

А. Р. МАНАСЯН, Г. П. ПОГОСЯН, К. Г. ЛИ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕПАТИТА С МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

(Карагандинский государственный университет им. Е. А. Букетова)

Обсуждается проблема молекулярно-генетического анализа гепатита С методом ПЦР в режиме реального времени. Приводится сравнительный анализ чувствительности двух тест-систем. Показаны преимущества и недостатки каждой из них. Проведен количественный анализ, выявлена вирусная нагрузка в плазме крови исследуемых пациентов.

Гепатит С является распространенным трудно диагностируемым заболеванием с тяжелыми последствиями. В связи этим своевременная и качественная диагностика приобретает особую актуальность.

По данным ВОЗ около 3% мирового населения инфицированы HCV.

В настоящее время наиболее достоверными методами диагностики гепатита С являются иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция, ПЦР, основанная на детекции специфических участков ДНК или РНК возбудителей гепатитов [1]. В области вирусных гепатитов этот метод является одним из основных. В частности,

использование ПЦР позволяет решить задачи в плане диагностики.

В последнее время во многих лабораториях мира все чаще используется ПЦР в реальном времени. Эта методика имеет ряд безусловных преимуществ по сравнению с электрофорезным методом. Она позволяет оценить результаты в процессе реакции. Кроме того, возможен количественный анализ полученных данных [2, 3].

Целью исследования являлось сравнение чувствительности тест-систем для диагностики гепатита С фирм «АмплиСенс» и «ДНК-Технология».

Материалы и методы

Объектом исследования явилась плазма крови пациентов гематологических, гастроэнтерологических отделений клиник г. Караганды.

Процедуру выделения РНК с использованием реагентов фирмы «Амплисенс» проводили с применением сорбента в соответствии с предлагаемой методикой. При изучении амплификации РНК вируса гепатита С с использованием набора реактивов компании «ДНК Технология» придерживались соответствующих инструкций.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в амплификаторе ДТ-322, поддерживающем режим «real-time».

Учёт и интерпретацию результатов реакции осуществляли автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором ДТ-322.

Результаты и обсуждение

Скрининговые эксперименты проводили, анализируя результаты амплификации процедурой электрофореза. Так как эта методика не требует больших затрат и аппаратуры, то выявление положительных результатов из общего числа анализов осуществляли с ее помощью. Из 73 проанализированных образцов плазмы РНК вируса гепатита С обнаружили в 31, которые и явились объектами нашего исследования.

Из указанных образцов выделяли РНК, применяя наборы реактивов фирмы «ДНК-технология». Поскольку молекула РНК не обладает способностью к репликации, для амплификации проводили реакцию обратную транскрипции [4, 5]. С молекулами ДНК ставили полимеразную цепную реакцию в амплификаторе ДТ-322, который относится к аппаратам, осуществляющим репликацию в режиме реального времени.

Полученные данные интерпретировали с помощью программного обеспечения прибора ДТ-322 по определению пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения цикла « C_t » в соответствующей графе в таблице результатов). Каждый раз анализировали результаты амплификации участка РНК гепатита С и внутреннего контрольного образца (ВКО). Накопление продукта амплификации ВКО проходит по каналу детекции флуорфора FAM [6].

Перед началом каждого анализа задавали концентрацию калибраторов. Калибраторы K1, K2, K3 по каналу HEX устанавливали как «Standard» и указывали концентрацию, а по каналу FAM – обозначали как «Unknown». Калибраторы B1, B2, B3 по каналу FAM задавали как «Stangard» и указывали концентрацию, а по каналу HEX обозначали как «Unknown». ВКО.

Протоколы одного из исследований, включающих тестирование шести образцов, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты амплификации фрагментов ДНК по параметру HEX

№	Идентификатор	Ct (Cp)	Концентрация
A1	1	37,5	1,0
A2	2	30,8	100
A3	3	35,8	3,1
A4	4	31,1	84,0
A5	5	33,1	20,0
A6	6	32,9	23,0
A7	– Выд	32,3	36,0
A8	ПКО 1	33,4	16,0
B1	ПКО 2	35,7	3,2
B2	K1		
B3	K2		
B4	K3		
B5	B1	27,4	1100
B6	B2	32,4	33,0
B7	B3	33,9	11,0
B8	– ПЦР	14,2	9 900 000

Примечание. 1, 2, 3, 4, 5, 6 – испытуемые образцы; – Выд – отрицательный контроль выделения РНК; ПКО 1 и ПКО 2 – положительные контрольные образцы, поставленные в процессе выделения РНК; K1, K2, K3 – положительные контрольные образцы ПЦР; B1, B2, B3 – внутренние контрольные образцы. – ПЦР – отрицательный контроль ПЦР.

