

Ю.М.Назарова, Г.Б.Дуанбекова, А.Н.Иманбетов

Спорттық ойын түрлерімен шұғылданудың дайындық үдерісінде фармакологиялық дәрімектерді қолдану

Мақалада волейболмен шұғылданған кездегі машыктану үдерісінде фармакологиялық заттарды қолдану мәселелері қарастырылған. Волейбол ойыны кезінде спортшы ағзасына түрлі денелік жүктеме түседі, қас-қағым сәтте шешім қабылдау және күрделі қимыл-қозғалыс әрекеттерін орындайды. Дәрумендер кешені, микроэлементтер, жануарлар мен өсімдіктерден алынған бейімдегіш дәрімектердің көмегімен спортшының ағзасын қалпына келтіруге болады. Оқу-жаттығу үдерісінде қолданылатын дәрімектер кешені машыктану үдерісінің алға қойылған мақсат-міндеттеріне сәйкес реттеліп отырады.

The article includes taking pharmacological substances in training process while playing volleyball. Different physical weight has an influence on person's health while playing volleyball. One can heal sportsman's health while taking vitamin mineral complex, adaptogenes of plant and animal origin. Taking pharmacological substances affords to regulate set of aims in training process.

УДК 577.213; 579.882.11

И.А.Кретьова, Д.С.Балпанов, Н.А.Талжанов

ТОО «Научно-аналитический центр «Биомедпрепарат"», Степногорск

Разработка диагностической тест-системы для выявления *Mycoplasma hominis* — условно-патогенного возбудителя инфекций уrogenитального тракта методом ПЦР в режиме реального времени

Разработана отечественная диагностическая тест-система для выявления *Mycoplasma hominis* методом ПЦР в режиме реального времени. Подобраны праймеры и меченые зонды, проведены амплификация и клонирование целевых участков генома возбудителя с целью создания рекомбинантного положительного контроля, созданы оптимальные условия проведения ПЦР и концентрации основных компонентов реакционной смеси. Определена эффективность ПЦР и сравнение разработанной тест-системы для выявления *Mycoplasma hominis* в режиме реального времени с коммерческими наборами.

Ключевые слова: инфекция, микроорганизмы, уrogenитальный тракт, полимеразная цепная реакция, диагностика, микрофлора, микоплазма, цервикальный канал, возбудитель, сорбция.

Введение

За последние годы резко возросло число случаев заболеваний, вызванных инфекциями, передающимися половым путем (ИППП). Наблюдается неуклонный рост ИППП у лиц молодого возраста, женщин фертильного возраста, которые часто сопровождаются осложнениями, приводящими к утрате трудоспособности, бесплодию, внутриутробной инфекции, обуславливая заболевания плода и новорожденного [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) каждый день во всем мире около одного миллиона человек заражаются инфекциями, передаваемыми половым путем. Учитывая этот факт, ВОЗ утвердила глобальную стратегию на 2005–2015 гг. «Предотвращение и контроль инфекций, передаваемых половым путем».

В комплексной программе «Здоровый образ жизни» на 2008–2016 годы, разработанной в целях реализации долгосрочной стратегии «Казахстан–2030» и утвержденной Постановлением Правительства Республики Казахстан от 21 декабря 2007 г., важным направлением являются вопросы противостояния эпидемии инфекций, которые передаются половым путем, ВИЧ и СПИДу [2].

В последнее десятилетие проблема генитальной инфекции находится в центре внимания многих исследователей. Возрастающее клиническое значение приобретают условно-патогенные микроорга-

низмы микробиоты урогенитального тракта, такие как *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и др. [3, 4].

Роль микоплазм в патологии урогенитального тракта до настоящего времени остается не вполне ясной. В значительной мере это обусловлено свойствами микроорганизмов, которые относятся к классическим внутриклеточным паразитам. Микоплазмы не имеют клеточной стенки, их хромосома состоит примерно из 500 генов, что в несколько раз меньше стандартного прокариотического генома. Активная репродукция микоплазм возможна лишь при использовании клеточных ресурсов клетки-хозяина, что и определяет внутриклеточный способ существования возбудителя. В связи с этим для лабораторной диагностики микоплазм не всегда приемлемы традиционные методы, такие как микроскопия или культуральная диагностика. В последние годы были разработаны методы ДНК диагностики с использованием ДНК-зондов или полимеразной цепной реакции (ПЦР) для представителей семейства микоплазм [5–7].

