

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКОБАКТЕРИЙ

**Н.И. Потапова³, Т.В. Гребенникова¹, А.Д. Забережный¹, М.А. Красно-
ва², О.И. Скотникова², Т.И. Алипер¹, Е.А. Непоклонов¹**

¹ *Институт вирусологии им. Ивановского, ул. Гамалеи, 16,
123098, Москва, Россия*

² *Московский городской научно-практический центр борьбы
с туберкулезом при Департаменте здравоохранения г. Москвы,
ул. Стромынка, 10, 107014, Москва, Россия*

³ *Кафедра фармацевтической и токсикологической химии, медицинский
факультет, РУДН, ул. Миклухо-Маклая, 8, 117198, Москва, Россия*

В статье представлена разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики *M.tuberculosis* и *M.bovis* в культурах клеток и в первичном биологическом материале. Было проанализировано 50 образцов ДНК, полученных из культур и образцов мокроты туберкулезных больных. Результаты сравнения тест-системы ПЦР в реальном времени и двух тест-систем на основе ПЦР показывают высокую сходимость результатов. Показана возможность проведения мультиплексной ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время туберкулез является одним из самых распространенных в мире инфекционных заболеваний.

Возбудитель туберкулеза – грамположительная бактерия, устойчивая к действию различных физических воздействий и химических агентов.

По уровню смертности от инфекционной патологии туберкулез занимает первое место в мире [1].

К 1993 году туберкулезом была инфицирована 1/3 населения планеты. По прогнозам экспертов ВОЗ к 2020 году в мире появится ещё 200 млн. новых случаев туберкулеза, 70 млн. человек умрет от этой инфекции. Главную опасность представляют лекарственно устойчивые штаммы микобактерий, способные превратить туберкулез в неизлечимое заболевание.

Вполне понятно, что основным методом борьбы с туберкулезом является своевременное выявление заболевания и его лечение (Барри Р., 2000).

Диагностика туберкулеза осложнена наличием более 70 самостоятельных видов рода *Mycobacterium*, которые обладают различной патогенностью.

Традиционные микробиологические методы выявления возбудителя в настоящее время уже не удовлетворяют клиницистов. Быстрый метод бастериоскопии обладает низкой чувствительностью: для обнаружения микобактерий необходимо, чтобы 1 мл материала содержал не менее 100 тыс. микробных клеток. Люминесцентная микроскопия имеет большую

чувствительность, чем стандартные методы микроскопии на 10-30%. Чувствительность бактериологического посева значительно выше – 20-100 микобактерий туберкулеза, однако исследование занимает длительное время – один-два месяца [2].

В последние годы широко используется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на ферментативной амплификации специфических участков генома [4]. Метод ПЦР отличается высокой чувствительностью, специфичностью, быстротой проведения анализа, позволяет определять как активные, так и латентные формы возбудителей заболеваний.

Самой современной и эффективной модификацией метода ПЦР является метод ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) [5]. Отличительными особенностями метода являются: более высокая скорость проведения анализа по сравнению с обычной ПЦР, повышение чувствительности метода за счет наличия внутреннего праймера (зонда), возможность не только качественного, но и количественного определения исходного генетического материала. Существенными преимуществами метода являются также снижение риска контаминации за счет проведения всех стадий ПЦР в одной пробирке, отсутствие стадии электрофореза, возможность создания мультиплексных систем, позволяющих определять несколько возбудителей в одной пробирке.

В данной статье представлена разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики микобактерий. Показана возможность дифференциальной диагностики *M.tuberculosis* и *M.bovis* с использованием образцов культур клеток и мокроты от пациентов на разных этапах развития туберкулезного процесса, полученных из Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК микобактерий. Для исследования использовали 50 образцов ДНК микобактерий, выделенных из культур (10 образцов) и мокроты пациентов с разными формами туберкулеза (40 образцов), находившихся на лечении в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом при Департаменте здравоохранения г. Москвы (МГНПЦБТ). Данные образцы также были ранее охарактеризованы бактериологическим методом.

Тест системы на основе ПЦР. Использованы тест-системы на основе ПЦР производства НПО «НАРВАК» (ТУ 9388-040-00008064-99) и Cobas Amplicor фирмы La Roche (Швейцария). Анализ проводился по методике производителей.

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Фрагменты ДНК анализировали методом гель-электрофореза, используя Трис-ацетатный буфер, содержащий бромистый этидий в концентрации 0,4 – 0,5 мкг/мл. Гели анализировали, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм. Фотографирование гелей осуществлялось фотокамерой «Полароид» с оранжевым светофильтром.

