

## Сравнительный анализ чувствительности тест-систем для определения *Ureaplasma urealyticum* методом ПЦР

Ли П.К., Погосян Г.П.

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова

Мақалада «Амплисенс» және «Биоком» фирмаларының *Ureaplasma urealyticum* бактериялық агентін анықтау үшін тест-жүйенің ерекшелігі мен сезімталдығын анықтау нәтижелері ұсынылған. Бақылау түрінің онтайлы сериялық дамыту әдісі қолданылды. 1,7% агарлы геледе электрофорезде амплификацияның кезекті реакциясының нәтижесінен кейін талданды. «Амплисенс» фирмасының реагенттер жиынтығының сезімталдығының екі есе жоғарылағаны байқалды.

Results of determination of test-systems of «Amplisense» and «Biocom» firms sensitivity and specificity for investigation of bacterial agent *Ureaplasma urealyticum* are presented in this article. The method of dilution by the multiple dilution of positive control was used. Following reaction of amplification was attended with gel-electrophoresis. Double increasing of sensitivity of «Amplisense» firm's test-system is showed.

Правильное и своевременное лечение заболеваний, вызываемых различными инфекционными агентами, требует установления точного диагноза. Для решения этой проблемы все чаще применяются современные методы молекулярной биологии. Так, к настоящему времени метод амплификации нуклеиновых кислот полимеразной цепной реакцией (ПЦР) уже достаточно широко используется в практической медицине как эффективный инструмент лабораторной диагностики [1, 2].

Применение ПЦР в диагностике заболеваний, передаваемых половым путем (ЗППП), в настоящее время получило наиболее широкое распространение. Этому способствовал ряд причин, важнейшими из которых были недостаточная эффективность применяемых ранее методов лабораторной диагностики (микроскопия, бактериальный посев, иммуноферментный анализ), быстрота выполнения ПЦР (в среднем 1 сутки), а также, до некоторой степени, относительная простота манипуляций с клиническим материалом. Первая зачастую объясняется особенностями биологии патогенных микроорганизмов, таких как мелкие размеры и невозможность (или затруднительность) культивирования вне организма человека [3].

Указанные особенности характерны для *Ureaplasma urealyticum* — возбудителя одного из наиболее распространенных ЗППП [4]. В настоящее время по распространенности уреоплазмоз «соперничает» с хламидийной инфекцией. И хотя уреоплазмы высеваются бактериологически, это занимает от 3 до 5 суток [5, 6].

Диагностика уреоплазмозов методом ПЦР осуществляется благодаря налаженному производству сертифицированных тест-систем. Наибольшим спросом и, соответственно, распространенностью в лабораторной практике в странах СНГ пользуются тест-системы российского производства (НПФ «Литех», «Амплисенс<sup>TM</sup>» ЦНИИЭ МЗ РФ, «Биоком», НПФ «ДНК-Технология» и др.). Не уступая по основным качественным характеристикам аналогам ведущих мировых производителей ПЦР тест-систем («Хоффман-Ла Рош», «Перкин-Элмер» и др.), продукция российских фирм выгодно отличается в ценовом отношении, что, собственно, и является решающим фактором выбора.

Наиболее существенными характеристиками тест-систем для детекции ДНК патогенных микроорганизмов являются чувствительность (способность обнаруживать наименьшие количества молекул-мишеней) и специфичность (способность реагировать только со специфическими последовательностями-мишенями) [7, 8]. К сожалению, рекламная информация фирм-изготовителей не всегда позволяет объективно оценить потребительские качества их продукции, тем более, что некоторые характеристики являются «know how» — а именно последовательности праймеров, а подчас и локализация последовательности-мишени.

Все сказанное обуславливает неизбежность и необходимость для практических лабораторий проводить систематическую исследовательскую работу по определению сравнительной эффективности поступающих на рынок тест-систем.

Целью данного исследования была сравнительная характеристика эффективности тест-систем для амплификации ДНК патогенной бактерии *Ureaplasma urealyticum* производства «Амплисенс<sup>TM</sup>» ЦНИИЭ МЗ РФ (в дальнейшем — «Амплисенс») и компании «Биоком» (далее — «Биоком»).

