

VYUŽITIE MULTIPLEXNEJ RT PCR V DIAGNOSTIKE MIKROBIONÁLNYCH PATOGÉNOV

Marianna Trebuňová^{1, 2}, Ivan Vanát¹, Zuzana Vaczy¹, Ján Rosocha¹, Ladislav Bobák¹,
Jozef Živčák²

¹Združená tkanivová banka UNLP Košice, Košice, Slovensko

²Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania SJF TU, Košice, Slovensko

Abstrakt

Cieľom príspevku je poukázať na potenciál využitia diagnostickej súpravy Anyplex™ STI-7 (Seegene, Južná Kórea), ktorá využíva technológiu multiplexnej real time PCR. Anyplex™ STI-7 umožňuje detegovať sedem najčastejších sexuálne prenosných patogénov naraz v jednej PCR reakcii. Jedná sa o šesť mikrobiálnych patogénov (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum*) a jeden protozoálny (*Trichomonas vaginalis*). Podľa údajov Európskych odporúčaní pre menežment negonokokových uretritíd z roku 2016 sú infekcie spôsobené *Chlamydia trachomatis* a *Mycoplasma genitalium* najčastejšie hlásenými sexuálne prenosnými ochoreniami. S použitím multiplexnej real time PCR Anyplex™ STI-7 sme zistili, že v našej skupine infertilných mužov bola *Ureaplasma parvum* najčastejšie detegovaným patogénom.

Kľúčové slová

multiplexná real time PCR, Anyplex™ STI-7, chlamýdie, mykoplazmy

Abstract

The aim of this paper is to show the potential of using a diagnostic kit Anyplex™ STI-7 (Seegene, South Korea), which uses technology to multiplex real time PCR. We can detect the seven of the most common sexually transmitted pathogens simultaneously in one PCR reaction with use Anyplex™ STI-7. These are the six microbial pathogens (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*) and the protozoan (*Trichomonas vaginalis*). According to the European Guidelines for management of non-gonococcal urethritis of 2016 are infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* most frequently reported sexually transmitted diseases. *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* are the most commonly reported sexually transmitted diseases. Using the multiplex real time PCR Anyplex™ STI-7, we found out that in our group of infertile men was *Ureaplasma parvum* most frequently detected pathogen.

Keywords

Multiplex real time PCR, Anyplex™ STI-7, Chlamydia, Mycoplasma

Úvod

Sexuálne prenosné infekcie sú príčinou neplodnosti v 35 % prípadov. Ich príčinou je široké spektrum vírusových, bakteriálnych a protozoálnych patogénov.

Podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie z roku 2012 pribudne denne vo vekovej skupine od 15 do 49 rokov 131 miliónov sexuálne prenosných ochorení zapríčinených *Chlamydia trachomatis*, 78 miliónov *Neisseria gonorrhoeae* a 142 miliónov *Trichomonas vaginalis* [1–4]. V Európe sú najčastejšie

hlásenými sexuálne prenosnými ochoreniami infekcie spôsobené *Chlamydia trachomatis* a *Mycoplasma genitalium* („Európske odporúčania pre menežment negonokokových uretritíd“, 2016) [4–10].

Pre efektívne riešenie neplodnosti je preto potrebné zaviesť komplexné vyšetrenie pacienta na najčastejšie sexuálne prenosné ochorenia. Z hľadiska laboratórnej diagnostiky sa javí ako najefektívnejší komplexný skrining pôvodcov sexuálne prenosných ochorení. Takúto možnosť ponúka súprava Anyplex™ STI-7 (Seegene, Južná Kórea), ktorá využíva technológiu

multiplexnej real time PCR. Anyplex™ STI-7 umožňuje detegovať sedem najčastejších sexuálne prenosných patogénov naraz v jednej PCR reakcii. Jedná sa o šesť mikrobiálnych patogénov (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum*) a jeden protozoálny (*Trichomonas vaginalis*).