Синтетические олигонуклеотиды, флуоресцентные зонды. Подбор олигонуклеотидов (праймеров) произведен на компьютере Power Macintosh 6100/66 с помощью программ: Amplify 1,0; Oligo 4,0-s; AssemblyIGN.

Для проведения ПЦР в реальном времени были подобраны 4 пары специфических олигонуклеотидных праймеров. Первая пара олигонуклеотидов mtp40F-mtp40R, с помощью которых получен фрагмент в 119 пар оснований, имела специфические места посадки на гене, присутствующем только в геноме *M.tuberculosis*. Вторая пара олигонуклеотидов mpb70F- mpb70R, с помощью которых получен фрагмент в 84 пары оснований, специфична гену, входящему в состав генома не только *M.tuberculosis*, но и *M.bovis*. Флуоресцентные зонды имеют места посадки внутри последовательностей, ограниченных первой и второй парой олигонуклеотидов и имеют следующие пары краситель-гаситель флуоресценции: 5'FAM-3'TAMRA и 5'TAMRA-3'BNQ2. Синтез олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов произведен в ЗАО «Синтол» г.Москва.

Проведение ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили на приборе Applied Biosystems ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System. Использовали следующие параметры ПЦР: 1 цикл - 95°C, 10 минут; 45 циклов - 95°C, 15 секунд, 60°C, 1 минута. Реакционная смесь, конечным объемом 25 мкл, содержала 5 мкл ДНК, 10 pmol каждого олигонуклеотидного праймера, 2 pmol флуоресцентного зонда и 12,5 PCR-раствора, содержащего ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, буфер, пассивный контроль (краситель ROX). Результаты ПЦР в реальном времени отслеживались на экране монитора компьютера в виде графиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время получили широкое распространение такие молекулярные методы диагностики микобактерий как полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод молекулярной гибридизации и секвенирования различных участков ДНК. ПЦР является удобным методом, сочетающим высокую чувствительность, специфичность и быстроту. В настоящее время разработаны различные тест-системы с использованием полимеразной цепной реакции, которые широко используются в лабораториях в качестве дополнительного метода определения микобактерий [6,7]. Метод ПЦР позволяет проводить анализ в довольно короткие сроки, что является очень важным в диагностике туберкулеза. Целью данной работы была разработка нового метода молекулярной диагностики туберкулеза на основе ПЦР в реальном времени и использование его для определения ДНК патогенных микобактерий, дифференцирования их от «атипичных» видов, а в будущем – осуществления мониторинга лечения.

Создание тест-системы видовой диагностики туберкулеза на основе ПЦР в реальном времени.

Для разработки тест-системы на основе ПЦР в реальном времени необходимо было подобрать специфические праймеры для проведения полимеразной реакции на матрице *M.tuberculosis* и *M.bovis*, а также дополнительный праймер-зонд, специфичный внутренней области фрагмента ПЦР. Наличие такого зонда составляет особенность ПЦР в реальном времени - за счет такого зонда повышается специфичность реакции по сравнению с обычной ПЦР. Существует несколько вариантов проведения ПЦР в реальном времени. Мы выбрали такую модификацию, при которой праймер-зонд имеет флуоресцентный краситель на 5'-конце и гаситель флуоресценции на 3'-конце. Краситель и гаситель – химические соединения, производные флуоресцеина и родамина, имеющие различные коэффициенты абсорбции и эмиссии. В процессе реакции в каждом цикле происходит накопление в реакционной смеси как продуктов амплификации, так и флуоресцентного красителя, отщепляющегося благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности термостабильной ДНК-полимеразы. Удобство метода заключается в том, что регистрацию прироста флуоресценции, а, следовательно, и результаты амплификации можно проследить в процессе протекания реакции. Результаты выводятся на экран монитора в виде графика, характеризующего амплификацию фрагмента ДНК.

Для создания тест-системы были подобраны олигонуклеотидные последовательности и зонды, позволяющие дифференцировать *M.tuberculosis* и *M.bovis*. Испытание олигонуклеотидов с помощью метода ПЦР в реальном времени дали положительные результаты при использовании ДНК, выделенной из культур *M.tuberculosis* и *M.bovis* (табл. 1).

Таблица 1

Результаты испытания тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, полученные на матрице ДНК, выделенной из культур *M.tuberculosis* и *M.bovis*.

