

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ REAL-TIME PCR ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ NEISSERIA GONORRHOEAЕ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Гущин А.Е., Шипулин Г.А

*ГУ Центральный НИИ эпидемиологии МЗСР РФ
Центр молекулярной диагностики инфекционных болезней*

Амплификационные технологии в лабораторной диагностике гонореи постепенно приходят на смену классическим методам исследований – микроскопическому и бактериологическому в силу более высокой чувствительности и специфичности, отсутствию жестких требований к условиям транспортировки материала, и высокой производительности при скрининговых исследованиях. Это подтверждается существованием и использованием за рубежом коммерческих наборов на основе альтернативных амплификационных технологий PCR, LCR, TMA [1]. В нашей

стране до настоящего времени использование ПЦР в лабораторной диагностике гонореи не регламентировано. В то же время существует ряд принципиальных вопросов, от решения которых зависит результативность использования ПЦР как альтернативы традиционным методам диагностики. Во-первых, необходимо сформулировать требование к аналитической чувствительности существующих и разрабатываемых ПЦР тест-систем и оценить аналитические возможности традиционных методов лабораторной диагностики - микроскопии и посева. Известно, что микроскопический тест при более низкой аналитической чувствительности по сравнению с бактериологическим, тем не менее, имеет достаточно высокую диагностическую чувствительность при исследовании материала от мужчин с острой гонореей. И, наоборот, у женщин, в первую очередь не имеющих выраженных симптомов, микроскопический анализ материала на гонококки мало информативен. По-видимому, одной из причин является различное количество микроорганизмов в уrogenитальном тракте у мужчин и женщин при разных формах гонококковой инфекции. Чувствительность бактериологического метода может также значительно варьировать, затрудняя сопоставление результатов разных лабораторий. Для этой цели необходимо разработать подход к количественной оценке Ng в исследуемом клиническом материале из уrogenитального тракта мужчин и женщин с разными формами гонококковой инфекции. Во-вторых, необходимо иметь инструмент для оценки специфичности предлагаемых ПЦР-тест-систем. Зарубежные исследования, проведенные на большом количестве клинического материала показали, что участки генома NG (сppB, M:Ngp11 и др.), часто используемые в качестве мишеней для амплификации, могут обнаруживаться и у непатогенных нейссерий в силу рекомбинационных процессов и обмена генетическим материалом. В силу этого, в некоторых отечественных тест-системах, включая и «Амплиценс *Neisseria gonorrhoeae*» производства ГУ ЦНИИ эпидемиологии МЗСР анализ результатов ПЦР-исследований осуществляется на основании наличия или отсутствия продуктов амплификации двух независимых мишеней. В некоторых зарубежных работах в случае спорных или неопределенных результатов ПЦР-исследований предлагается использовать подтверждающий тест на основе результатов амплификации фрагмента 16S-рДНК *N. gonorrhoeae* с детекцией продукта амплификации при помощи специфического для *N. gonorrhoeae* гибридационного зонда [2,3].

Появившаяся в последние годы технология Real-time PCR (ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени или ПЦР-РРВ) с использованием флюоресцентно-меченных (ФМ) зондов дает возможность проводить качественное и количественное определение ДНК возбудителей в клиническом материале.

Целью предлагаемой работы является разработка набора реагентов для качественного и количественного определения ДНК *N. gonorrhoeae* в

клиническом материале, используемом для лабораторных исследований, на основе технологии ПЦР-РРВ с ФМ-зондом.

Результаты и обсуждение.

Выбор мишени для амплификации. В качестве мишени был выбран ген 16S-рРНК *N. gonorrhoeae*. Данный ген в геноме *N. gonorrhoeae* представлен в 4 копиях, что позволяет по сравнению с однокопийными мишенями иметь более высокую аналитическую чувствительность. В тоже время, в отличие от других мультикопийных мишеней копияность рибосомальных генов у различных клинических изолятов в пределах вида постоянна. Это с учетом других факторов обеспечивает преемственность результатов определения концентрации ДНК микроорганизмов и количества микробных клеток. Вторым аргументом в пользу выбора данной мишени явился большой объем информации о нуклеотидных последовательностях рибосомальных генов различных представителей рода *Neisseria* на основании которой можно выбрать наиболее специфический для *N. gonorrhoeae* участок. Как известно, рибосомальные гены имеют минимальные отличия по сравнению с другими генами между различными клиническими изолятами, а кроме того в меньшей степени участвуют в горизонтальном обмене генетической информацией. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей различных клинических изолятов, опубликованный в GeneBank, позволил выбрать консервативный и высокоспецифичный для *N. gonorrhoeae* участок. Несмотря на то, что праймеры, фланкирующие это участок, были специфичны не только в отношении *N. gonorrhoeae*, но и для некоторых других видов нейссерий, высокая селективность теста обеспечивалась ФМ TaqMan-зондом.