### Материалы и методы

Выделение ДНК из экспериментальных проб проводили с использованием наборов «ДНК-сорб А» и «ДНК-сорб В» («Амплисенс»), представляющих собой комплекты лизирующих и отмывочных растворов на основе детергентов и этилового спирта соответственно. Адсорбция ДНК осуществляется на силикагелевом сорбенте.

Реакции амплификации ДНК осуществляли с использованием стандартных тест-систем фирмы «Амплисенс» и «Биоком» в режиме, рекомендованном фирмой-производителем.

Наборы для амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* «Амплисенс» укомплектованы для применения технологии «горячего старта», который обеспечивается разделением праймеров, нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Расчетный объем реакционной смеси 25 мкл.

Наборы «Биоком» для амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* представляют собой лиофилизированные концентрированные реакционные смеси ( $\times 2$ ), расфасованные в 0,5 мл пробирки. Растворение лиофильного содержимого осуществляется добавлением специального раствора, поставляемого в комплекте (DNA-diluent). Расчетный объем реакционной смеси 20 мкл.

В качестве субстратов амплификации и, соответственно, молекул-мишеней использовали препарат ПКО (положительный контрольный образец) для *U. urealyticum* («Амплисенс»), содержащий 2,1 ГЭ/мл гена-мишени, а также образцы тотальной ДНК *U. urealyticum* из контрольной панели 7.

Электрофорез продуктов амплификации проводили с использованием наборов ЭФ-300 («Амплисенс»).

### Результаты и обсуждение

В настоящей работе под специфичностью понимали узнавание идентичных молекулярных мишеней, что существенно отличается от понятия видовой специфичности тест-систем, позволяющей идентифицировать видовую принадлежность микроорганизма.

Исходной посылкой запланированных экспериментов являлось предположение о наличии последовательностей-мишеней для обеих изучаемых тест-систем в препарате «Положительный контрольный образец ДНК *Ureaplasma urealyticum*» (ПКО), представлявшем собой, согласно аналитическому паспорту качества «Амплисенс», тотальную ДНК, выделенную из культуры уреоплазмы фенольным методом.

Целью экспериментов было выяснение степени идентичности используемых двумя фирмами-изготовителями последовательностей-мишеней.

Для этого был поставлен ряд реакций амплификации, в которых в качестве матрицы использовали препарат ПКО *U. urealyticum* в различных концентрациях (табл. 1).

Таблица 1

Использованные концентрации ПКО в реакциях амплификации

| № | Кратность разведения ПКО |                            | Конечная концентрация (ГЭ/мл) |
|---|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
|   | общая                    | по отношению к предыдущему |                               |
| 1 | 20                       | $\times 20$                | $1,05 \times 10^3$            |
| 2 | 40                       | $\times 2$                 | $0,5 \times 10^3$             |
| 3 | 80                       | $\times 2$                 | $2,6 \times 10^2$             |
| 4 | 160                      | $\times 2$                 | $1,3 \times 10^2$             |

Практически пробы были приготовлены последовательными разведениями с использованием буфера для разведения ДНК («Амплисенс»):

- 1: 95 мкл ТЕ + 5 мкл ПКО,
- 2: 50 мкл ТЕ + 50 мкл № 1,
- 3: 50 мкл ТЕ + 50 мкл № 2,
- 4: 50 мкл ТЕ + 50 мкл № 3.

Использование в качестве материала последовательных разведений имело целью определить одновременно степень чувствительности исследуемых тест-систем.

Было поставлено по 4 идентичных реакции каждой тест-системы. Условия проведения (постановка реакций, температурные режимы) соответствовали стандартам фирм-изготовителей.

Аmplификацию проводили в аппарате с регулированием температур по матрице «Терцик-МС2», поэтому придерживались рекомендаций относительно температурного режима для аппаратов этого типа.

Последующий электрофорез продуктов амплификации обнаружил результаты, представленные на рисунке 1.