№ образца	Результаты бактериологии	Результаты, полученные методом ПЦР			
		Нестед-ПЦР		ПЦР в реальном времени	
		обнаружение ДНК <i>M.tuberculosis</i>	обнаружение ДНК <i>M.bovis</i>	обнаружение ДНК <i>M.tuberculosis</i>	обнаружение ДНК <i>M.bovis</i>
1	<i>M.bovis</i>	-	+	-	+
2	<i>M.bovis</i>	-	+	-	+
3	<i>M.bovis</i>	-	+	-	+
4	<i>M.bovis</i>	-	+	-	+
5	<i>M.tuberculosis</i>	+	-	+	-
6	<i>M.tuberculosis</i>	+	-	+	-
7	<i>M.tuberculosis</i>	+	-	+	-
8	<i>M.tuberculosis</i>	+	-	+	-
9	<i>M.bovis</i> BCG	-	+	-	+
10	<i>M.bovis</i> BCG	-	+	-	+

Создание мультиплексной тест-системы на основе ПЦР в реальном времени.

Одним из главных преимуществ метода ПЦР в реальном времени является возможность создания мультиплексной тест-системы, что заключается в возможности проведения в одной пробирке определения не-

скольких видов возбудителя. Для рутинной ПЦР также создаются тест-системы на основе множественной ПЦР, однако разработка таких тест-систем является сложным и трудоемким процессом. Нами произведена попытка создания такой тест-системы. Для исследования использовались 40 проб, полученных от пациентов из МНПЦБТ. При постановке мультиплексной или множественной ПЦР в реальном времени в реакционную смесь добавляли две пары праймеров и два зонда. В нашем случае исследования были направлены на обнаружение одновременно ДНК *M.tuberculosis* и *M.bovis*. В образце присутствовали ДНК *M.tuberculosis* и *M.bovis* одновременно. Результат эксперимента показывает возможность определения двух видов возбудителей в одной реакции ПЦР (рис. 1).

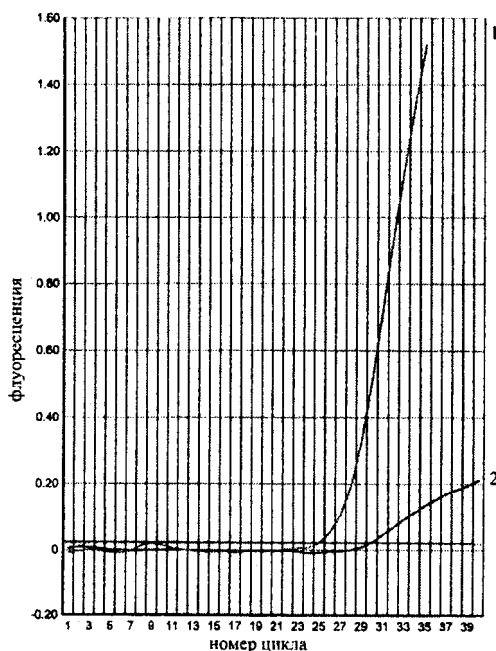


Рис 1. Результаты испытаний мультиплексной тест-системы для одновременного обнаружения ДНК *M.tuberculosis* (1) и ДНК *M.bovis* (2)

Такая методика, несомненно, уменьшает временные затраты при проведении дифференциальной диагностики микобактерий.

Сравнительный анализ тест-систем на основе ПЦР и ПЦР в реальном времени с использованием проб мокроты, полученных от пациентов МНПЦ борьбы с туберкулёзом

Разработанную тест-систему на основе ПЦР в реальном времени сравнивали с тест-системами НПО «НАРВАК» и фирмы «La Roche». Для этого ДНК, выделенную из проб мокроты больных, анализировали методом ПЦР, используя тест-системы НПО «НАРВАК» и фирмы «La Roche», а также разработанной тест-системой на основе ПЦР в реальном времени.

Тест-система НПО «НАРВАК» основана на одной из модификаций ПЦР – «гнездовой» ПЦР и позволяет проводить дифференциальную диагностику микобактерий. В тест-системе используются праймеры к спе-

цифическим фрагментам геномов различных микобактерий и позволяющие дифференцировать *M. tuberculosis* и *M. bovis* от других «атипичных» штаммов микобактерий. Тест-система была проверена более чем на 1500 образцов от животных и клинических образцов от людей и показала высокую сходимость результатов диагностики методом ПЦР с классическими методами детекции микобактерий [9].

Тест-система фирмы «La Roche» позволяет эффективно определять микобактерии туберкулезного комплекса в культурах и первичном биологическом материале [10].

