

METODY OPARTE NA AMPLIFIKACJI  
KWASÓW NUKLEINOWYCH W DIAGNOSTYCE WYBRANYCH  
CHORÓB PRZENOSZONYCH DROGĄ PŁCIOWĄBeata Młynarczyk-Bonikowska<sup>1\*</sup>, Ewa Skulska<sup>1</sup>, Magdalena Malejczyk<sup>1</sup>, Sławomir Majewski<sup>2</sup><sup>1</sup>Zakład Diagnostyki Chorób Przenoszonych Drogą Płciową Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego<sup>2</sup>Klinika Dermatologii i Wenerologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wpłynęło w listopadzie 2014 r.

1. Wstęp. 2. Metoda PCR i jej modyfikacje, które znalazły zastosowanie w diagnostyce STI. 3. Opryszczka narządów płciowych. 4. Zakażenia genitalnymi HPV. 5. Rzeżączka. 6. Zakażenia *Chlamydia trachomatis*. 7. Kiła. 8. Równoczesne wykrywanie kilku patogenów. 9. Podsumowanie

**Nucleic acid amplification methods in laboratory diagnostics of selected sexually transmitted diseases**

**Abstract:** Sexually transmitted diseases (STDs) are common in the world's human population and are often asymptomatic. On the other hand, STDs are highly infective and connected with considerable morbidity and mortality. Therefore, using fast, sensitive and specific diagnostic methods is especially important. Polymerase chain reaction – PCR, invented thirty years ago by the Nobel prize winner Carry Mullis, revolutionized many fields of biological sciences, including laboratory diagnostics of infectious diseases. In this review, we discuss the application of nucleic acid amplification techniques (NAATs), including PCR, multiplex PCR, real time PCR and HDA-helicase dependent amplification, in the laboratory diagnostics of sexually transmitted diseases. Nucleic acids amplification tests are widely used in diagnostics of some STD-like genital herpes, *Chlamydia trachomatis* infection and gonorrhoea. In other diseases, like genital HPV infections, NAATs are used only in some indications. In the case of syphilis, there are no commercial tests and it was proven that NAATs are not sensitive and specific enough to be used routinely as a substitute to serologic methods. We compare NAATs with some other methods used in laboratory diagnostics of individual diseases, like serology, culture or direct immunofluorescence. In addition, we discuss limitations of the NAATs i.e. problems with their specificity in diagnostics of pharyngeal gonorrhoea. We also present the recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and International Union Against Sexually Transmitted Diseases (IUSTI).

1. Introduction. 2. PCR method and its modifications which can be applied in diagnostics of STIs. 3. Genital herpes. 4. Infections with genital HPVs. 5. Gonorrhoea. 6. Chlamydia trachomatis infections. 7. Syphilis. 8. Simultaneous detection of several pathogens. 9. Summary

**Słowa kluczowe:** choroby przenoszone drogą płciową, kiła, NAATs, opryszczka narządów płciowych, rzeżączka, zakażenia genitalnymi HPV, zakażenia *Chlamydia trachomatis*

**Key words:** *Chlamydia trachomatis* infection, genital herpes, genital HPV infection, gonorrhoea, NAATs, sexually transmitted diseases, syphilis

**1. Wstęp**

Choroby przenoszone drogą płciową są jednymi z najczęstszych chorób zakaźnych występujących w światowej populacji. Nierzadko są bezobjawowe, a z drugiej strony zwykle charakteryzują się dużą zakaźnością i mogą być istotną przyczyną śmiertelności i chorobowości. Mogą być przyczyną bezpłodności, a także przenosić się wewnątrzmacicznie i/lub okołoporodowo na płód i noworodka.

Od czasu, gdy w 1983 Kary Mullis, późniejszy laureat nagrody Nobla, opracował metodę łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR, minęło już ponad trzydzieści lat. Obecnie trudno wyobrazić sobie funkcjonowanie wielu dziedzin, w tym diagnostyki chorób zakaźnych,

bez metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych (NAATs-nucleic acid associated techniques) [33].

Istnieje ponad 30 patogenów, które mogą przenosić się drogą kontaktów seksualnych. W pracy omówiono zastosowanie NAATs w tym PCR, multiplex PCR, real time PCR oraz HDA (helicase dependent amplification) w diagnostyce najczęściej występujących w Polsce chorób przenoszonych drogą płciową, takich jak zakażenia genitalnymi HPV, opryszczka narządów płciowych, zakażenie *Chlamydia trachomatis*, rzeżączka i kiła. Diagnostyka niektórych z tych chorób np. zakażeń *C. trachomatis*, rzeżączki czy opryszczki narządów płciowych wiąże się z szerokim zastosowaniem NAATs. W przypadku innych np. zakażeń genitalnymi typami wirusów brodawczaka ludzkiego (*Human papillomavirus*

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Koszykowa 82a, 02-008 Warszawa; tel.: 22 5021313; beata.mlynarczyk@wum.edu.pl

– HPV) – NAATs mogą być wykorzystywane w pewnych, konkretnych wskazaniach. W innych chorobach przenoszonych drogą płciową takich jak kiła, NAATs wciąż nie znalazły komercyjnego zastosowania.

Przedstawiono również najważniejsze zalecenia IUSTI (International Union Against Sexually Transmitted Infections) i CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dotyczące udziału metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce chorób przenoszonych drogą płciową.

Praca nie obejmuje zakażeń HIV, jako że jest to obszerny temat, który wymagałby odrębnego opracowania.