Для исследования специфичности теста были сконструированы различные варианты TaqMan-зондов. Специфичность выбранных зондов проверялась на продуктах амплификации наиболее гомологичного для *N. gonorrhoeae* штамма *N. meningitidis*. При амплификации высоких (до 10⁶ копии /мл) концентраций ДНК Nm наблюдалось увеличение только фонового сигнала флюоресценции и отсутствовало накопление специфического флюоресцентного сигнала. Для снижения фонового сигнала в один из вариантов ФМ зонда была введена мутация, обеспечивающая дополнительную специфичность в отношении ДНК *N. gonorrhoeae*. Введение мутации не сказалось на аналитической чувствительности теста и воспроизводимости результатов при амплификации разных концентраций ДНК Ng.

Количественный анализ ДНК Ng с помощью ПЦР-РРВ. Для проведения количественного анализа были приготовлены ДНК-калибраторы. С этой целью из клеточной культуры *N. gonorrhoeae* был приготовлен препарат ДНК, концентрация которого была измерена методом лимитирующих разведений с использованием праймеров к гену шитозин-ДНК-метилтрансферазы. На основе препарата были приготовлены 10-кратные

разведения ДНК, которые служили калибраторами при количественной оценке результатов ПЦР-РРВ.

Для учета потерь ДНК при обработке клинического материала был сконструирован неконкурентный внутренний контрольный образец (нВКО), добавляемый при пробоподготовке в каждый исследуемый образец. ПЦР-РРВ проводится в формате мультиплекс с двумя парами праймеров (для *N. gonorrhoeae* и нВКО) и соответствующими TaqMan-зондами, имеющими разные флуоресцентные метки. Эффективность пробоподготовки оценивается с использованием соответствующих калибраторов для нВКО и служит поправочным коэффициентом при окончательном расчете концентрации ДНК Ng в клиническом материале.

Эффективность обработки клинического материала с использованием наборов «ДНК-сорб-А», входящих в состав тест-систем «Амплисенс» и предназначенных для диагностики урогенитальных инфекций. Материалом для лабораторной диагностики гонококковой инфекции служат соскобы из цервикального канала и уретры у женщин и уретры у мужчин. Перспективным для скрининговых исследований с использованием амплификационных технологий считаются вагинальные мазки и образцы первой порции утренней мочи у мужчин и женщин.

Для количественной оценки микроорганизмов в исследуемом материале крайне важна стандартизация эффективности выделения ДНК. В независимых экспериментах по оценке эффективности экстракции клинического материала с помощью набора «ДНК-сорб-А» на различном клиническом материале, полученном из урогенитального тракта мужчин женщин, было показано, что эффективность выделения ДНК составила в среднем 76% (от 60 до 90% в зависимости от наличия и отсутствия различных примесей, включая кровь, слизь, осадок). При этом отсутствовали пробы, в которых в результате ингибирования или потерь полностью не определялся продукт амплификации ВКО. В тоже время при тестировании образцов первой порции утренней мочи и материала из уретры мужчин и женщин, а также из цервикального канала, например набором «Cobas Amplicor CT Test», использующим экспресс-метод обработки клинического, количество невалидных результатов в из-за ингибирования варьировало от 1,9 до 45% [4]

Заключение.

В процессе проведенной работы была разработана методика на основе ПЦР-РРВ с ФМ-зондом для количественного анализа ДНК *N. gonorrhoeae* в материале, используемом в лабораторной диагностике гонококковой инфекции. Такой анализ позволит сформулировать требования к аналитическим характеристикам применяемых и разрабатываемых ПЦР-тест-систем, а также с учетом аналитических характеристик традиционных методов (микроскопии и бактериологического посева) объективно оценить их диагностическую чувствительность и специфичность на разном клини-

ческом материале, полученном от разных групп пациентов. В качественном варианте разработанная методика может служить подтверждающим тестом при получении спорных результатов разными лабораторными методами.

Литература.

1. CDC. «Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infection» , 2002 MMWR , №51(RR15); 1-27
2. Farrel D.J., «Evaluation of Amplicor *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cppB Nested PCR and 16SrRNA PCR» JCM., 1999., V37., PP.386-390.
3. Diemert D.J., et al., «Confirmation by 16S rRNA PCR of the Cobas Amplicor CT/NG Test for Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* Infection in a Low-prevalens Population»., JCM, 2002., V.40, PP. 4056-4059.
4. Toye B., et al., «Inhibition of PCR in Genital and Urine Specimens Submitted for *Chlamydia trachomatis* Testing»., JCM, 1998.,V.36., P.2356-2358.