Диагностическая ценность ПЦР признана во всем мире. С каждым годом растет число лабораторий, использующих этот метод для диагностики инфекционных заболеваний. Для качественной характеристики и количественной оценки микрофлоры урогенитального тракта перспективным является метод ПЦР в реальном времени, который позволяет избежать ошибки в диагностике и лечении. Проведенные сравнительные исследования показали, что полимеразная цепная реакция является более чувствительным, быстрым и более дешевым диагностическим тестом для диагностики наличия микоплазм, чем культуральное исследование (бактериологический посев) [5, 8–10].

Опубликованная ранее [10, 11] суммированная оценка чувствительности различных методов диагностики показала, что экспресс-тесты имеют чувствительность 40–60 %, ИФА — 50–70, ПИФ — 55–75, культуральное исследование — 60–80, а ПЦР — 90–100 %. Диагностическая специфичность ПЦР тест-систем, определяемая процентом здоровых людей, имеющих истинно отрицательные результаты анализа, также достаточно высокая и оценивается в 99–100 %.

Таким образом, целью настоящей работы является разработка отечественной диагностической тест-системы для выявления *Mycoplasma hominis* методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили соскобы эпителиальных клеток из уретры у мужчин и из цервикального канала у женщин. Урогенитальные образцы, полученные от пациентов с воспалительными заболеваниями органов репродуктивной системы, использовали для оценки чувствительности и специфичности обнаружения *Mycoplasma hominis*, а также для сравнения с коммерческой ПЦР-диагностической тест-системой «АмплиСенс *Mycoplasma hominis*» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ).

Для выявления ДНК возбудителя использовался ДНК-сорбционный метод (ФГУН ЦНИИЭ, РФ), основанный на специфической обратимой сорбции ДНК в присутствии хаотропных солей (гуанидинтиоцианат, гуанидинхлорид) на частицы силикагеля.

Аmplification фрагмента ДНК-мишени *fts Y* проводили методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием специфичных праймеров F- (5'-ATT GAT TGC TGC AGG TGA TAC A-3'), R- (5'-GGT GTT ACA ATA TCA GCC CCA AC-3') и зонда (5' R6G-AGA GCA GCG GCA GTT GAA – BHQ2 3'). Объем реакционной смеси 25 мкл включает образец ДНК 5 мкл, 20 мкл MasterMix Qiagen (10 μmol/L каждого праймера и зонда). Температурный профиль реакции: 50 °C 2 мин, 95 °C 15 мин, 45 циклов (95 °C 30 с и 60 °C 60 с) [12].

В процессе оптимизации различных вариантов ПЦР подбирали температурный режим, число и продолжительность циклов амплификации, соотношение зондов и праймеров, концентрацию MgCl₂, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность обнаружения ДНК *Mycoplasma hominis*.

С целью получения рекомбинантного положительного контроля продукты амплификации клонировали с использованием набора Promega pGEM-T Easy в плазмиду pGEM-T. Полученные лигазные смеси использовали для последующей химической трансформации компетентных клеток *Escherichia coli*. Отбор колоний, содержащих целевой фрагмент, проведен методом сине-белой селекции. Отобранные клоны перенесены в жидкую среду LB и инкубированы при 37 °C в течение 16 часов. Из полученных культур выделены плазмиды с применением метода щелочного лизиса. Нуклеотидная последовательность целевых фрагментов, клонированных в плазмиды, определена мето-

дом секвенирования с использованием универсальных праймеров M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') и M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3').

Проверку на наличие неспецифической гомологии в нуклеотидной последовательности плазмиды проводили с использованием поисковой системы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, NCBI).

Результаты и обсуждение

Проведена оптимизация условий амплификации при выявлении возбудителя воспалительных заболеваний урогенитального тракта *Mycoplasma hominis* на стандартных и клинических образцах методом ПЦР в режиме реального времени.