## 2. Metoda PCR i jej modyfikacje, które znalazły zastosowanie w diagnostyce STI

PCR jest bardzo czułą metodą pozwalającą na wykrycie dowolnego fragmentu DNA (np. charakterystycznego dla danego patogenu) w badanym (np. wyizolowanym z materiału pobranego od chorego) materiale biologicznym. W reakcji, poza badanym (matrycowym) DNA uczestniczą tzw. primery (startery – krótkie fragmenty DNA komplementarne do sekwencji znajdujących się na początku i końcu poszukiwanego genu), mieszanka nukleotydów oraz oporna na podgrzewanie polimeraza DNA. Pierwszym do tego celu użytym enzymem była, obecnie wciąż stosowana, polimeraza Taq pochodząca od żyjących w gorących źródłach bakterii *Thermus aquaticus*. Obecnie stosuje się również inne polimerazy [26, 33].

Poszczególne etapy reakcji powtarzają się cyklicznie i zachodzą w różnych temperaturach. W celu uzyskania możliwie największej liczby kopii powielanego odcinka DNA wykonuje się zazwyczaj 30–40 cykli. Ponieważ jako matryce do reakcji wykorzystywane są wszystkie dotychczas zsyntetyzowane cząsteczki genu – nici DNA, amplifikacja przebiega coraz szybciej, w postępie geometrycznym. W klasycznym PCR zwielokrotniony fragment DNA jest następnie wykrywany za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym (wybarwiony bromkiem etydyny fragment DNA świeci w świetle UV) lub przy użyciu metod immunodetekcji z wykorzystaniem reakcji hybrydyzacji (powstałe amplikony hybrydują z sondami na zasadzie komplementarności zasad w DNA) i metody ELISA (utworzone hybrydy wykrywane są w reakcji immunoenzymatycznej) [26].

Obecnie dążenie do skrócenia i uproszczenia PCR doprowadziło do powstania wielu modyfikacji klasycznej metody. Coraz szerzej stosowana jest, opisana w 1992 przez Higuchi i wsp. metoda real time PCR, w której do środowiska reakcji wprowadza się znakowane barwnikami fluorescencyjnymi sondy molekularne, komplementarne do powielanej sekwencji lub barwniki wbudowujące się do dwuniciowego DNA,

co pozwala na śledzenie w czasie rzeczywistym ilości produktu powstającego w kolejnych cyklach. Dzięki temu wynik testu można odczytać w trakcie amplifikacji, a etap elektroforezy został wyeliminowany [9, 21]. Powstały również szybkie testy oparte na amplifikacji zależnej od helikazy (HDA – helicase dependent amplification), w których amplifikacja DNA może odbywać się w stałej temperaturze [22]. Metoda oparta na równoczesnym wykrywaniu kilku fragmentów DNA to tzw. multiplex PCR. Można w ten sposób wykrywać kilka patogenów równocześnie lub zwiększyć czułość i swoistość wykrywania pojedynczego drobnoustroju. Ważne jest odpowiednie dobranie starterów – muszą one mieć podobną długość, zbliżone temperatury reakcji i być swoiste dla poszukiwanego patogenu w celu uniknięcia reakcji krzyżowych [11].

## 3. Opryszczka narządów płciowych

Opryszczka narządów płciowych przenosi się praktycznie wyłącznie przez kontakty seksualne a czynnikiem wywołującym jest ludzki herpeswirus (*Human herpesvirus* – HHV2) lub rzadziej HHV1. Dawna, zwyczajowa nazwa tych patogenów to wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex virus – HSV) typ 1 i 2 [30]. Około 20% światowej populacji (10–60% w różnych subpopulacjach) ma przeciwciała przeciw HHV2. Zakażenie HHV jest najczęstszą przyczyną owrzodzeń na narządach płciowych. Około 20% wszystkich zakażeń wiąże się z okresowym występowaniem typowych objawów klinicznych w postaci bolesnych pęcherzyków na podłożu rumieniowym w okolicy anogenitalnej. Pozostałe przypadki to zakażenia o nietypowym przebiegu, subkliniczne lub bezobjawowe. Głównym problemem jest pozostawanie wirusa w organizmie osoby zakażonej do końca życia, co wiąże się z możliwością wystąpienia objawowych nawrotów oraz z ryzykiem zakażenia partnera seksualnego i odmatczywego zakażenia noworodka. Wykazano znaczny wpływ współistnienia opryszki narządów płciowych na zwiększenie ryzyka transmisji zakażenia HIV. Zakażenie HHV, dotyczące narządów płciowych, jest również dodatkowym czynnikiem ryzyka wystąpienia raka szyjki macicy u kobiet zakażonych onkogennymi typami HPV [19, 31]. Na podstawie objawów klinicznych nie można jednoznacznie odróżnić zakażenia HHV1 od HHV2 i nie zawsze można odróżnić zakażenie pierwotne od nawrotowego [19].

