

О. О. Литовченко

ЗАСТОСУВАННЯ ГНІЗДНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ І ГЕНОТИПУВАННЯ ХЛАМІДІЙ

У статті описана розроблена автором методика визначення ДНК хламідій, заснована на гніздній ПЛР, і метод верифікації результатів за допомогою додаткової ампліфікації фрагмента ДНК критичної плазмиди збудника. Показано, що застосування гніздної ПЛР дає можливість провести генотипування збудника по ДНК клінічного зразка

Ключові слова: гніздна ПЛР, хламідії, генотипування

1. Вступ

Дослідження, про яке йдеться у доповіді, відносяться до галузі біохімії. Сучасні дослідження молекулярних і клітинних процесів вимагають застосування методів аналізу, що характеризуються високою чутливістю і специфічністю, одним з актуальних напрямків розробки таких методів є використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). До найбільш чутливих варіантів її належить гніздна ПЛР, застосування якої дозволяє значно розширити можливість дослідження процесів життєдіяльності мікроорганізмів, біохімічні і генетичні основи патогенності. У зв'язку з цим дослідження, що викладається в доповіді, є актуальним.

2. Постановка проблеми

Використання гніздного варіанта ПЛР дозволяє значно підвищити чутливість дослідження, але вимагає розробки додаткових праймерів і умов проведення другого туру ампліфікації. Крім того, висока чутливість гніздної ПЛР значительно збільшує небезпеку контамінації, хибнопозитивні результати виникають при влученні у реакційне середовище навіть поодиноких молекул ампліконів. У роботі проведений підбір праймерів, розробка методики дослідження, відпрацювання контролів, а також застосування розроблених методів для діагностики хламідіозу і генотипування збудників.

3. Основна частина

3.1. Аналіз літературних джерел по темі дослідження

У роботі [1,2] приведені результати застосування гніздної ПЛР для діагностики хламідіозу, отримані результати свідчать про те, що застосування цього варіанта методу значно збільшує число позитивних результатів дослідження, що може забезпечити більш повну характеристику епідеміології хламідіозу і більш ефективну його

профілактику. Разом з цим, у зазначених роботах не приводяться методи контролю специфічності результатів дослідження. Відомо, що гніздна ПЛР має збільшену небезпеку контамінації екзогенною ДНК чи ампліконами. Без цілеспрямованої роботи з виключення хибнопозитивних результатів, зв'язаних з контамінацією, використання гніздної ПЛР може призводити до помилкових результатів.

Питання коректності результатів дослідження і методології виключення хибнопозитивних результатів належать до пріоритетів ряду робіт [3-5], які стали підставою для розробки системи контролів, застосованих у цьому дослідженні [6].

3.2. Результати дослідження

У якості матриці, що ампліфікується, була обрана ділянка криптичної плазмиди хламідій, у першому турі ампліфікації використовували праймери 5'-AACC GTTTT TAATAGTGGCA-3' і 5'-TTCTGGCCAAGAATTATCC-3', у другому турі - 5'-AACC GTTTT TAATAGTGGCA-3' і 5'-CTGCTGTA-ATCACCCAGTCG-3'.

Розроблена тест-система давала гарні результати при перевірці зі стандартними зразками культури хламідій, не було виявлено перехреста з культурами мікроорганізмів, отримані позитивні результати перевірки з контрольною панеллю ФДУН «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Роспотребнадзора» (РФ) СР-2 «S.trachomatis, U.spp., M.hominis». При дослідженні 12 зашифрованих зразків зазначеної контрольної панелі були отримані результати, що цілком збігалися з референтними значеннями.

Зазначені контрольні зразки були використані для визначення абсолютної чутливості системи на підставі отриманих після контрольного дослідження даних про вміст у них копій ДНК хламідій. Для цього робили серію дворазових розведень контрольного зразка і визначали в них наявність ДНК хламідій за допомогою розробленої системи. Отримані результати свідчать, що розроблена система виявляє поодинокі копії криптичної плазмиди хламідій.

Чутливість розробленої тест-системи перевершує цей показник у ряду комерційних систем, але внаслідок підвищеної загрози контамінації вимагає обов'язкової систематичної верифікації позитивних результатів.

