

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, ОСНОВАННОЙ НА ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (REAL-TIME PCR) ИЛИ ПО ОКОНЧАНИИ РЕАКЦИИ (END-POINT ANALYSIS)

Савочкина Ю.А., Гущин А.Е., Цеслюк М.В., Шипулин Г.А.
ГУ ЦНИИ эпидемиологии МЗ СР РФ
Центр молекулярной диагностики инфекционных болезней

Введение

Высокий уровень заболеваемости хламидиозом, сопряженный с высоким числом вызываемых им осложнений среди женщин репродуктивного возраста, делает чрезвычайно актуальным проведение широкого скрининга для выявления данной ИППП. В настоящее время для выявления *Chlamydia trachomatis* широко используются молекулярно-биологические методы и, прежде всего, ПЦР благодаря высокой чувствительности и специфичности данного метода. Однако существенным препятствием на пути широкого внедрения метода ПЦР в практику медико-диагностических лабораторий является высокий риск контаминации продуктами ПЦР, во избежание которого требуется выполнение строгих специальных требований к организации лаборатории и работы персонала.

Применение метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов в режиме реального времени или по окончании реакции в формате закрытой пробирки позволяет решить эту проблему, снизив до минимума риск контаминации, и одновременно с этим существенно упростить требования к организации лаборатории. При этом подходе отпадает необходимость в использовании дополнительного строго изоли-

рованного помещения для проведения этапа детекции. Дополнительным важным преимуществом данной модификации метода ПЦР является возможность автоматизировать учет результатов анализа, снизить субъективизм в интерпретации результатов.

В ЦНИИЭ разработана тест-система, «Амплисенс *Chlamydia trachomatis*», которая прошла Государственные испытания, и имеет сертификат на производство, выданный ГИСК им. Л.А. Тарасевича. В рамках государственных испытаний, а также на широком клиническом материале изучены аналитические и диагностические характеристики данной тест-системы.

Целью данной работы являлась модификация тест-системы «Амплисенс *Chlamydia trachomatis*» путем разработки флуоресцентно-меченных (ФМ) зондов для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-time PCR, ПЦР-РРВ) или по конечному уровню флуоресцентного сигнала. (End-point-analysis, ПЦР-ФКТ).

Материалы и методы

Для проведения ПЦР использовались реагенты, входящие в состав тест-системы «Амплисенс *Chlamydia trachomatis*» с добавлением ФМ-зондов. ФМ-зонды представляли собой вариант «молекулярных маячков» («molecular beacons»), 5'-конец которых комплементарен ДНК-мишени, содержащих флуорофор на одном конце и гаситель на другом. Зонд для детекции ДНК *Chlamydia trachomatis* был мечен флуорофором Fam, зонд для детекции ДНК ВКО (внутренний контрольный образец) - флуорофором R6G.

ПЦР-РРВ проводили с помощью прибора «RotorGene3000» (производство «CorbettResearch», Австралия). Для ПЦР с анализом уровня флуоресценции в конечной точке (ПЦР-ФКТ) амплификацию проводили на приборе «Терцик», а детекцию флуоресцентного сигнала - с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора «Джин» (производство «ДНК-Технология», Москва). ПЦР-ФКТ проводили также с использованием прибора «RotorGene3000».

Результаты

Аналитическая чувствительность тест-системы с использованием ФМ-зондов не отличалась от таковой при электрофоретическом способе детекции продуктов ПЦР и составила 10^3 копий ДНК криптической плазмиды на 1 мл. Для изучения диагностической чувствительности и специфичности тест-системы в сравнении с системой с электрофоретическим методом детекции было протестировано 350 клинических образцов соскобов (мазков) из урогенитального тракта, полученных от пациентов, обращавшихся в КДЛ ЦНИИЭ для обследования на наличие ИППП. 150 из этих образцов содержали ДНК *Chlamydia trachomatis*. Результаты ПЦР РРВ совпадали с результатами ПЦР-ФКТ и с результатами детекции методом электрофореза для всех образцов.

Примеры полученных данных представлены на Рис.1 (ПЦР РРВ) и Рис.2 (ПЦР ФКТ) соответственно.

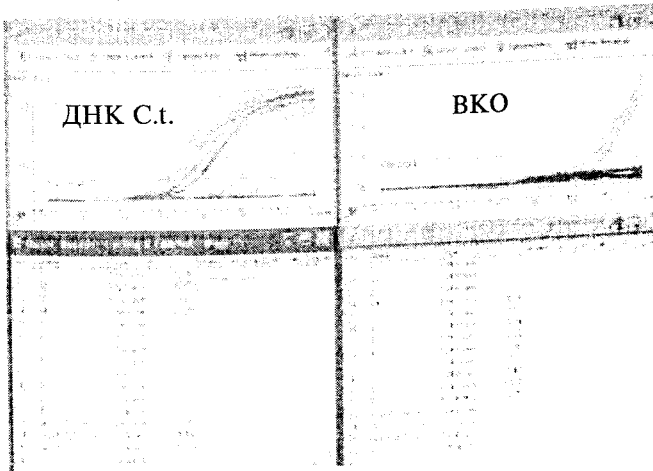


Рис. 1.
Результаты ПЦР-РРВ

Положительные образцы — те для которых кривая флуоресценции по каналу FAM пересекает пороговую линию, при этом в графе Ct в таблице результатов присутствует значение порогового цикла (клинические образцы 21-24 и контрольные образцы 33-35).