Таблица 2

Результаты сравнения ПЦР и ПЦР в реальном времени с использованием первичного биологического материала (проб мокроты)

№ образца	ПЦР с использованием тест-системы «La Roch»	Нестед-ПЦР с использованием тест-системы НПО (обнаружение ДНК <i>M. tuberculosis</i>)	ПЦР в реальном времени (обнаружение ДНК <i>M. tuberculosis</i>)
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	-
15	+	-/+	+
16	+	-	-
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	+
21	+	-	-
22	+	+	+
23	+	-/+	+
24	+	+	+
25	+	-/+	+
26	+	-	-
27	+	-	-
28	+	-	-
29	+	+	+
30	+	+	+
31	+	-	-
32	+	+	-
33	+	+	+
34	+	-/+	+
35	+	+	+
36	+	+	+
37	+	+	+
38	+	+	+
39	+	-	-
40	+	+	-
41	+	+	+
42	+	+	+
43	+	+	+
44	+	+	-
45	+	+	+
46	+	+	+
47	+	-/+	+
48	+	-	-
49	+	+	-
50	+	+	+
51	+	-	+

Результаты сравнения трех тест-систем представлены в табл. 2. Подробно рассмотрим случаи несовпадения результатов ПЦР и ПЦР в реальном времени

ном времени. В пяти случаях мы получили положительный результат при использовании ПЦР и отрицательный результат - при использовании ПЦР в реальном времени (образцы № 14, 32, 40, 44 и 49). Причина таких результатов может заключаться в наличии специфических ингибиторов ПЦР в реальном времени, снижающих эффективность ПЦР. В пяти случаях мы получили слабый сигнал при использовании ПЦР, вероятно причиной явилось очень низкое содержание микобактерий в мокроте (образцы №15, 23, 25, 34, 47). Однако ПЦР в реальном времени показала положительный результат при анализе этих образцов. Шесть образцов (№ 16, 26, 27, 28, 31, 39), положительных при исследовании тест-системой фирмы «La Roche», были отрицательными по результатам тестирования генома микобактерий тест-системой НПО «НАРВАК» и ПЦР в реальном времени. Это объясняется тем, что тест-система фирмы «La Roche» определяет ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, а в состав микобактерий туберкулезного комплекса может входить не только *M. tuberculosis*, но и *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum* и *M.microti*. Результаты, представленные в таблице для тест- системы НПО «НАРВАК» и тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, показывают наличие генома *M. tuberculosis*. Более подробное исследование проб подтверждает такое объяснение.

Исследование показало, что ПЦР в реальном времени можно использовать при работе с первичным материалом без предварительного культивирования. Результаты исследований с помощью ПЦР в реальном времени анализировались на экране монитора в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов (рис. 2 А, Б).

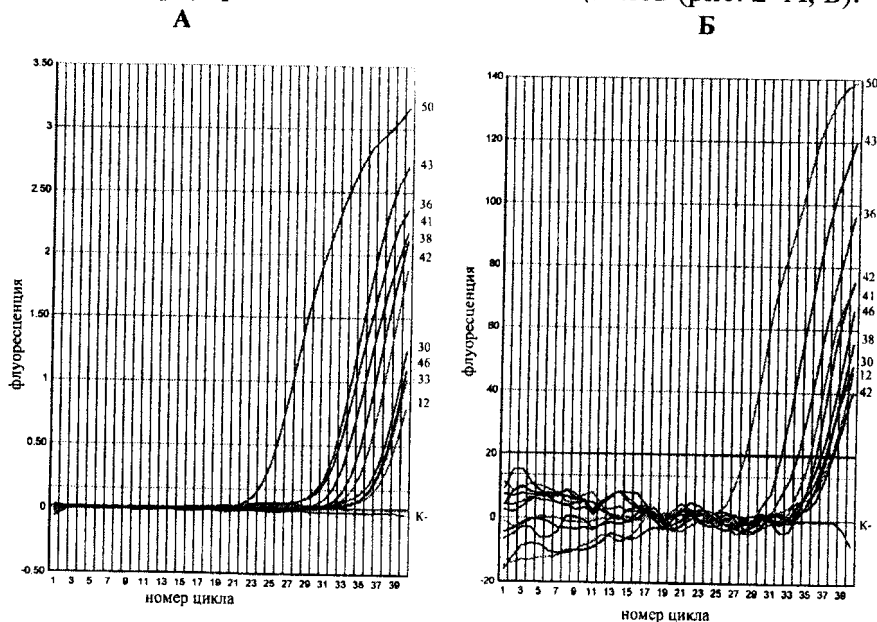


Рис.2. Результаты обнаружения ДНК *M.tuberculosis* (А) и ДНК *M.bovis* (Б) методом ПЦР в реальном времени. Цифры справа соответствуют номерам проб в табл.1. К - отрицательный контроль

Таким образом, сравнительный анализ двух тест-систем на основе метода ПЦР с разработанной тест-системой ПЦР в реальном времени показал высокую сходимость результатов. Чувствительность ПЦР в реальном времени не ниже чувствительности «гнездовой» ПЦР и составляет 10^{-15} г ДНК микобактерий в образце. Однако при постановке ПЦР в реальном времени исключается получение ложноположительных результатов, за счет исключения стадии электрофореза и необходимости открытия пробирки после амплификации.