Для цього була розроблена друга полугніздна тест-система, яка ампліфікувала іншу ділянку криптичної плазмиди за допомогою додаткової полугніздної системи праймерів, у якій використовували в першому турі праймери 5'-GACGGTTCTTAAGCTGGGAGAAAG-3' і 5'-ATGCATT-GGACCGCATCACTCAA-3, а в другому 5'-GACGGTTCTTAA-GCTGGGAGAAAG і 5'-ACTAAACAAGTTCGAGCAGCAAGC-3'. Вона використовувалась періодично для контролю позитивних результатів, одержаних з першою системою ампліфікації. Як правило, результати двох систем збігались. Розбіжність результатів основного і контрольного дослідження вважались ознакою хибнопозитивності і свідчили про необхідність проведення деконтамінації.

За подібною схемою, але з іншими праймерами, гніздна ПЛР була використана для генотипування збудника хламідіозу безпосередньо по ДНК, виділеної з клінічних зразків. Для цього ампліфікували двома системами праймерів ген головного білка зовнішньої мембрани і вивчали його варіабельність методом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів з використанням рестриктаз AluI, HinfI, CfoI.

Проведені дослідження виявили, що в Північно-східному регіоні України циркулюють хламідії, що належать переважно до генотипів E, F і G.

Таким чином, використання гніздної ПЦР може забезпечити більш ефективний контроль хламідійної інфекції, однак при її використанні необхідно виключити імовірність помилкових хибнопозитивних результатів, пов'язаних з контамінацією, використовуючи систему моніторингу і контролю за допомогою «дублюючої» тест-системи з подібними параметрами по чутливості і специфічності.

Литература

1. Lan, J. Improved PCR sensitivity for direct genotyping of Chlamydia trachomatis serovars by using a nested PCR [Text] / J. Lan, J.M. Ossewaarde, J.M.M. Walboomers, C.J.L.M. Meijer, A.J.C. van den Brule // J. Clin. Microbiol., 1994. – V.32. – P.528–530.
2. Sachse, K. Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR [Text] / K. Sachse, H. Holzel. – Totowa, NJ.: Humana. Press Inc., 2002. – P. 123-136. – (PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols; Vol. 216).
3. Петренко, А.Ю. Влияние магнитных наночастиц Fe₃O₄ на жизнеспособность, прикрепление и распластывание изолированных клеток плодов и новорожденных крыс [Текст] / А.Ю. Петренко, А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, В.И. Грищенко, Т.Д. Ляшенко // Цитология. – 2011. – Том 53, N 4. – С. 347-354. – ISSN 0041-3771.
4. Петренко, А.Ю. Характеристика иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека после криоконсервирования [Текст] / Ю.А. Петренко, Н.Г. Скоробогатова, Н.А. Волкова, А.Ю. Петренко // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 436-442.
5. Черкашина, Д.В. Производное пластохинона SkQ1, адресованное в митохондрии, снижает ишемически-реперфузионные повреждения печени при гипотермическом хранении для трансплантации [Текст] / Черкашина Д.В., Сосимчик И.А., Семенченко О.А., Волина В.В., Петренко А.Ю. // Биохимия. – 2011. – т. 76, вып. 9. – С.1254-1263.
6. Литовченко, О.А. Полугніздный метод ПЦР-диагностики хламидийных инфекций [Текст] / О.А. Литовченко, А.Ю. Петренко // Иммунология та алергологія: наука і практика. – 2011. – № 4. – С.97.

ПРИМЕНЕНИЕ ГНЕЗДНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ХЛАМИДИЙ

О. А. Литовченко

В статье описана разработанная автором методика определения ДНК хламидий, основанная на гнездной ПЦР, и метод верификации результатов с помощью дополнительной амплификации фрагмента ДНК критической плазмиды возбудителя. Показано, что применение гнездной ПЦР дает возможность провести генотипирования возбудителя по ДНК клинического образца

Ключевые слова: гнездная ПЦР, хламидии, генотипирование

Ольга Алексеевна Литовченко, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины», тел. (057) 706-32-02, e-mail olgabelozorova@gmail.com

NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSTIC AND GENOTYPING OF CHLAMYDIA

O. Lytovchenko

The article describes the method of determination of chlamydial DNA, worked out by the author, based on nested PCR, and method of results verification by means of additional amplification of chlamydial cryptic plasmid DNA fragment. It is shown that application of nested PCR gives an opportunity to conduct genotyping of chlamydia investigating clinical sample DNA

Keywords: nested PCR, chlamydiae, genotyping

Olga Lytovchenko, junior scientist of laboratory of molecular genetic of SE "Institute of dermatology and venerology of the national academy of medical sciences", tel. (057) 706-32-02, e-mail olgabelozorova@gmail.com