Anyplex™ STI-7 a multiplexná real time PCR

Multiplexná real time PCR je vysoko citlivá metóda, ktorá využíva technológiu multiplikácie viacerých cieľových sekvencií genetického materiálu v jednej reakčnej skúmavke. V tomto procese sa využívajú viaceré páry primerov a optimalizované reakčné podmienky. Za posledné roky zaznamenala technológia výrazný rozvoj, ktorý umožnil jej použitie aj v oblastiach, ktoré vyžadujú vysokú presnosť, spoľahlivosť a reprodukovateľnosť. Jednou z nich je aj laboratórna diagnostika infekčných ochorení. Práve v tejto oblasti si metóda multiplexnej real time PCR nachádza široké uplatnenie. Umožňuje rýchlo a spoľahlivo vyšetrovať rôzne typy biologických vzoriek a detegovať v nich mikrobiálne, vírusové a protozoálne patogény. Rýchlosť a spoľahlivosť získanej informácie je hlavným benefitom tejto metódy. Okrem kvalitatívneho hodnotenia, mnohé multiplexné testy umožňujú aj semikvantitatívne hodnotenie a následne zahájiť cieľnú terapiu, sledovať priebeh a efektivitu liečby. V našom laboratóriu sme testovali možnosti využitia diagnostickej súpravy Anyplex™ STI-7 (Seegene, Južná Kórea), ktorá slúži na diagnostiku hlavných patogénov sexuálne prenosných ochorení. Súprava má CE -IVD certifikát a preto je vhodná pre použitie v klinickej diagnostike. Juhokórejská firma Seegene je inovátorom v oblasti technológie multiplexnej real time PCR.

Technológia systému

Diagnostické sety Anyplex™ sú založené na dvoch nových inovatívnych technológiách: technológii DPO™ a TOCE™ [11,12].

DPO™ technológia

Technológia využíva systém DPO primerov (*Dual Priming Oligonukleotide*), ktoré sú štrukturálne a funkčne odlišné od bežných primerov, pričom je blokovaná tvorba nešpecifických *templátov*, a tým sa dosahuje trvalo vysoká špecifickosť aj za menej optimálnych reakčných podmienok.

DPO™ sa skladá z dvoch samostatných základných *priming* častí (5'-koniec *stabilizátor* a 3'-koniec *určovateľ*), spojených pomocou polydeoxyinozinového *linkera* - spojovacieho mostíka. *Linker* má tvar bubliny, sám o sebe nie je zapojený do *primingu*, ale skôr vymedzuje hranice medzi 5'-koncom a 3'-koncom.

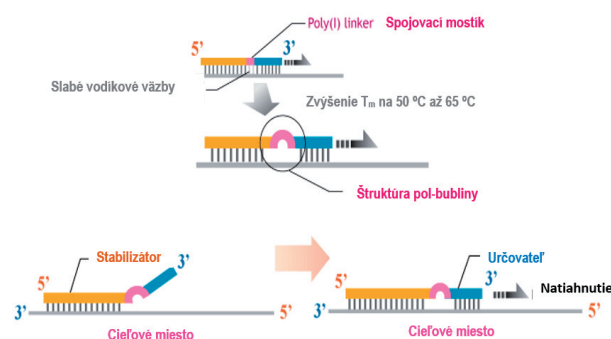
Princíp technológie

DPO™ má dva funkčné väzobné regióny, pričom jeden je dlhší ako druhý a sú oddelené *poly (I) linkerom*. Tieto dva nerovnako dlhé väzobné regióny vytvárajú dvojaké väzobné reakcie, v dôsledku čoho sa tvorí cieľovo špecifický produkt.

V prvom kroku nastáva aktivácia *Poly (I) linkera* deoxyinozínu, ktorý má v dôsledku slabších vodíkových väzieb pomerne nízku hodnotu teploty topenia (T_m). *Poly (I) linker* tvorí štruktúru bubliny pri určitej teplote topenia a oddelí 5'-koniec *stabilizátora* od 3'-konca *určovateľa* na samostatný *stabilizátor* a *určovateľ*.

V druhom kroku prebehne prvá *väzobná* reakcia. Dlhší 5'-koniec sa prednostne viaže na templátovú DNA a iniciuje stabilné naviazanie. Pôsobí ako *stabilizátor*.

V treťom kroku prebehne druhá *väzobná* reakcia: Krátky 3'-koniec sa selektívne viaže na cieľové miesto a je základom pre cieľovo špecifické predĺženie. Pôsobí ako *určovateľ*.



Obr. 1: Princíp DPO™ technológie [13].

