцов от 127 пациентов с использованием трех различных наборов реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*

№ образца	Результат		
	COBAS AMPLICOR	Light-Mix 480 HT	Набор по изобретению
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	+	+	+
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	+	+	+
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-

16	-	-	-
17	+	+	+
18	-	-	-
19	+	+	+
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30			
31	+	+	+
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	+	+	+
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	-
46	+	+	+
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-
51	-	-	-
52	-	-	-
53	+	+	+
54	-	-	-
55	-	-	-
56	-	-	-
57	+	+	+
58	-	-	-
59	+	+	+
60	-	-	-
61	-	-	-

62	-	-	-
63	-	-	-
64	-	-	-
65	-	-	-
66	-	-	-
67	-	-	-
68	-	-	-
69	-	-	-
70	-	-	-
71	-	-	-
72	-	-	-
73	-	-	-
74	-	-	-
75	+	+	+
76	-	-	-
77	-	-	-
78	-	-	-
79	-	-	-
80	-	-	-
81	-	-	-
82	-	-	-
83	-	-	-
84	+	+	+
85	-	-	-
86	-	-	-
87	-	-	-
88	-	-	-
89	-	-	-
90	-	-	-
91	-	-	-
92	-	-	-
93	+	+	+
94	-	-	-
95	-	-	-
96	-	-	-
97	-	-	-
98	-	-	-
99	-	-	-
100	-	-	-
101	-	-	-
102	+	+	+
103	-	-	-
104	-	-	-
105	-	-	-
106	-	-	-
107	-	-	-
108	-	-	-
109	-	-	-
110	-	-	-
111	-	-	-
112	-	-	-
113	-	-	-
114	+	+	+
115	-	-	-
116	-	-	-
117	-	-	-
118	-	-	-
119	-	-	-
120	-	-	-
121	-	-	-
122	-	-	-
123	-	-	-
124	-	-	-
125	-	-	-
126	+	+	+
127	-	-	-

Было получено 100%-ное совпадение при тестировании набора по изобретению относительно двух референсных наборов реагентов. Таким образом, диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, прогностическое значение положительного результата и прогностическое значение отрицательного результата набора по изобретению составили 100%.

Также было продемонстрировано, что набор по изобретению позволяет достоверно выявлять наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах методом мультиплексной полимеразной цепной реакции одновременно с выявлением ДНК других возбудителей инфекций, передаваемых половым путем: *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*.

Пример 2. Количественное определение ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах.

Проводили исследование биологических образцов, описанных в примере 1, с использованием дополнительного набора реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* ХЛАМИ-ГЕН (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия).

Результаты исследования уретральных образцов от 127 пациентов приведены в табл. 3. При анализе результатов исследования выявлен дискордантный образец №84.

Таблица 3. Результаты исследования уретральных образцов от 127 пациентов с использованием четырех различных наборов реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*

№ образца	Результат			
	COBAS AMPLICOR	Light-Mix 480 HT	ХЛАМИ-ГЕН	Набор по изобретению
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	+	+	+	+
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	+	+
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	+	+	+	+
18	-	-	-	-
19	+	+	+	+
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	+	+	+	+
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	+	+	+	+
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-

41	-	-	-	-
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	-	-	-
46	+	+	+	+
47	-	-	-	-
48	-	-	-	-
49	-	-	-	-
50	-	-	-	-
51	-	-	-	-
52	-	-	-	-
53	+	+	+	+
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	+	+	+	+
58	-	-	-	-
59	+	+	+	+
60	-	-	-	-
61	-	-	-	-
62	-	-	-	-
63	-	-	-	-
64	-	-	-	-
65	-	-	-	-
66	-	-	-	-
67	-	-	-	-
68	-	-	-	-
69	-	-	-	-
70	-	-	-	-
71	-	-	-	-
72	-	-	-	-
73	-	-	-	-
74	-	-	-	-
75	+	+	+	+
76	-	-	-	-
77	-	-	-	-
78	-	-	-	-
79	-	-	-	-
80	-	-	-	-
81	-	-	-	-
82	-	-	-	-
83	-	-	-	-
84	+	+		+
85	-	-	-	-
86	-	-	-	-

87	-	-	-	-
88	-	-	-	-
89	-	-	-	-
90	-	-	-	-
91	-	-	-	-
92	-	-	-	-
93	+	+	+	+
94	-	-	-	-
95	-	-	-	-
96	-	-	-	-
97	-	-	-	-
98	-	-	-	-
99	-	-	-	-
100	-	-	-	-
101	-	-	-	-
102	+	+	+	+
103	-	-	-	-
104	-	-	-	-
105	-	-	-	-
106	-	-	-	-
107	-	-	-	-
108	-	-	-	-
109	-	-	-	-
110	-	-	-	-
111	-	-	-	-
112	-	-	-	-
113	-	-	-	-
114	+	+	+	+
115	-	-	-	-
116	-	-	-	-
117	-	-	-	-
118	-	-	-	-
119	-	-	-	-
120	-	-	-	-
121	-	-	-	-
122	-	-	-	-
123	-	-	-	-
124	-	-	-	-
125	-	-	-	-
126	+	+	+	+
127	-	-	-	-

Далее все образцы, в которых была выявлена ДНК *Chlamydia trachomatis*, исследовали методом количественной полимеразной цепной реакции с применением набора по изобретению.

Количественное определение ДНК микроорганизма основывается на существовании линейной зависимости между циклом начала увеличения флуоресценции образца (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct) и исходной концентрацией ДНК-мишени. Для реализации количественного определения в реакции амплификации параллельно используются ДНК-калибраторы - образцы с известной концентрацией ДНК *Chlamydia trachomatis*. По результатам амплификации ДНК-калибраторов выстраивается калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* в образцах.