W diagnostyce laboratoryjnej zakażeń HHV okolicy genitalnej najważniejszą rolę odgrywają badania oparte na poszukiwaniu wirusów w materiale od pacjentów, podczas gdy serologia ma znaczenie uzupełniające i jest wskazana tylko w niektórych przypadkach (np. badania epidemiologiczne lub badania bezobjawowych partne-

rów osób zakażonych) [4, 10, 37]. IUSTI i CDC zalecają poszukiwanie wirusów metodą PCR (IUSTI zaleca real time PCR) u wszystkich chorych ze zmianami na narządach płciowych podejrzanych o zakażenie HHV. Jako metoda alternatywna wymieniana jest hodowla z ustaleniem typu HHV (1 lub 2) metodą immunoenzymatyczną. PCR jest wskazana na pierwszym miejscu jako metoda czulsza, łatwiejsza w wykonaniu i szybsza. Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych są również mniej wymagające jeśli chodzi o transport i przechowywanie próbek niż hodowla wirusa, ponieważ wykrywają także HHV niezdolne do replikacji. Pomimo, że NAATs są metodami mogącymi wykryć bezobjawowy wysiew wirusa rutynowe badania w tym kierunku nie są zalecane ze względu na trudności z uchwyceniem tego nieciągłego zjawiska [4, 10, 37].

NAATs są stosowane w diagnostyce opryszczki przez wiele laboratoriów. Najczęściej poszukuje się genów kodujących glikoproteiny otoczki wirusa (tj. gG lub gB) [5, 13]. Ich sekwencja pozwala na odróżnienie HHV1 od HHV2. Większość laboratoriów stosuje samodzielnie opracowane testy, które charakteryzują się nierzadko wysoką, ale różniącą się w różnych ośrodkach czułością i swoistością [1, 40]. Bardziej porównywalne są wyniki testów komercyjnych. Dostępny jest między innymi komercyjny test real time PCR (ostatnio zatwierdzony przez FDA) BD ProbeTec HSV Qx (HSVQx) [45], a od niedawna także test oparty na amplifikacji zależnej od helikazy (HDA helicase dependent amplification-IsoAmp<sup>®</sup> HSV Assay), w którym reakcja odbywa się w stałej temperaturze, co znacznie obniża koszty [22]. Oba testy są czulsze niż stanowiąca wcześniej „złoty standard” hodowla wirusa (ELVIS<sup>®</sup> HSV ID/typing (shell-vial culture and DFA) (według różnych badań o 11–71%), odznaczają się wysoką swoistością, a wyniki z różnych laboratoriów są porównywalne [29].

#### 4. Zakażenia genitalnymi HPV

Zakażenia genitalnymi wirusami brodawczaka ludzkiego (*Human papillomavirus* – HPV) są uważane za najczęstszą chorobę przenoszoną drogą płciową. Zmiany kliniczne powodowane przez te wirusy dotyczą około 1% aktywnej seksualnie populacji, a znacznie wyższy odsetek ma zakażenie subkliniczne lub bezobjawowe. HPV niskiego ryzyka powodują kłykciny kończyste, kłykciny olbrzymie oraz większość przypadków brodawczaków krtani, a HPV wysokiego ryzyka stany przednowotworowe i raki szyjki macicy (prawie 100%) oraz okolicy anogenitalnej (50–85%), w mniejszym stopniu także głowy i szyi [14, 43, 48, 50].

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń HPV opiera się głównie na poszukiwaniu materiału genetycznego

wirusa metodą hybrydyzacji lub PCR, w obu metodach z wykonaniem genotypowania, czyli określeniem typu wirusa wykrytego w badanym materiale. Wykrycie konkretnego typu wirusa pozwala na ustalenie czy infekcja ma charakter przetrwały, czyli czy ten sam typ HPV (szczególnie HR – high risk – wysokiego ryzyka) jest wykrywany w dwóch badaniach wykonanych w ciągu pół roku do roku. Stwierdzenie występowania infekcji przetrwałej oznacza, że w 45% przypadków nastąpi w ciągu 5 lat rozwój zmian typu CIN 2/3 (cervical intraepithelial neoplasia – śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy) [3, 7, 12, 42]. Znaczenie ma również wykrywanie transkryptów mRNA dla wirusowych białek E6/E7, uczestniczących w onkogenezie, związanej z zakażeniami HPV. Obecność mRNA dla tych białek wyraźnie sugeruje przetrwałą infekcję u pacjentki. Ze względu na to, że HPV mogą przebywać na błonach śluzowych narządów płciowych nie wywołując żadnych objawów klinicznych, a następnie być eliminowane przez układ odpornościowy osoby zakażonej, wyniki badań w kierunku zakażenia różnymi typami HPV należy interpretować wyłącznie razem z obrazem klinicznym oraz wynikami cytologii lub badania histopatologicznego [4, 49].

CDC zaleca wykonywanie typowania genetycznego HPV u kobiet > 25 roku życia z wynikiem cytologii ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance – atypowe komórki nabłonkowe nieokreślonego znaczenia), oraz u kobiet w wieku 30–65 lat jako badania przesiewowego wykonywanego równocześnie z cytologią. W przypadku ujemnego wyniku obu testów zalecane jest powtórzenie badań przesiewowych po 5 latach. Alternatywnie można w tej grupie wiekowej wykonywać przesiewowo samą cytologię raz na 3 lata. Typowanie HPV nie jest zalecane u kobiet < 25 roku życia, raczej nie powinno również być wykonywane samodzielnie jako badanie przesiewowe. U kobiet między 21 a 30 rokiem życia jako badanie przesiewowe zalecana jest cytologia wykonywana co 3 lata, a u kobiet młodszych niż 21 lat CDC nie zaleca badań przesiewowych. Powyższe zalecenia wynikają z faktu, że u bardzo młodych kobiet zakażenie HPV wysokiego ryzyka jest częstsze niż w późniejszym wieku, a jednocześnie zwykle nie ma żadnych konsekwencji klinicznych (wirusy są eliminowane) [4]. Według zaleceń IUSTI i CDC nie ma wskazań do badania w kierunku typu HPV u chorych z typowymi klinicznie kłykcynami kończystymi ani u partnerów kobiet ze stwierdzonym zakażeniem HPV [4, 23].