Экспериментальным путем подобраны температурный режим ПЦР и оптимальные концентрации основных компонентов реакционной смеси, оказывающих значительное влияние на чувствительность и специфичность реакции, так как при снижении температуры отжига ниже оптимальной и при повышении концентрации праймеров и $MgCl_2$ выше оптимальных неспецифичность ПЦР-амплификации повышается, а при повышении температуры отжига выше оптимальной снижается выход специфической амплифицируемой ДНК, вплоть до ее полного исчезновения. Для фрагментов ДНК размером 100 н.п. и меньше требуется уменьшение концентрации дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs) для повышения эффективности реакции. Фрагменты ДНК *Mycoplasma hominis* имеют длину 67 н.п.

В таблицах 1–2 представлены подобранные оптимальные условия проведения ПЦР в режиме реального времени и концентрации основных компонентов в реакционной смеси.

Таблица 1

Программа амплификации

№	Стадия	Температура, °С	Время	Циклы
1	Удержание температуры	95	5 мин	1
2	Циклирование	95	30 с	45
		60	60 с	

Таблица 2

Состав реакционной смеси

№	Компоненты	Исходная концентрация	Концентрация в смеси	Количество (мкл)
1	PCR-буфер	10×	1×	2,0
2	dNTPs	2 mM	150 μ M	1,5
3	$MgCl_2$	100 mM	6 mM	1,2
4	Прямой праймер	10 pmol/ μ l	0,5 μ M	1,0
5	Обратный праймер	10 pmol/ μ l	0,5 μ M	1,0
6	Меченый зонд	10 pmol/ μ l	0,25 μ M	0,5
7	Taq-полимераза	5 е.а./мкл	1 е.а./мкл	0,2
8	Вода			7,6
9	ДНК			5,0
Общий объем смеси — 20,0 мкл				

Исследована аналитическая чувствительность реакции путем тестирования серии последовательных разведений плазмидного стандарта, несущего клонированные фрагменты ДНК-мишени *Mycoplasma hominis* белка *fts Y* и последующим построением калибровочного графика зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц с определением коэффициента корреляции.

Зависимость значений порогового цикла от логарифма начального числа копий плазмид линейная в диапазоне от 50 до 50 млн. копий.

На рисунке 1 представлены результаты определения чувствительности ПЦР при выявлении возбудителя урогенитальных инфекций *Mycoplasma hominis*.

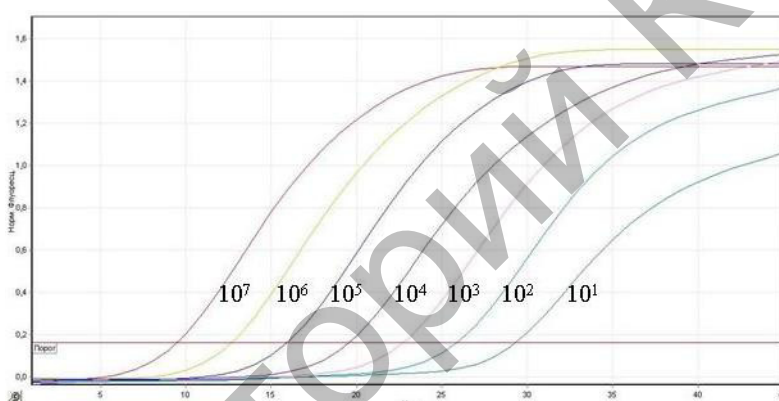
Таким образом, выявлены высокая эффективность амплификации ($E = 1,00$), рассчитанная на основании крутизны калибровочной прямой, построенной через экспериментальные точки в полуло-

гарифмической системе координат, и сильная корреляционная связь (R^2 в пределах 0,999) концентрации калибровочных образцов ДНК и определяемого значения порогового цикла. Также с большой точностью совпадает количество заданных копий стандарта с фактическим значением, что говорит о достоверности результатов.

В результате разработанная тест-система позволяет с высокой точностью детектировать низкие концентрации ДНК *Mycoplasma hominis*, что составляет не менее 50 копий в образце, и может быть использована для количественного определения ДНК в анализируемых образцах.

Аналитическую специфичность реакции оценивали на образцах ДНК следующих видов микроорганизмов: *Ureaplasma spp.* (*U.parvum/U.urealyticum*), *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Herpes simplex virus 1,2*. В результате тестирования выяснилось, что неспецифические реакции по данным видам возбудителей отсутствовали.