На рис. 1 показан результат этого же исследования в графическом изображении. Цветами на диаграмме обозначены различные молекулы ДНК, проанализированные в данном эксперименте.

В данном эксперименте анализировалось 6 образцов с номерами: 1, 2, 3, 4, 5, 6. Каждое исследование проведено в двух повторностях, так как аппарат регистрирует интенсивность свечения по двум параметрам: внутреннему контрольному образцу и специфическому фрагменту кДНК вируса гепатита С.

Из таблицы видно, что не регистрируется свечение в образцах K1, K2 и K3, поскольку параметр HEX определяет внутренние контрольные

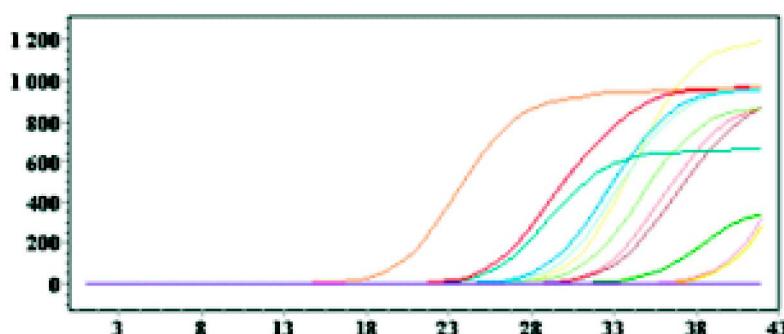


Рис. 1. График определения относительной концентрации по Флуорофору HEX

образцы, обозначенные в данной таблице как В1, В2, В3.

Процесс амплификации длился чуть более двух часов, и была возможность наблюдать за развитием полимеразной цепной реакции непосредственно в процессе ее прохождения. За процессом реакции можно было следить, наблюдая на мониторе поступающие данные с аппарата ДТ-322.

Определение относительной концентрации по флуорофору FAM, показывающему специфические фрагменты искомых фрагментов ДНК и регистрирующему ПКО, приведено в табл. 2.

Таблица 2. Результаты амплификации фрагментов ДНК по параметру FAM

№	Идентификатор	Ct (Cp)	Концентрация
A1	1	30,2	170
A2	2	27,9	800
A3	3	28,2	670
A4	4	23,1	22 000
A5	5	27,0	1500
A6	6	26,3	2400
A7	- Выд	37,2	1,3
A8	ПКО 1	37,5	1,0
B1	ПКО 2	30,4	140
B2	K1	17,2	1 300 000
B3	K2	23,7	15 000
B4	K3	33,5	16,0
B5	B1		
B6	B2		
B7	B3		
B8	- ПЦР		

Примечание. – Выд – отрицательный контроль выделения РНК; ПКО 1 и ПКО 2 – положительные контрольные образцы, поставленные в процессе выделения РНК; K1, K2, K3 – положительные контрольные образцы ПЦР; B1, B2, B3 – внутренние контрольные образцы; – ПЦР – отрицательный контроль ПЦР.

Как видно из настоящей таблицы, не регистрируется флуоресценция в ячейках с номерами B5, B6, B7 и B8, соответствующие образцам B1,

B2, B3 и – ПЦР, что доказывает достоверность полученных результатов.

В настоящем эксперименте было испытано 6 образцов РНК. Для каждого из них определено количество копий вирусных частиц, приведенных в таблицах.

Из всех изученных образцов в двух случаях концентрация вирусных частиц составляла 10^5 , в трёх 10^6 и в четырёх случаях составилось 10^7 копий на 1 мл, в остальных – 10^3 копий на 1 мл. В девяти образцах количество вирусных частиц, определенных описанным методом совпадало с данными, полученными детекцией методом электрофореза. Во всех остальных – анализ с применением ПЦР в режиме реального времени оказался более чувствительным на 1 или на 2 порядка.

Определение вирусной нагрузки необходимо, поскольку использование результатов ПЦР позволяет выявлять инфекцию в самом раннем периоде заболевания. РНК HCV обнаруживается в сыворотке крови уже в течение первой недели после инфицирования. Количественное определение РНК HCV способствует мониторированию пациентов, получающих противовирусную терапию, т.к. этот показатель дает возможность не только оценивать эффективность терапии, но и прогнозировать ее. Так, концентрация РНК выше 400 000 копий/мл требует более продолжительного лечения и более высоких доз противовирусных препаратов.

По окончании экспериментов с использованием тест-систем фирмы «ДНК-Технология» приступили к исследованиям, применяя наборы реактивов фирмы «АмплиСенс». Реакции амплификации осуществляли также в аппарате ДТ-322.