Praca porównująca 3 komercyjne testy: oparty na hybrydyzacji DNA Hybrid Capture 2 oraz wykorzystujące metodę real time PCR: Abbott Real Time High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas wykazała, że HPV HC2 jest metodą czulszą (96,6%), ale mniej swoistą (89,1%) niż metody oparte na real

time w wykrywaniu HPV wysokiego ryzyka. Badane metody Real Time HR i Cobas HPV wykazały odpowiednio czułość 78,3% i 91,7% oraz swoistość 99,2% i 97% [3]. Inne badania porównują INNO-LiPA HPV genotyping extra assay z multiplex PCR dla różnych typów onkogennych HPV. Oba badania wykazują się wysoką swoistością i czułością (nieznacznie czulszy okazał się real time PCR) [12].

Dostępne są również komercyjne testy pozwalające na wykrywanie transkryptów mRNA dla białek E6/E7 HPV wysokiego ryzyka. Do takich testów należą np. NucliSENS EasyQ®, pozwalający na wykrycie mRNA 5 najczęstszych typów HPV-16, 18, 31, 33, 45 oraz Aptima HPV test dla HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, i 68. Badania porównujące powyższe testy i HPV HC2 wykazały, że testy Aptima HPV i HPV HC2 mają zbliżoną czułość, przy niższej czułości NucliSENS EasyQ®. Swoistość zarówno Aptima HPV i NucliSENS EasyQ® w wykrywaniu i przewidywaniu pojawienia się zmian na szyjce macicy wywołanych przez onkogenne HPV była wyższa niż HPV HC2 [35, 38]. Testy o wyższej swoistości, szczególnie testy wykrywające RNA dla E6/7 HPV wysokiego ryzyka prawdopodobnie mogłyby prawdopodobnie znaleźć zastosowanie w diagnostyce przesiewowej u kobiet po 30 roku życia jako samodzielne badania bez równoczesnego wykonywania cytologii, jednak wciąż nie znalazło to odzwierciedlenia w oficjalnych zaleceniach.

Testy, które nie pozwalają na wykrycie konkretnego typu HPV, a w których wykrywane są łącznie typy onkogenne i nieonkogenne lub podgrupy w obrębie tych grup, nie mają oczekiwanego znaczenia diagnostycznego – nie pozwalają na wykrycie infekcji przetrwałej. Większość producentów podaje, że testy służą do badania wymazów z kanału szyjki macicy, co stawia pod pewnym znakiem zapytania czułość i swoistość badań pobranych z innych lokalizacji tj. cewka moczowa czy odbytu lub materiał biopsyjny. Istnieją również liczne testy opracowane przez laboratoria, często pozwalające na badanie materiału innego niż wymaz z szyjki macicy i/lub dokładne typowanie wirusów [39, 41].

## 5. Rzeżączka

Zakażenie *Neisseria gonorrhoeae* jest drugą, biorąc pod uwagę częstość występowania, bakteryjną chorobą przenoszoną drogą płciową po zakażeniu *C. trachomatis* i pierwszą pod względem liczby nowych przypadków. Według danych WHO globalna liczba przypadków rzeżączki w 2008 roku wynosiła ponad 106 milionów i przekroczyła liczbę przypadków zakażeń *C. trachomatis* w tym samym roku [46].

Zakażenie *N. gonorrhoeae* jest przyczyną zapalenia cewki moczowej, zapalenia szyjki macicy, zapalenia

odbytu i zapalenia gardła. Noworodki zakażone okołoporodowo mają objawy ciężkiego zapalenia spojówek. Nieleczona rzeżączka może prowadzić m.in. do zapalenia najądrza u mężczyzn, stanów zapalnych narządów miednicy mniejszej i ciąży pozamacicznych u kobiet oraz do bezpłodności u obu płci [47].

NAATs są obok hodowli metodą zalecaną przez IUSTI i CDC w diagnostyce zakażeń *N. gonorrhoeae*. Według IUSTI optymalne jest stosowanie obu metod równoległe. CDC zaleca w pierwszej kolejności NAATs, a w przypadku ponownego wykrycia patogenu 7 dni po leczeniu (podejrzanie niepowodzenia w leczeniu) wykonanie hodowli i określenie lekowrażliwości [36]. Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych odznaczają się zwykle wysoką czułością, co umożliwia wykrywanie nawet niewielkiej liczby bakterii np. w moczu lub wymazie z pochwy, podczas gdy w przypadku hodowli konieczne jest bardziej precyzyjne pobranie materiału (w przypadku typowej lokalizacji – wymaz z szyjki macicy i cewki moczowej u kobiet oraz z cewki moczowej u mężczyzn). Hodowla jest również metodą bardziej wymagającą jeśli chodzi o transport i przechowywanie pobranych próbek. Z drugiej strony NAATs, w przeciwieństwie do hodowli, nie pozwalają na łatwe oznaczenie wrażliwości *N. gonorrhoeae* na antybiotyki. Biorąc pod uwagę rosnącą oporność dwoinek rzeżączki na stosowane leki, również w Polsce, możliwość taka może mieć duże znaczenie [2, 4, 6, 32].