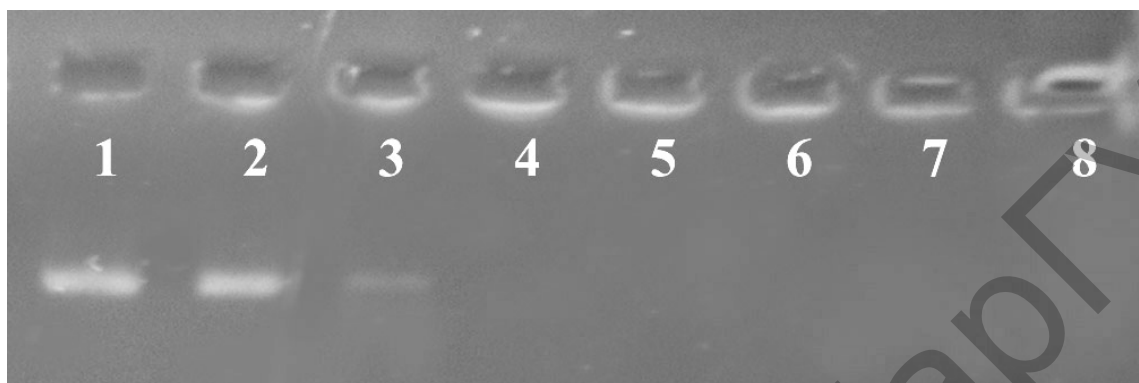


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК ПКО *U. Urealyticum*: 1–4 — реакции, поставленные с использованием тест-системы «Амплисенс»; 5–8 — реакции, поставленные с использованием тест-системы «Биоком»

Анализ электрофореграммы показал отсутствие продуктов амплификации во всех пробирках с использованием тест-системы «Биоком». Неоднократное повторение эксперимента показало достоверность полученных результатов и исключило возможность влияния производственного брака, контаминации или некорректной постановки реакций.

Отсутствие накопления продуктов амплификации ПКО в реакциях с использованием тест-системы производства «Биоком» означает явное отличие ее специфичности от таковой у «Амплисенс». То есть в реакциях используются разные праймеры для амплификации последовательностей одного и того же гена либо амплифицируются последовательности разных генов, избранных в качестве характерной мишени. Сказанное носит вполне ожидаемый характер, если принять во внимание различный предсказанный размер ампликонов (756 п.н. у «Биоком» и 450 п.н. у «Амплисенс»).

Полученные результаты также позволяют сделать вывод о неполном соответствии свойств препарата ПКО *U. urealyticum* («Амплисенс»), заявленных в аналитическом паспорте качества. Вероятно, препарат представляет собой генно-инженерную конструкцию, содержащую искусственную последовательность-мишень, фланкированную соответствующими праймерами, как это имеет место в препарате ВКО.

Таким образом, поставленные эксперименты показали явное различие в специфичности тест-систем для детекции ДНК *U. urealyticum* производства «Амплисенс» и «Биоком».

Результаты, полученные в предыдущих экспериментах, не позволяли использовать для точного определения чувствительности тест-систем препараты ПКО или ВКО («Амплисенс»). Вместе с тем названные работы требуют использования растворов матриц с заранее известной концентрацией.

Оптимальным субстратом могла бы быть культура *U. urealyticum* с известным титром клеток. В качестве замены таковой использовали три пробы из контрольной панели для оценки качества работы лабораторий («Амплисенс») *U. urealyticum*. Концентрации ДНК в них были подобраны с расчетом получения определенного количества ДНК гена-мишени (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Контрольная панель CP2 «*Chl. trachomatis, U. urealyticum, M. hominis*»

| № пробы | Количество ГЭ/мл <i>U. urealyticum</i> |
|---------|----------------------------------------|
| 13      | $10^5$                                 |
| 14      | $10^4$                                 |
| 15      | $10^3$                                 |

Представленные пробы содержали только ДНК *U. urealyticum*.

Однако процедура использования контрольной панели предусматривает предварительное выделение ДНК из проб по стандартной методике «Амплисенс», что подразумевает неизбежные потери.

С целью определения порядка потерь ДНК в ходе процесса выделения молекул нуклеиновых кислот были проведены контрольные эксперименты.