Калибраторы (К1 и К2) готовили путем разведения стандартного образца производства (СОП) №86 *Chlamydia trachomatis* ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, содержащего фрагмент криптической плазмиды *Chlamydia trachomatis*, клонированный по сайтам EcoRI в плечи фага λ - λ gt10. Для разведения исходного СОП используется ДНК-буфер с poly(A). Конечная концентрация для калибратора К1 составляет $1 \cdot 10^6$ ГЭ/мл; для калибратора К2 - $1 \cdot 10^4$ ГЭ/мл.

Амплификацию проводили на приборе "Rotor-Gene Q" (QIAGEN, Германия). Значения пороговых циклов калибраторов и исследуемых образцов анализировались программой автоматического учета результатов. В соответствии с этими значениями автоматически была построена калибровочная прямая и рассчитаны концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* в исследованных уретральных образцах от 16 пациентов (табл. 4).

Таблица 4. Результаты количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis* в исследованных уретральных образцах от 16 пациентов

№ образца	Концентрация ДНК <i>C. trachomatis</i> , ГЭ/мл
7	1,36E+08
12	5,41E+07
17	5,47E+06
19	8,43E+07
31	1,65E+04
35	4,57E+06
46	9,63E+03
53	7,16E+07
57	6,58E+04
59	7,46E+05
75	4,56E+04
84	
93	4,86E+08
102	9,65E+04
114	4,22E+04
126	8,54E+05

Установлено, что в дискордантном образце концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* самая низкая из всех исследованных образцов и составляет 6,52E+02 ГЭ/мл. Данная концентрация ДНК *C. trachomatis* лежит ниже границы аналитической чувствительности набора реагентов ХЛАМИ-ГЕН, что и объясняет получение отрицательного результата при исследовании с использованием этого набора.

Количественное определение ДНК *Chlamydia trachomatis* может быть полезно для различных клинико-лабораторных и научно-исследовательских целей, таких как уточнение диагноза при сомнительных/дискордантных результатах анализа, определении чувствительности различных методов диагностики, мониторинга эффективности терапии. Наконец, количественное определение возбудителя может иметь большое значение в выборе тактики этиотропной терапии, поскольку существуют основания полагать [Homer P. The case for further treatment studies of uncomplicated genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Infect.* 2006 Aug; 82(4): 340-343], что рецидив хламидийной инфекции, не связанный с вторичным инфицированием после проведенной антибактериальной терапии, вызван развитием гетеротипической устойчивости в результате высокой бактериальной нагрузки до начала лечения.

Перечень последовательностей

<110> ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ИНТЕРЛАБСЕРВИС"

<120> НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК CHLAMYDIA TRACHOMATIS И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

<160> 4

<210> 1

<211> 200

<212> ДНК

<213> CHLAMYDIA TRACHOMATIS

<400> 1

ttcgtaacic gctccggaaa aatggtggg ttaaggcaaa tgcgccgac gttctctcaa	60
gcaggactac aagctgcaat cccitttaar ataaccocgc acgltcctcg agcaaccgct	120
gtgacggagt acaaacgcct aggggtccta gactccgaca taatgaaggt cacrggacac	180
gcaaccgcaa agatgalatt	200

<210> 2

<211> 23

<212> ДНК

<213> CHLAMYDIA TRACHOMATIS

<400> 2

caagcaggac tacaagctgc aat	23
---------------------------	----

<210> 3

<211> 22

<212> ДНК

<213> CHLAMYDIA TRACHOMATIS

<400> 3

cctaggcgtt tgtactcctg ca	22
--------------------------	----

<210> 4

<211> 26

<212> ДНК

<213> CHLAMYDIA TRACHOMATIS

<400> 4

ccccgcacgt gcttcgagca accgog	26
------------------------------	----

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Набор реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце, включающий по меньшей мере два олигонуклеотидных праймера для полимеразной цепной реакции и при необходимости олигонуклеотидный зонд, термостабильную ДНК-полимеразу, буферный раствор для ПЦР, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, отличающийся тем, что первый олигонуклеотидный праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2, второй олигонуклеотидный праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3.

2. Набор реагентов по п.1, характеризующийся тем, что олигонуклеотидный зонд представляет собой олигонуклеотидный зонд для детекции ДНК *Chlamydia trachomatis* в режиме реального времени, где указанный зонд на 5'-конце содержит флуоресцентный краситель, на 3'-конце содержит гаситель флуоресценции.

3. Набор реагентов по п.2, характеризующийся тем, что указанный флуоресцентный краситель выбран из группы: JOE, FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5, HEX.

4. Набор реагентов по п.2, характеризующийся тем, что указанный гаситель флуоресценции выбран из группы: BHQ1, BHQ2, BHQ3, RTQ.

5. Набор реагентов по п.2, характеризующийся тем, что указанный олигонуклеотидный зонд имеет последовательность SEQ ID NO:4.

6. Набор реагентов по п.2, характеризующийся тем, что указанный олигонуклеотидный зонд представляет собой (FAM)-CCCCGCACGTGCTTCGAGCAACCGCG-(BHQ1).

7. Набор реагентов по п.2, характеризующийся тем, что указанный олигонуклеотидный зонд представляет собой (JOE)-CCCCGCACGTGCTTCGAGCAACCGCG-(BHQ1).

8. Набор реагентов по п.1, характеризующийся тем, что указанный образец выбран из группы: мазок из влагалища, моча, семенная жидкость, соскоб из уретры, соскоб из цервикального канала.

9. Применение набора реагентов по любому из пп.1-8 для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце методом полимеразной цепной реакции.