В отличие от предыдущих анализов согласно методике, реакции обратной транскрипции и амплификации ставили одновременно, для чего в реакционную смесь добавляли как Таq-полимеразу, так и ревертазу. Это позволяло сэкономить

реактивы, так как две реакции проходили одновременно в одной пробирке. Однако при недостатке времени такое совмещение реакций оказалось неудобным.

Полученные результаты также проходили на программном обеспечении «режима реального времени».

Данные для программирования получали по формуле:

$$\frac{\text{Число копий кДНК HCV в ПЦР_пробе}}{\text{Число копий кДНК HCV в ПЦР_пробе}} \cdot \text{коэффициент} = \\ = \text{МЕ HCV / мл плазмы крови},$$

где МЕ – международные единицы; коэффициент (число МЕ ВКО/мл плазмы).

Результат данных экспериментов по параметрам FAM приведен в табл. 3.

В данной таблице приведены показатели 7 проанализированных образцов крови, обозначенных цифрами 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11. Из таблицы видно, что выявляются различные концентрации вирусных частиц в исследуемых образцах. Все образцы тестировались двукратно по каждому из параметров (FAM и HEX).

Таблица 3. Результаты амплификации фрагментов ДНК по параметру FAM

№	Идентификатор	Ct (Cp)	Концентрация
A1	2	30,4	1,17
A2	2	31,2	5 500 000
A3	4	31,9	4 400 000
A4	4	31,5	4 200 000
A5	5	35,9	31 000
A6	5	35,1	30 000
A7	6	35,1	110 000
A8	6	35,5	130 000
B1	7	31,0	6 600 000
B2	7	31,3	6 700 000
B3	8	37,7	56 000
B4	8	37,0	51 000
B5	10	35,7	160 000
B6	10	35,0	140 000
C1	ct1	33,3	1 600 000
C2	ct1	33,3	1 300 000
C3	ct1	33,3	1 500 000
C4	ct2	40,0	3000
C5	ct2	40,5	4000
C6	ct2	40,9	5000
C7	K-		
C8	K+	25,9	3,88

Графическое изображение различных образцов амплифицированных фрагментов ДНК описанного эксперимента приведено на рис. 2.

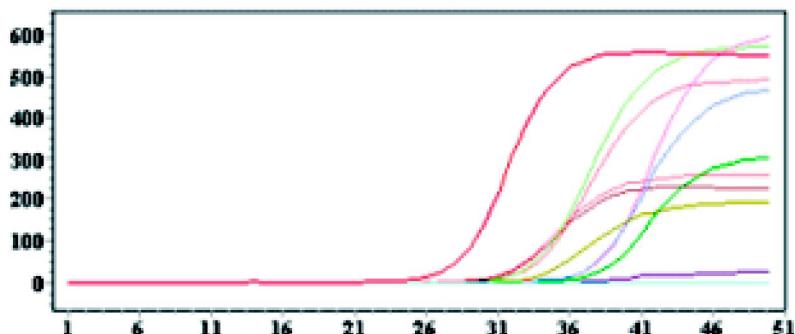


Рис. 2. Отчет по результатам анализа ПЦР фирмы «АмплиСенс»; Флуорофор FAM

Выявляются концентрации вирусных частиц в зависимости от внесенного внутреннего контроля, который определяется флуорофором HEX.

На основании полученных результатов можно сделать следующий вывод. Проведен сравнительный анализ результатов, полученных с помощью наборов реактивов фирм «ДНК-технология» и «АмплиСенс», определены преимущества каждой из них.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Пер. с англ.

М.: Мир, 2002. 589 с.

2. Heid C.A. Real-time quantitative PCR // Genome Res. 1996. № 6. P. 986-994.

3. Higuchi R. Kinetic PCR Analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. 11. P. 1026-1030.

4. Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A.A. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution // BioTechniques. 1995. № 13. P. 444-449.

5. Saha B. K., Tian B., Bucy R. P. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe // Journal of Virological Methods. 2001. 93. P. 33-42.

6. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays // Journal of Molecular Endocrinology. 2000. 25. P. 169-193.

Резюме

Шынайы уақыт режимінде ПТР өдісімен С гепатитін молекулярлы генетикалық талдау мәселелері талқыланады 2 тест-жүйелерінің сезімталдылығына салыстырмалы талдау ұсынылған. Олардың әрқайсысының артықшылықтары мен кемшіліктері көрсетілген. Сандық талдау жүргізіліп, қаралып жатқан науқастардың қан плазмасындағы вирус жүктемесі анықталды.

Summary

In this article the problem of molecular genetic analysis of hepatitis C by PCR method is discussed. Comparative analysis of two systems sensitivity is presented. Advantages and disadvantages of each of systems are showed. Quantitative analysis is realized, copies of virus in plasma of patients blood are revealed.