

УДК 577.21

A. P. 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 пред-

лагаемой 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».

Учет 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 граfe 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 флуорофора FAM [6].

Перед началом каждого анализа задавали концентрацию калибраторов. Калибраторы K1, K2, K3 по каналу НЕХ 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 НЕХ обозначали как «Unknown». ВКО.

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

Таблица 1. Результаты амплификации фрагментов ДНК по параметру НЕХ

| № | 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 | пкг1 | 33,4 | 16,0 |
| B1 | пкг2 | 35,7 | 3,3 |
| B2 | K1 | | |
| B3 | K2 | | |
| B4 | K3 | | |
| B5 | B1 | 27,4 | 1 100 |
| B6 | B2 | 32,4 | 33,0 |
| B7 | B3 | 33,9 | 11,0 |
| B8 | -ппр | 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, т.к. аппарат регистрирует интенсивность свечения по двум параметрам: внутреннему контрольному

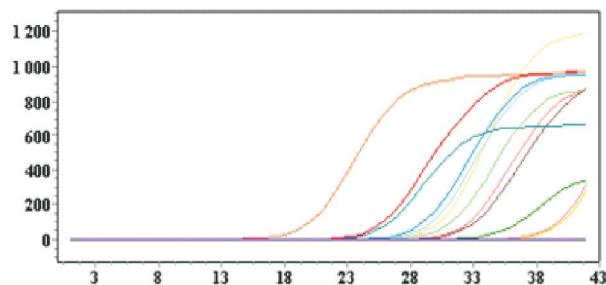


Рис. 1. График определения относительной концентрации по Флуорофору НЕХ

образцу и специальному фрагменту кДНК вируса гепатита С.

Из таблицы видно, что не регистрируется свечение в образцах K1, K2 и K3, поскольку параметр НЕХ определяет внутренние контрольные образцы, обозначенные в данной таблице как B1, B2, B3.

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 | 1 500 |
| A6 | 6 | 26,3 | 2 400 |
| A7 | -выд | 37,2 | 1,3 |
| A8 | пкг1 | 37,5 | 1,0 |
| B1 | пкг2 | 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 | -ппр | | |

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 В5, В6, В7 и В8, соответствующие образцам В1, В2, В3 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 трех 10^6 и в четырех 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 Та_q-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:

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

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

Результат данных экспериментов по параметрам FAM приведен в таблице 3.

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 | 66 000 000 |
| 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 | cr1 | 33,3 | 1 600 000 |
| C2 | cr1 | 33,3 | 1 300 000 |
| C3 | cr1 | 33,3 | 1 500 000 |
| C4 | cr2 | 40,0 | 3 000 |
| C5 | cr2 | 40,5 | 4 000 |
| C6 | cr2 | 40,9 | 5 000 |
| C7 | K- | | |
| C8 | K+ | 25,9 | 3,88 |

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).

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

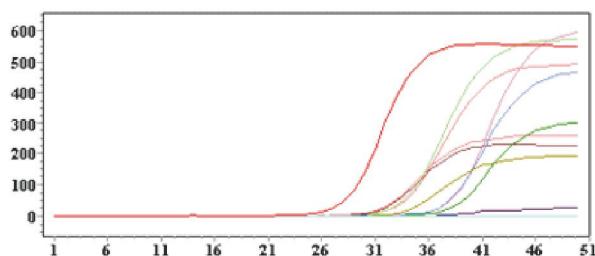


Рис. 2. Отчет по результатам анализа ПЦР фирмы «АмплиСенс», Флуорофор FAM

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. Р. 986-994.
3. Higuchi R. Kenetic PCR Analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. 11: 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. Р. 444-449.

5. Saha B.K., Tian B., Bucy R.P. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe // Jurnal of Virological Methods. 2001. 93: 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: 169-193.

Резюме

Мақалада шынайы уақыт режимінде ПТР әдісімен С гепатитін молекулярлы генетикалық талдау мәселелері талқыланады 2 тест-жүйелерінің сезімталдырынына салыстырмалы талдау үсынылған. Олардың өркайсысының артықшылықтары мен кемшіліктері көрсетілген. Сандық талдау жүргізілпі, 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.