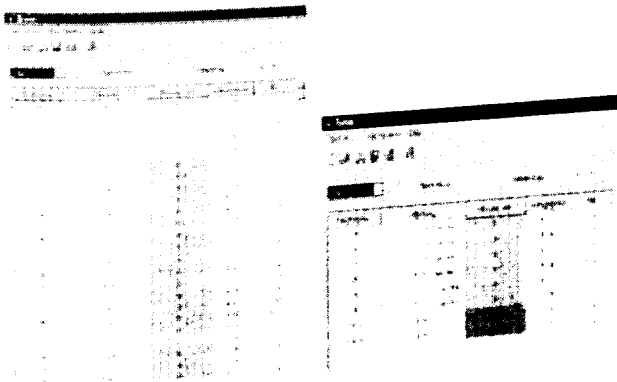


Рис.2.
Результаты ПЦР ФКТ с использованием прибора «Джин».

Использование опции «End-point analysis» в приборе «RotorGene 3000» также позволяет дифференцировать положительные и отрицательные результаты по конечному уровню флуоресцентного сигнала (Рис. 3).

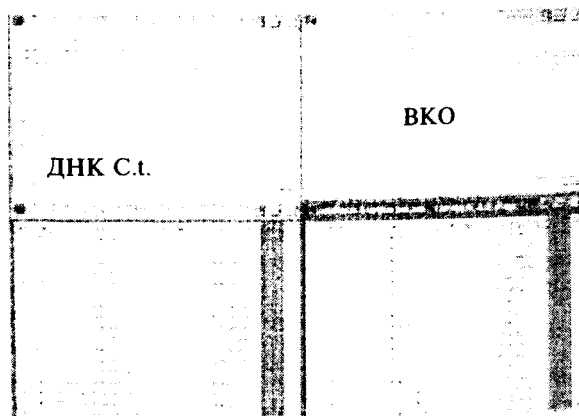


Рис. 3.

Результаты ПЦР ФКТ с использованием прибора «RotorGene 3000».

Положительные образцы — те для которых флуоресцентный сигнал по каналу FAM превышает пороговое значение, при этом в таблице результатов автоматически указывается результат «Reaction» (клинические образцы 21-24 и контрольные образцы 33-35)

Наличие этой опции позволяет использовать данный прибор не только как амплификатор с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, но и как флуориметр (флуориметрический ПЦР-детектор), т.е. проводить амплификацию в обычных амплификаторах, использующих пробирки формата 0.2 мл, а детекцию продукта — в приборе «RotorGene 3000» по окончании реакции. При этом процедура детекции занимает несколько минут. Это позволяет при необходимости увеличить пропускную способность методики (до 96 одновременно амплифицируемых образцов) или уменьшить до минимума время использования прибора «RotorGene 3000» для скрининговых тестов, с тем, чтобы использовать его для проведения количественных анализов или генотипирования.

Следует отметить, что ФМ-зонды обладают высокой селективностью в отношении гетерологической ДНК, поэтому использование ФМ-зондов может увеличивать специфичность тест-системы. Однако при этом необходимо убедиться, что последовательность ДНК-мишени в области связывания зонда является консервативной, т.к. в условиях генетического полиморфизма при наличии единичных нуклеотидных замен возможно снижение диагностической чувствительности тест-системы.

Заключение

Разработанная модификация тест-системы «Амплисенс *Chlamydia trachomatis*» на основе гибридизационно-флуоресцентной детекции в режиме реального времени или по конечному уровню флуоресценции обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Снижение до минимума риска контаминации, уменьшение времени и трудоемкости проведения анализа и возможность автоматического учета результатов делают перспективным применение тест-системы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в практике клинико-диагностических лабораторий.

В настоящее время в ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ разработаны и применяются модифицированные для гибридизационно-флуоресцентного метода детекции тест-системы для выявления различных агентов ИППП (*Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, HSV, CMV, *T.vaginalis*, *C.albicans*, *G.vaginalis*)

Литература.

1. B. Donovan "Sexually transmissible infections other than HIV", Lancet, 2004, v. 363: 45-56
2. Egger M. et all "Screening for chlamydial infections and the risk of ectopic pregnancy in a county in Sweden: ecological analysis", 1998, British Medical Journal, v. 316 (7147): 1776-80