Разработанный метод ПЦР в реальном времени можно с успехом использовать для быстрой и эффективной диагностики микобактерий как в культурах так и в образцах первичного биологического материала. Показана возможность определения двух видов возбудителя в ходе одной ПЦР реакции в реальном времени, что позволит существенно сократить время проведения анализа. Все это делает метод ПЦР в реальном времени незаменимым для лабораторной диагностики туберкулеза и проведения мониторинга лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Raviglion M., Smnider D.E., Kochi A.* (1995) Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwid epidemic. *JAMA*, 273: 220-226.
2. *Бочкарев Е.Г., Денисова Т.С., Генерозов Э.В., Говорун В.М., Никитченко Е.Ю., Черноусова Л.Н., Кузнецов П.В.* Генодиагностика во фтизиатрии /Пособие для врачей.- М.: НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ, НПФ «Литех» 2000г.
3. *Туберкулез. Патогенез, защита, контроль: Пер. с англ./ Под ред. Барри Р.Блума.- М.: Медицина, 2002.- 696 с.: ил.*
4. *Mullis K. B. and Faloona F. A.* // Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. – *Method Enzymol.* - 1987. - №155. – P. 335-350
5. *Izhar U. H. Khan, Jagjit S. Yadav* // Real-time PCR assay for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metal-working fluids. – *Molecular and Cellular Probes.* – 2004. - №18. – P. 67-73.
6. *Liebana E., Aranaz A., Mateos A., Vilafranca M., Gomes-Mampaso E., Tercero J. C., Alemany J., Suares G., Domingo N., Domingues L.* // Simple and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in bovine tissue samples by PCR. – *Journal of clinical Microbiology.* – 1995. – Vol. 33. - №1. – P. 33-36.
7. *Zvizdic S., Dizdarevic Z., Ridanovic Z.* // Modern methods in the diagnosis of tuberculosis: PCR-polymerase chain reaction. - *Med. Arh.* - 1999. – Vol. 53. -№1. – P. 13-7.
8. *Grebennikova T. V., Nepoklonov E. A.,* // Detection and identification of Mycobacteria isolates from human clinical samples.// 1999, 9th ECCMID, March 21-24, Berlin, Germany, p. 204.
9. *Гребенникова Т. В., Грабовецкий. И. И., Шумский Н. И., Кальнов С. Л., Непоклонов Е. А.* // Дифференциальная диагностика микобактерий методом полимеразной цепной реакции. - 1999. - *Ветеринария* - №3. - P. 17-20.
10. *Ninet B, Rohner P, Metral C, Auckenthaler R* // Assessment of use of the COBAS AMPLICOR system with BACTEC 12B cultures for rapid detection of frequently identified mycobacteria. – *J. Clin. Microbiol.* - 1999. - Vol. 37. - № 3. – P. 782-784.

**DEVELOPMENT OF TEST-SYSTEM BASED ON REAL-TIME PCR
FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC OF MYCOBACTERIA**

**N.I. Potapova³, T.V. Grebennikova¹, A.D. Zaberezhny¹,
M.A. Krasnova², O.I. Skotnikova², T.I. Aliper¹, E.A. Nepoklonov¹**

¹*Ivanovsky Virology Institute, Gamalei str., 16, 123098, Moscow, Russia*

²*Moscow City Research Center for Tuberculosis Control, Moscow Health de-
partment, Stromunka str., 10, 107014, Moscow, Russia*

³*Department of pharmaceutical and toxicological chemistry, medical fac-
ulty, RPFU, Miklukho-Maklaya, 8, 117198, Moscow, Russia*

In the paper we present development of the test-system for differential detection of *M.tuberculosis* and *M.bovis* by Real-time PCR and comparison of this method with classical PCR. Fifty samples of DNA, isolated from cell cultures and sputum of patient with tuberculosis. Comparison of two test-systems based on PCR and Real-time PCR showing high correlation between the data sets. The possibility of Multiplex Real-time PCR has been demonstrated.