Innym problemem jest swoistość NAATs. W jednym z badań porównano czułość i swoistość sześciu komercyjnie dostępnych testów opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych: Gen-Probe APTIMA COMBO 2, APTIMA GC, Roche COBAS AmpliCor CT/NG, COBAS 4800 CT/NG testy, BD ProbeTec GC Qx amplified DNA assay i Abbott RealTime CT/NG. Zbadano 450 izolatów, w tym 234 dwoinek rzeżączki, a pozostałe innych gatunków należących do rodzaju *Neisseria* lub innych zbliżonych genetycznie bakterii. Jak można było przewidzieć, niemal wszystkie testy (oprócz COBAS AmpliCor CT/NG, który nie wykrył 1.9% próbek) odznaczały się 100% czułością. Jednak wszystkie testy dawały pewien odsetek wyników fałszywie pozytywnych w przypadku badania izolatów innych niż dwoinki rzeżączki. Wyniki te były różne w przypadku różnych testów i wynosiły odpowiednio 14.1%, 11%, 2,1%, 1,7%, 1% i 1% dla COBAS AmpliCor, ProbeTec, APTIMA COMBO 2, APTIMA GC, Abbott RealTime i Roche COBAS 4800. Autorzy pracy zalecają dodatkowe badania potwierdzające w przypadku wykrycia *N. gonorrhoeae* metodami opartymi o amplifikację kwasów nukleinowych, szczególnie jeśli próbki pochodzą z okolic innych niż narządy płciowe np. z gardła (wysokie ryzyko występowania gatunków należących do rodzaju *Neisseria*, innych niż *N. gonorrhoeae*) [44].

## 6. Zakażenia *Chlamydia trachomatis*

Zakażenie okulogenitalnymi typami *C. trachomatis* jest najczęstszą bakteryjną chorobą przenoszoną drogą płciową. Podobnie jak dwoinki rzeżączki, *C. trachomatis* wywołuje zapalenie cewki moczowej, szyjki macicy, odbytu i gardła. Często osoby zakażone, szczególnie kobiety (ok. 70–90%) oraz mężczyźni homo- i biseksualiści z zapaleniem odbytu lub gardła, nie zauważają żadnych objawów klinicznych. Okołoporodowe zakażenie noworodka może wiązać się z zapaleniem płuc i zapaleniem spojówek. Wśród powikłań należy wymienić zapalenie najądrza u mężczyzn, stany zapalne narządów miednicy mniejszej u kobiet oraz bezpłodność u obu płci. Ponadto u osób zakażonych *C. trachomatis* może wystąpić tzw. zespół Reitera. Współistnienie zakażenia *C. trachomatis* zwiększa ryzyko wystąpienia raka szyjki macicy u kobiet zakażonych onkogennymi HPV [46, 47].

NAATs odgrywają ważną rolę w diagnostyce zakażeń *C. trachomatis* i są jedyną metodą zalecaną przez IUSTI i CDC. CDC podkreśla konieczność zachowania możliwości prowadzenia hodowli przez niektóre laboratoria [4, 24, 36]. Za stosowaniem metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych przemawia ich wysoka czułość, pozwalająca na wykrywanie patogenu w próbkach moczu u mężczyzn i samodzielnie pobranym wymazie z pochwy u kobiet (podczas gdy w przypadku immunofluorescencji konieczne są wymazy z cewki moczowej lub szyjki macicy). Również w przypadku materiału pobranego z nietypowych miejsc np. odbytu czy gardła czułość PCR jest znacznie wyższa niż innych metod. NAATs mają jednak również pewne ograniczenia. Na podstawie standardowych testów zwykle trudno jest odróżnić zakażenie okulogenitalnymi typami *C. trachomatis* od zakażenia typami powodującymi ziarnicę weneryczną pachwin. To ostatnie zakażenie może zdarzyć się zwłaszcza u MSM (men having sex with men) i w przypadku jego podejrzenia zalecane jest genotypowanie. W przypadku kobiet wymazy są lepszym materiałem niż próbki moczu, ponieważ obecne w moczu czynniki hamujące mogą być przyczyną wyników fałszywie ujemnych [4, 6, 24, 25].

Dostępne są liczne testy komercyjne oraz opracowane przez laboratoria. Większość komercyjnie stosowanych testów jest oparta na wykrywaniu sekwencji w obrębie plazmidu lub chromosomalnego genu dla MOMP (major outer membrane proteine – główne białko błony zewnętrznej). Opisano szczepy *C. trachomatis*, które nie posiadają plazmidu, a także szczepy z delecją 377 par zasad w obrębie plazmidu, obejmującą fragment badany za pomocą komercyjnych testów – tzw. wariant szwedzki i oba przypadki nie będą wykrywane przez niektóre NAATs [27].

Wciąż poszukiwana jest czuła, swoista i szybka metoda wykrywania zakażeń *C. trachomatis*. Ciekawym

rozwiązaniem wydaje się niedawno opisany test multiplex PCR wykrywający 9 różnych loci w genomie *C. trachomatis*. Procedura od pobrania materiału do uzyskania wyniku trwa ok. 1 godziny. W badaniu dotyczącym materiału pobranego z szyjki macicy od 263 kobiet z wysokim ryzykiem zakażenia, wykazano wysoką czułość i swoistość tej metody w porównaniu z komercyjnym testem Roche Amplicor NAAT. W odniesieniu do bardzo czułej i swoistej, ale komercyjnie nie stosowanej metody sekwencjonowania genów, czułość wynosiła 91,5% i 62,3%, a swoistość 100% i 95, 9% odpowiednio dla multiplex PCR i Amplicor NAATs [8].