Предварительно приготовленные разведения препарата ПКО (концентрации — аналогично табл. 1) использовали в качестве исходного материала для выделения ДНК с помощью набора «ДНК-сорб А» («Амплисенс»). Полученные в результате образцы использовали для постановки серии реакций амплификации с помощью тест-системы *U. urealyticum* «Амплисенс». Параллельно ставили серию реакций с исходными растворами ПКО, не подвергшимися процедуре выделения.

Сравнительный анализ последующего электрофореза реакционных смесей обнаружил явные различия в эффективности амплификации ДНК ПКО. Фотография электрофореграммы амплифицированных фрагментов исходных ДНК и молекул, подвергшихся обработке комплектом реагентов «ДНК-сорб А», представлена на рисунке 2.

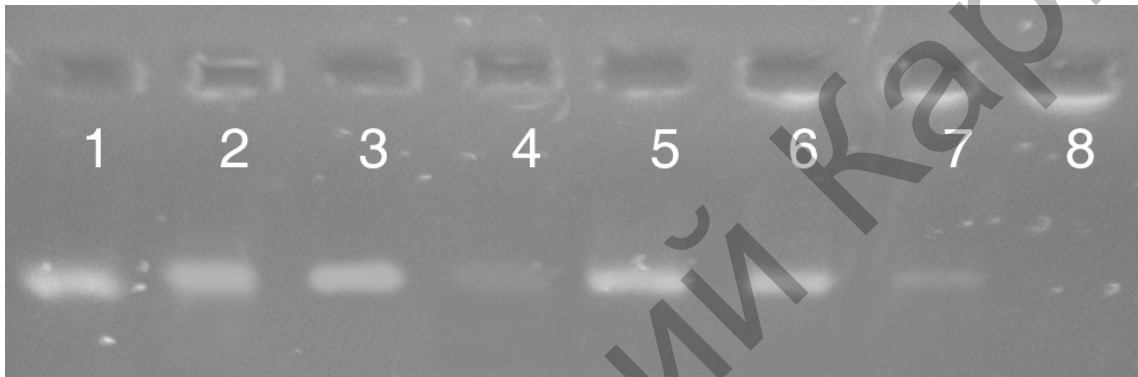


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации различных концентраций ПКО: 1–4 — исходные пробы; 5–7 — пробы после обработки набором «ДНК-сорб А»

Визуальный анализ данной электрофореграммы позволяет оценить степень потерь ДНК при обработке набором «ДНК-сорб А», по меньшей мере, как двукратную.

С учетом полученных данных концентрации ДНК *U. urealyticum* контрольной панели (табл. 2) следует рассматривать следующим образом (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

**Количество ДНК *U. urealyticum* в препаратах после обработки набором «ДНК-сорб А»**

| № пробы | Количество ГЭ/мл <i>U. urealyticum</i> |
|---------|----------------------------------------|
| 13      | $0,5 \times 10^5$                      |
| 14      | $0,5 \times 10^4$                      |
| 15      | $0,5 \times 10^3$                      |

Обнаруженную закономерность полезно учитывать при интерпретации результатов анализов клинических проб в повседневной практике клиничко-диагностических лабораторий, осуществляющих ПЦР-анализ.

Собственно эксперимент по определению чувствительности тест-систем «Амплисенс» и «Биоком» был осуществлен постановкой параллельных рядов реакций амплификации ДНК проб контрольной панели *U. urealyticum*. Результаты эксперимента представлены в таблице 4 и на рисунке 3. Картины электрофореза, представленную на рисунке, обрабатывали компьютерной системой Totallab.