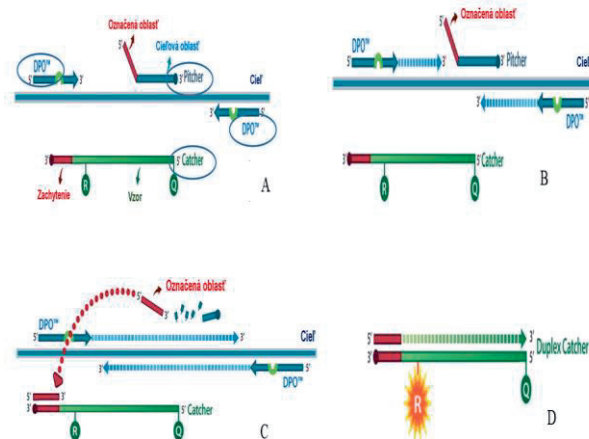
TOCE™ technológia

Technológia TOCE™ umožňuje multiplexnú detekciu hľadaných cieľových sekvencií DNA v jednej reakčnej skúmavke. Technológiou TOCE™ je možné realizovať kvalitatívny a zároveň aj semikvantitívny test. Je to umožnené vďaka dvom použitým analýzám: *Cyclic Catcher Melting Temperature Analysis* a *High Resolution Melting analysis*. Použitie technológií

DPO™ a TOCE™ v diagnostických súpravách posúva molekulárnu diagnostiku na novú, vyššiu úroveň.

Princíp technológie

Kľúčovými komponentmi TOCE™ technológie sú páry DPO™ primerov, *pitchers* a *catchers*. *Pitcher* je značkovací oligonukleotid, ktorý špecificky hybridizuje v cieľovej oblasti. *Catcher* je fluorescenčne značený templát.



Obr. 2: Princíp TOCE™ technológie. A: Primer a *pitcher* sa naviažu na cieľovú sekvenciu. B: Počas predĺženia je *pitcher* odstrihnutý DNA-polymerázou a označená oblasť je uvoľnená. C: Uvoľnená označená oblasť sa naviaže na *catcher*, ktorý má komplementárnu sekvenciu k uvoľnenej časti. D: Predĺženie označenej časti oddelí fluorescenčne značenú molekulu R od tzv. zhasiacej molekuly Q, čo sa prejaví vznikom signálu [14].

Hodnota teploty topenia *catcher-a* je závislá od dĺžky sekvencie. Táto vlastnosť slúži na vytváranie dostatočne odlišiteľných *templátov*. Pre optimalizáciu TOCE™ môžeme hodnotu teploty topenia *catcher-a* ľahko upraviť, nie je obmedzená na cieľové sekvencie. Detekčné limity diagnostickej súpravy Anyplex™ STI-7 za použitia technológie TOCE™ sú porovnateľné s výsledkami testov na báze single plex real time PCR.

Technológia TOCE™ umožňuje identifikovať viac cieľových analytov súčasne v jednom kanáli. Signál je meraný v reálnom čase a analyzovaný na základe teploty topenia (T_m) *catcher-a*, ktorá slúži na detekciu prítomnosti cieľového analytu.

Parametrizácia a vyhodnotenie

V Laboratóriu pre diagnostiku infertility a banke spermii Združenej tkanivovej banky Univerzitetnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach sme vyšetrili

v priebehu dvoch mesiacov 53 mužov (priemerný vek 31 rokov). Na izoláciu DNA boli použité dva typy vzoriek: ejakulát a moč. Odber biologického materiálu prebiehal v odberovej miestnosti za štandardných podmienok. Moč bol odoberaný v objeme 10-40 ml, vždy prvý prúd ranného moču. Skladovaný bol maximálne po dobu dvoch hodín, pri laboratórnej teplote a následne bol použitý na izoláciu DNA. Ejakulát bol odoberaný od pacientov po minimálne trojdňovej a maximálne sedemdňovej sexuálnej abstinencii do sterilnej nádoby. Následne prebiehalo jeho skvapalnenie v termostate po dobu 30 minút pri teplote 37°C. Vzorky ejakulátu boli použité na izoláciu DNA v časovom limite do 2 hodín od odberu. DNA bola izolovaná komerčnou súpravou od firmy QIAGEN: QIAamp DNA Mini kit. Izoláciu sme urobili podľa inštrukcií výrobcu s jedinou modifikáciou, keď sme predĺžili čas lýzy na 60 min [15]. Kvalita a koncentrácia izolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky systémom NanoDrop. Na multiplexnú real time PCR sme použili prístroj od firmy BIO-RAD CFX 96 Real Time PCR System, verzia softwaru 2.0.5 a súpravu Anyplex™ STI-7 (Seegene, Južná Kórea). Súprava Anyplex™ STI-7 umožňuje detegovať sedem hlavných patogénov sexuálne prenosných infekcií v jednej PCR reakcii. Na obsluhu prístroja a definovanie reakčných podmienok sme použili program Bio-Rad CFX Manager IVD Editor 1.6 a na kvalitatívne a semikvantitatívne vyhodnotenie výsledkov sme použili program Seegene Viewer (Obr. 3).