## 7. Kiła

Kiła jest ogólnoustrojową chorobą przenoszoną drogą płciową wywołowaną przez krętki blade – *Treponema pallidum*. Według szacunkowych danych WHO liczba zakażeń na świecie w 2008 r. wynosiła 10,6 mln. W diagnostyce kiły najważniejszą rolę odgrywają metody serologiczne oparte na badaniach przeciwciał przeciwkrętkowych we krwi chorych. W badaniach przesiewowych wykorzystuje się najczęściej odczynny tzw. niekrętkowe, takie jak VDRL (Venereal Disease Research Laboratory),USR (unheated serum reagin test) lub RPR (rapid plasma reagin). Ich dodatni wynik bywa czasem nieswoisty i zawsze powinien być potwierdzony przez odczynny z antygenami krętkowymi, takimi jak FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test, test immunofluorescencji z absorpcją przeciwciał przeciw krętkom saprofitycznym), ilościowe FTA, odczyn hemaglutynacji biernej (TPHA) lub odczynny immunoenzymatyczny [4, 15].

Poszukiwanie antygeny (krętków lub ich materiału genetycznego) może mieć znaczenie w przypadku występowania zmian klinicznych, z których można pobrać materiał, szczególnie we wczesnym okresie choroby, gdy występuje objaw pierwotny a odczynny serologiczne są jeszcze ujemne. Obecnie materiał pobrany z owrzodzeń na błonach śluzowych od pacjentów z podejrzeniem kiły badany jest najczęściej w mikroskopie z ciemnym polem widzenia lub za pomocą immunofluorescencji bezpośredniej. Pomimo, że nie ma dostępnych w sprzedaży NAATs do wykrywania krętków bladych, niektóre laboratoria stosują własne testy oparte na amplifikacji materiału genetycznego. Opisano m.in. test real time PCR oparty na poszukiwaniu genu *tpp47 T. pallidum*, który umożliwia odróżnienie krętków patogennych od saprofitycznych oraz oznaczanie ilościowe krętków w płynach ustrojowych. Inne testy oparte są na poszukiwaniu genu dla polimerazy DNA (PoIa) oraz 23S rRNA. Wykazano wysoką czułość (75–82%) i swoistość (95%) tych testów w przypadku materiału pobranego z owrzodzeń u chorych

z kiłą wczesną. Czulość badań z krwi jest zbyt niska (odpowiednio 29% z wyizolowanych z krwi leukocytów – PMBC, 14% z surowicy i 24% z pełnej krwi) [18], by testy te mogły w przyszłości zastąpić odczyny serologiczne. Inne badanie wykonywane u chorych z kiłą wczesną objawową wykazało czulość 50% w kile II okresu, natomiast nie wykryto materiału genetycznego *T. pallidum* w żadnej próbce krwi od chorych z kiłą I okresu [28]. Podobne wyniki uzyskano analizując zbiorczo 69 badań oceniających przydatność PCR w diagnostyce kiły. Badania wymazów z owrzodzeń pierwotnych wykazywały czulość ponad 78% i swoistość prawie 97%, a badania próbek krwi noworodków z kiłą wrodzoną charakteryzowały się czulością 83% przy swoistości 88%. Czulość badań krwi u dorosłych różniła się zależnie od okresu choroby, jednak zwykle nie przekraczała 50% i była dużo niższa niż czulość badań serologicznych [17]. Wyniki PCR mogą nie być w pełni miarodajne w ocenie skuteczności leczenia, ze względu na niską czulość badań z płynów ustrojowych, a także dlatego, że materiał genetyczny krętków może utrzymywać się w płynie mózgowo-rdzeniowym długo po skutecznym leczeniu kiły układu nerwowego; w pojedynczych przypadkach był wykrywalny po 3 latach [17, 18, 28].

## 8. Równoczesne wykrywanie kilku patogenów

Testy wykrywające jednocześnie kilka fragmentów DNA (multiplex PCR) mogą pozwalać na równoczesne oznaczanie w materiale klinicznym kilku patogenów przenoszonych drogą płciową, co może przyspieszyć i ułatwić diagnostykę. W jednej z publikacji opisano opracowany przez autorów test wykrywający HPV 16/18 i HHV1/2. Zbadano 177 próbek pobranych z szyjki macicy od pacjentek z podejrzeniem zakażenia HPV i HHV. Badanie wykazało się 100% czulością dla wszystkich badanych wirusów. Swoistość wynosiła odpowiednio 97,1% i 98,1% dla HPV 16 i 18 oraz 97,0% i 96,0% dla HHV1 i 2 [49].

Inne badania oceniały czulość i swoistość komercyjnego testu Abbott RealTime CT/NG wykrywającego *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae*. Zbadano 3832 próbki od osób obu płci, w tym mocz, wymazy z szyjki macicy i z cewki moczowej oraz samodzielnie pobrane przez pacjentki wymazy z pochwy. Czulość testu wynosiła 92,4% i 96,9%, a swoistość 99,2% i 99,7% odpowiednio dla *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* [16]. Inny opracowany przez laboratorium test multiplex PCR ma równocześnie wykrywać *Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *T. pallidum* oraz HHV 1 i 2 w materiale od pacjentów. Jego czulość i swoistość oceniono badając wymazy z pochwy od 80 afrykańskich pacjentek z bezpłodnością.