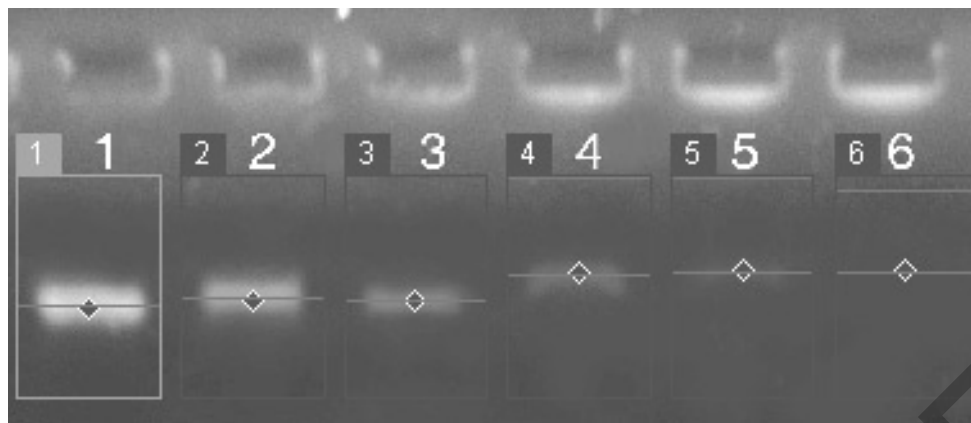


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации проб ДНК *U. urealyticum* контрольной панели (локализация зон флуоресценции ДНК программой TotalLab 1.1): 1–3 — амплификация тест-системы «Амплисенс»; 2–4 — амплификация тест-системы «Биоком»

Таблица 4

Результаты денситометрического анализа зон флуоресценции ДНК с помощью программы TotalLab 1.1

| All Lane Measurements |            |            |        |            |            |        |            |            |
|-----------------------|------------|------------|--------|------------|------------|--------|------------|------------|
| Lane 1                |            |            | Lane 2 |            |            | Lane 3 |            |            |
| Band                  | Volume     | Base Pairs | Band   | Volume     | Base Pairs | Band   | Volume     | Base Pairs |
| 1                     | 442 047,70 | None       | 1      | 304 404,48 | None       | 1      | 170 586,50 | None       |
| Lane 4                |            |            | Lane 5 |            |            | Lane 6 |            |            |
| Band                  | Volume     | Base Pairs | Band   | Volume     | Base Pairs | Band   | Volume     | Base Pairs |
| 1                     | 120 672,71 | None       | 1      | 48 731,75  | None       | 1      | 1 384,76   | None       |

\*Volume — значение площади пика свечения полосы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что чувствительность тест-системы «Биоком», как минимум, в два раза ниже, чем таковая тест-системы «Амплисенс».

Данные денситометрического анализа фотоснимка коррелируют с визуальными, приведенными в таблице 4.

Таким образом, получены экспериментальные данные, доказывающие, как минимум, двукратное превышение порога чувствительности тест-системы «Амплисенс» по сравнению с тест-системой «Биоком».

Список литературы

1. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. — М.: Мир, 1999.
2. Colaizy T.T., Kuforiji T., Sklar R.S., Pillers D.A. PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview. *Mol. Genet. Metab.* — 2003 Dec;80(4):389–97.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
4. Аганов С.А. ПЦР в диагностике уреаплазм и микоплазм // *Ureaplasma.info.* — 2009. — 11 авг.
5. Rastawicki W., Kalota H., Jagielski M. et al. Comparison of polymerase chain reaction assay and Mycoplasma IST 2 test with culture for detection of infections caused by *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* // *Med. Dosw. Mikrobiol. (Poland).* — 2004. 56(1). — P. 99–108.
6. Погосян Г.П., Ли К.Г., Жуманбаева Г.К., Подоляк С.С., Шалтаева Н.А. Применение ПЦР в диагностике инфекций, передающихся половым путем, в Карагандинской области. Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб. тезисов 4-й Всерос. науч.-практ. конф. — М., 2002. — С. 62.
7. Pitcher D., Sillis M., Robertson J.A. Simple method for determining biovar and serovar types of *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates using PCR-single-strand conformation polymorphism analysis // *J.Clin. Microbiol. (United States).* — 2001. — May. — 39 (5). — P. 1840–1844.
8. Kong F., Zhu X., Wang W et al. Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded genes of *Ureaplasma urealyticum* biovar 1 // *J.Clin. Microbiol.* — 1999. — Mar.; 37(3):538–543.