U 6-tich mužov sme vzorku DNA získali súbežne z ejakulátu a moču (100% zhoda výsledkov). U 5-tich mužov z tejto prvej vyšetrenej skupiny neboli potvrdené patogény. U jedného muža bola potvrdená kombinovaná infekcia *Ureaplasma parvum* (+) a *Mycoplasma hominis* (+). Zvyšnú skupinu tvorilo 47 mužov, kde sme vzorku DNA získali len z ejakulátu. U siedmich mužov v ejakuláte sme identifikovali *Ureaplasma parvum* (++) a u jedného *Ureaplasma urealyticum* (+). Vzorky ejakulátu 39 mužov z druhej vyšetrenej skupiny boli negatívne.

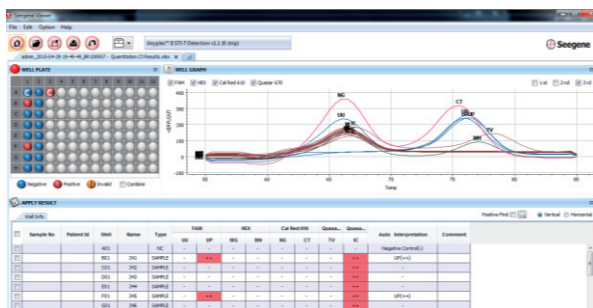
Diskusia a záver

Uvedenou metódou sme otestovali 53 vzoriek DNA izolovanej z moču a ejakulátu. Jedným zo zámerov testovania bolo zistiť využiteľnosť súpravy Anyplex™ STI-7 pre diagnostiku sexuálne prenosných ochorení z ejakulátu. Uvedený typ vzoriek sme testovali pre jednoduchosť prístupu k vzorkám, v Laboratóriu pre diagnostiku infertility sú vyšetřované spermioqramy infertilných mužov. Vzhľadom na odporúčania autorít vyšetřovať prvý prúd moču a/alebo výter z uretry metódami amplifikácie nukleových kyselín sme u niekoľkých pacientov porovnali výsledky vyšetření vzoriek ejakulátu a moču.

Optimalizáciou podmienok izolácie DNA z ejakulátu sme docielili využiteľnosť súpravy Anyplex™ STI-7 aj

pre dôkaz vybraných sexuálne prenosných patogénov v ejakuláte. Úspešnosť optimalizácie bola potvrdená spektrofotometrickým sledovaním výťažnosti a kvality DNA. Benefitom súpravy AnyplexTM STI-7 je interná kontrola kvality, ktorá slúži na kontrolu kvality izolácie DNA a možnosť vplyvu inhibičných látok na amplifikáciu DNA. Tým sa zároveň vylúčia falošne negatívne výsledky vyšetrenia.

Test je vhodný pre rýchlu laboratórnu diagnostiku sexuálne prenosných ochorení, umožňuje získať výsledok v deň odberu vzorky.



Obr. 3: Kvalitatívne a semikvantitatívne vyhodnotenie programom Seegene Viewer. UU - *Ureaplasma urealyticum*, UP - *Ureaplasma parvum*, MG - *Mycoplasma genitalium*, MH - *Mycoplasma hominis*, NG - *Neisseria gonorrhoeae*, CT - *Chlamydia trachomatis*, TV - *Trichomonas vaginalis*, IC – interná kontrola.