Czulość testów w porównaniu z metodami referencyjnymi wyniosła 100% dla *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium* i HHV2, a swoistość 100% dla *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, 90,2% dla *T. vaginalis* i 96,1 dla HHV2. W badanej grupie nie było dodatknych próbek dla *T. pallidum* i HHV1. Wyniki wskazują na czulość i swoistość badanego testu zbliżoną do innych NAATs badających obecność mniejszej liczby patogenów, jednak dokładna ocena testu wymaga większej liczby badanych próbek [34].

Mimo powyższych obiecujących wyników, testy multiplex PCR wykrywające kilka patogenów przenoszonych drogą płciową powinny być używane z ostrożnością. W przypadku współistnienia kilku patogenów i przy różnej ich ilości w badanym materiale opisywano wyniki fałszywie ujemne dla tych patogenów, których w próbce było mniej. Jeśli podejrzewamy, że zachodzi taka sytuacja, zalecane jest stosowanie testów wykrywających pojedyncze patogeny [20].

## 9. Podsumowanie

W podsumowaniu metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych odgrywają coraz większą rolę w diagnostyce chorób przenoszonych drogą płciową, co znalazło odzwierciedlenie w zaleceniach IUSTI i CDC. W przypadku większości chorób przenoszonych drogą płciową wykazano wyższą czulość NAATS niż metod tradycyjnych. Wyjątkiem w tym przypadku są badania serologiczne w diagnostyce kiły.

Możliwość hodowli niektórych patogenów (szczególnie *N. gonorrhoeae*, ale również *C. trachomatis* czy HHV) powinna być zachowana ze względu na badania epidemiologiczne i oznaczanie wrażliwości na leki.

## Piśmiennictwo

1. Aumakhan B., Gaydos C.A. i wsp.: Genital herpes evaluation by quantitative TaqMan PCR: correlating single detection and quantity of HSV-2 DNA in cervicovaginal lavage fluids with cross-sectional and longitudinal clinical data. *Viol. J.* 7, 1–8 (2010)
2. Bignell C., Unemo M.: 2012 European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults [http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea\\_2012.pdf](http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea_2012.pdf), 1–24 (2012)
3. Carozzi F., Bisanzzi S., Sani C., Zappa M., Cecchini S., Ciatto S., Confortini M.: Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 assay in detection of high-risk human papillomavirus and diagnosis of biopsy-confirmed high-grade cervical disease. *J. Clin. Microbiol.* 45, 364–369 (2007)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2015. *MMWR Recomm. Rep.* 64, 1–137 (2015)