Môžeme konštatovať, že multiplexná real time PCR je vysoko citlivá metóda vhodná na skrining a diagnostiku sexuálne prenosných infekcií. Použitie in vitro diagnostických súprav AnyplexTM STI-7 umožňuje súčasnú detekciu siedmich patogénov sexuálne prenosných ochorení v jednej PCR reakcii, čím sa stáva diagnostika jednoduchšou a finančne efektívnejšou. V prípade potreby je možné získať finálne výsledky do siedmich hodín. Diagnostická súprava AnyplexTM STI-7 a použitý real time PCR systém CFX 96 spĺňa kritéria CE-IVD.

Podakovanie

Práca bola podporená výzkumným grantom Vega č. 1/0515/13.

Literatúra

- [1] Maruška, M.; Darja, K.; Jovan, M.; Mojca, M.: Clinical role of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* presence in female lower urogenital tract: is there a place for routine screening and treatment?. *Zdrav. Vestn.* 2014, 83: 629–637.
- [2] WHO Sexually transmitted infections. World Health Organization 2013; Available November 15, 2013 from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>.

- [3] World Health Organisation. Sixty-ninth World Health Assembly, document WHA69/2016/REC/1, GLOBAL HEALTH SECTOR STRATEGY ON SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS 2016–2021, TOWARDS ENDING STIs, June 2016, 64 pp.
- [4] Horner, P.J.; Blee, K.; Falk, L.; van der Meijden, W.; Moi, H.: European Guideline on the management of non-gonococcal urethritis. 2016, 26 pp.
- [5] Holmes, K.K.; Stamm, W.E.; Sobel, J.D.: Lower genital tract infection syndromes in women. In: Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN, Corey L, et al, eds. *Sexually transmitted diseases. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 987–1016.*
- [6] Povlsen, K.; Bjornelius, E.; Lidbrink, P.; Lind, I.: Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 to nongonococcal urethritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 97–101.
- [7] Deguchi, T.; Yoshida, T.; Miyazawa, T.; Yasuda, M.; Tamaki, M.; Ishiko, H., et al.: Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis* 2004; 31: 192–5.
- [8] Couldwell, D.L.; Gidding, H.F.; Freedman, E.V.; McKechnie, M.L.; Biggs, K.; Sintchenko, V., et al.: *Ureaplasma urealyticum* is significantly associated with non-gonococcal urethritis in heterosexual Sydney men. *Int J STD AIDS* 2010; 21: 337–41.
- [9] Ondondo, R.O.; Whittington, W.L.; Astete, S.G.; Totten, P.A.: Differential association of *ureaplasma* species with non-gonococcal urethritis in heterosexual men. *Sex Transm Infect* 2010; 86: 271–5.
- [10] Maeda, S.; Deguchi, T.; Ishiko, H.; Matsumoto, T.; Naito, S.; Kumon, H., et al.: Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter plate hybridization. *Int J Urol* 2004; 11: 750–4.
- [11] Chun, J. Y.: Multiplex molecular diagnostics: shifting the paradigm. In: *Medical laboratory observed.* 2012; Seegene bulletin, Vol.1.
- [12] Choe, H. S.; Lee, D. S. et al.: Performance of AnyplexTM II multiplex RT PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *IJID.* 17(12): 1134-1140. 2013. ISSN 1201-9712.
- [13] DPOTM Technology. Novel Oligo platformo f super multiplex PCR. URL: http://seegene.com/neo/en/introduction/core_dpo.php
- [14] TOCETM Technology. The New Paradigm for High multiplex Real/time PCR. URL: http://seegene.com/neo/en/introduction/core_toce.php
- [15] Kweon, O.J.; Lim, Y.K.; Oh, S.M.; Kim, T.H.; Choe, H.S.; Lee, S.J.; Cho, Y.H.; Lee, M.K.: Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in Individuals With or Without Symptoms of Genitourinary Infections. *Lab Med Online.* 2016 Apr;6(2):79-87. URL: <https://doi.org/10.3343/lmo.2016.6.2.79>.

Dr.h.c. prof. Ing. Jozef Živčák, Ph.D.
Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania
Strojnícka fakulta
Technická univerzita v Košiciach
Letná 9, SK-042 00 Košice

E-mail: jozef.zivcak@tuke.sk
Phone: +421 556 022 381