5. Corey L., Huang M.L., Selke S., Wald A.: Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time taqman PCR assay. *J. Med. Virol.* **76**, 350–355 (2005)
6. Cosentino L.A., Campbell T., Jett A., Macio I., Zamborsky T., Cranston R.D., Hillier S.L.: Use of nucleic acid amplification testing for diagnosis of anorectal sexually transmitted infections. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2005–2008 (2012)
7. Dalstein V., Merlin S., Bali C., Saunier M., Dachez R., Ronsin C.: Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J. Virol. Methods.* **156**, 77–83 (2009)
8. Dean D., Turingan R.S., Thomann H.U., Zolotova A., Rothschild J., Joseph S.J., Read T.D., Tan E., Selden R.F.: A multiplexed microfluidic PCR assay for sensitive and specific point-of-care detection of *Chlamydia trachomatis*. *PLOS ONE*, **7**, e51685 (2012)
9. Deepak S., Kottapalli K., Rakwal R., Oros G., Rangappa K., Iwahashi H., Masuo Y., Agrawal G.: Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr. Genomics*, **8**, 234–251 (2007)
10. Domeika M., Bashmakova M., Savicheva A., Kolomic N., Sokolovskiy E., Hallen A., Unemo M., Ballard R.C.: Eastern European network for sexual and reproductive health (EE SRH Network). Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern European countries. *Euro Surveill.* **15**, 44, 1–7 (2010)
11. Edwards M.C., Gibbs R.A.: Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.* **3**, 65–75 (1994)
12. Else E.A., Swoyer R., Zhang Y., Taddeo F.J., Bryan J.T., Lawson J., Van Hyfte I., Roberts C.C.: Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with INNO-LiPA HPV genotyping extra assay. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1907–1912 (2011)
13. Fang X.F., Song B., Tu Y.Y., Tong J.Z., Faul J.L., Bai H.: Rapid detection of glycoprotein G gene for the diagnosis and typing of herpes simplex virus infection in genital herpes. *Sex. Transm. Infect.* **75**, 396–397 (1999)
14. Forcier M., Musacchio N.: An overview of human papillomavirus infection for the dermatologist: disease, diagnosis, management, and prevention. *Dermatol. Ther.* **23**, 458–476 (2010)
15. French P., Gomberg M., Janier M., Schmidt B., van Voorst Vader P., Young H.: IUSTI/IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int. J. STD AIDS*, **20**, 300–309 (2009)
16. Gaydos C.A., Robinson J. i wsp.: Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3236–3243 (2010)
17. Gayet-Ageron A., Lautenschlager S., Ninet B., Perneger T.V., Combescure C.: Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Infect.* **89**, 251–256 (2012)
18. Grange P.A., Dupin N. i wsp.: Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 546–552 (2012)
19. Gupta R., Warren T., Wald A.: Genital herpes. *Lancet*, **22**, 2127–2137 (2007)
20. Hamilton M.S., Otto M., Nickell A., Abel D., Ballam Y., Schremmer R.: High frequency of competitive inhibition in the Roche Cobas AMPLICOR multiplex PCR for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4393 (2002)
21. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, **11**, 1026–1030 (1993)
22. Kim H.J., Yen-Lieberman B. i wsp.: A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Clin. Virol.* **50**, 26–30 (2011)
23. Lacey C.J., Woodhall S.C., Wikstrom A., Ross J.: 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **3**, e263–70 (2013)
24. Lanjouw E., Ossewaarde J.M., Stary A., Boag F., van der Meijden W.I.: 2010 European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections. *Int. J. STD AIDS*, **21**, 729–737 (2010)
25. Lister N.A., Tabrizi S.N., Fairley C.K., Garland S.: Validation of roche COBAS Amplicor assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in rectal and pharyngeal specimens by an *omp1* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 239–241 (2004)
26. Lorenz T.C.: Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp.* **22**, e3998 (2012)
27. Marions L., Rotzen-Ostlund M., Grillner L., Edgardh K., Tiveljung-Lindell A., Wikstrom A., Lidbrink P.: High occurrence of a new variant of *Chlamydia trachomatis* escaping diagnostic tests among STI clinic patients in Stockholm, Sweden. *Sex. Transm. Dis.* **35**, 1, 61–64 (2008)
28. Martin I.E., Tsang R.S., Sutherland K., Tilley P., Read R., Anderson B., Roy C., Singh A.E.: Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1668–1673 (2009)
29. Miller N.S., Yen-Lieberman B., Poulter M.D., Tang Y.W., Granato P.A.: Comparative clinical evaluation of the IsoAmp<sup>®</sup> HSV Assay with ELVIS<sup>®</sup> HSV culture/ID/typing test system for the detection of herpes simplex virus in genital and oral lesions. *J. Clin. Virol.* **54**, 355–358 (2012)
30. Młynarczyk B., Majewski S.: Zakażenia wirusami herpes simplex i varicella-zoster: patogeneza i leczenie. *Przegl. Dermatol.* **89**, 133–138 (2002)
31. Młynarczyk-Bonikowska B., Majewska A., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part I: HSV, HPV. *Mini-Rev. Med. Chem.* **13**, 1837–1845 (2013)
32. Młynarczyk-Bonikowska B., Serwin A.B., Golparian D., Walter de Walthoffen S., Majewski S., Koper M., Malejczyk M., Domeika M., Unemo M.: Gonorrhoea epidemiology, antimicrobial susceptibility/resistance and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Poland, 2010–2012. *BMC Inf. Dis.* **14**, 65–71 (2014)
33. Mullis K.B.: Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **48**, 579–582 (1990)
34. Muvunyi C.M., Dhont N., Verhelst R., Crucitti T., Reijmans M., Mulders B., Simons G., Temmerman M., Claeys G., Padalko E.: Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STD Finder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**, 29–37 (2011)
35. Oliveira A., Verdasca N., Pista Â.: Use of the NucliSENS EasyQ HPV assay in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Med. Virol.* **85**, 1235–1241 (2013)
36. Papp J.R., Schachter J., Gaydos C.A., Van Der Pol B.: Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. *MMWR*, **63**, 1–17 (2014)
37. Patel R., Alderson S., Geretti A., Nilsen A., Foley E., Lautenschlager S., Green J., van der Meijden W., Gomberg M., Moi H.: IUSTI/WHO Europe. European guideline for the management of genital herpes, 2010. *Int. J. STD AIDS*, **22**, 1–10 (2010)
38. Reid J.L., Wright T.C.Jr., Stoler M.H., Cuzick J., Castle P.E., Dockter J., Getman D., Giachetti C.: Human papillomavirus

- oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening: baseline and longitudinal results from the CLEAR study. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 473–483 (2015)
39. Roberts C.C., Swoyer R., Bryan J.T., Taddeo F.J. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping PCR assay and influence of DNA extraction method on HPV detection. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1899–1906 (2011)
  40. Schloss L., Linde A. i wsp.: An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. *J. Clin. Virol.* **28**, 175–185 (2003)
  41. Seaman W.T., Andrews E., Couch M., Kojic E.M., Cu-Uvin S., Palefsky J., Deal A.M., Webster-Cyriaque J.: Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virol. J.* **7**, 1–17 (2010)
  42. Stanley M.: Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol. Oncol.* **117**, Suppl 2, 5–10 (2010)
  43. Syrjänen S.: The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann. Oncol.* **21**, Suppl 7, 243–245 (2010)
  44. Tabrizi S.N., Unemo M., Limnios A.E., Hogan T.R., Hjelmevoll S.O., Garland S.M., Tapsall J.: Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3610–3615 (2011)
  45. Van Der Pol B., Warren T., Taylor S.N., Martens M., Jerome K.R., Mena L., Lebed J., Ginde S., Fine P., Hook E.W. 3rd.: Type-specific identification of anogenital herpes simplex virus infections by use of a commercially available nucleic acid amplification test. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3466–3471 (2012)
  46. WHO Global incidence and prevalence of curable STI 2008. 1–20 (2012)
  47. Workowski K.: In the clinic. *Chlamydia* and gonorrhoea. *Ann. Intern. Med.* **158**, ITC2-1. (2013)
  48. Zandberg D.P., Bhargava R., Badin S., Cullen K.J.: The role of human papillomavirus in nongenital cancers CA. *Cancer J. Clin.* **63**, 57–81 (2013)
  49. Zhao Y., Cao X., Tang J., Zhou L., Gao Y., Wang J., Zheng Y., Yin S., Wang Y.: A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening. *Mol. Cell. Probes.* **26**, 66–72 (2012)
  50. Zur Hausen H.: The role of papillomaviruses in anogenital cancer. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **69**, 107–111 (1990)