Для оценки диагностической эффективности проведено сравнение результатов амплификации ПЦР в режиме реального времени разработанной тест-системы для выявления *Mycoplasma hominis* с российскими коммерческими наборами реагентов «АмплиСенс» производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, которые имеют государственные регистрационные удостоверения Министерства здравоохранения РФ и разрешены к использованию в клинической лабораторной диагностике.



№	Ц	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Расч. (Сог)
1	10 ⁷		Стандарт	9,52	50 000 000	48 562 502
2	10 ⁶		Стандарт	12,72	5 000 000	5 271 306
3	10 ⁵		Стандарт	15,99	500 000	540 314
4	10 ⁴		Стандарт	19,60	50 000	43 873
5	10 ³		Стандарт	22,78	5 000	4 823
6	10 ²		Стандарт	25,94	500	534
7	10 ¹		Стандарт	29,35	50	50

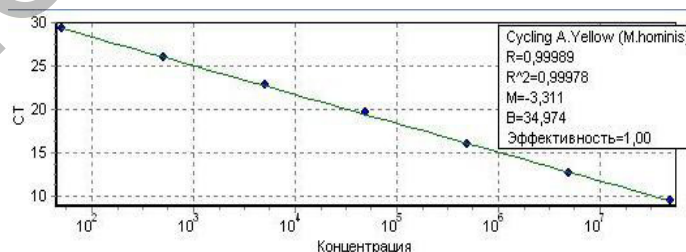


Рисунок 1. Определение числа копий *Mycoplasma hominis*

Результаты амплификации ДНК возбудителя *Mycoplasma hominis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени представлены на рисунке 2.

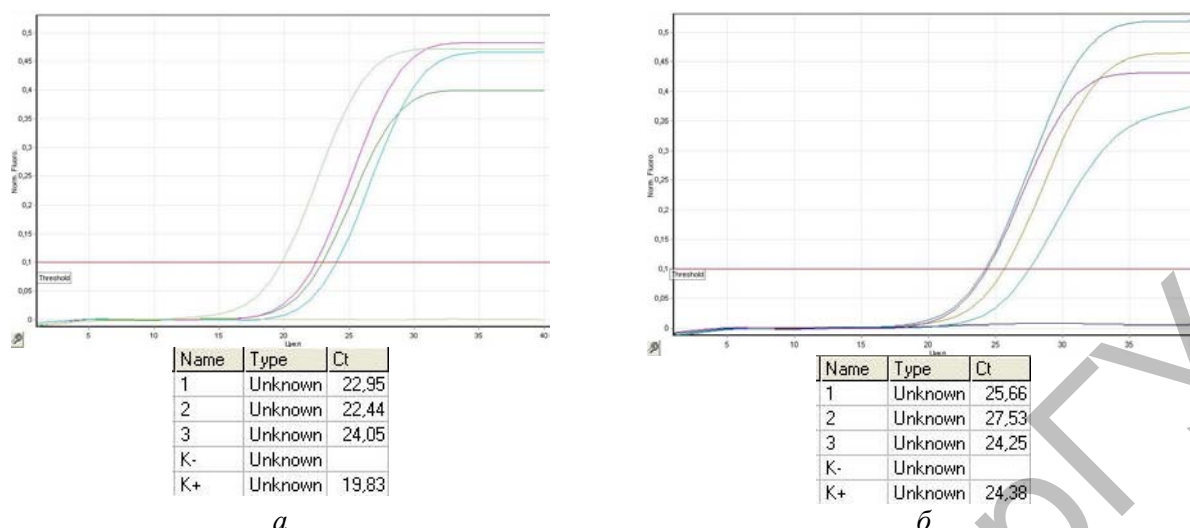


Рисунок 2. Результаты амплификации *Mycoplasma hominis*: а — набор реагентов «АмплиСенс»; б — разработанная тест-система

Сравнение результатов амплификации показало, что кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию на стадии характерного экспоненциального нарастания флуоресцентного сигнала, в обоих случаях мало отличаются друг от друга, что доказывает пригодность разработанных нами ПЦР тест-систем в режиме реального времени по выявлению *Mycoplasma hominis* для применения в диагностике возбудителей урогенитальных инфекций.

Список литературы

- 1 Аскарова Г.К., Маутканов М.Р., Утегенова А.К. Оценка диагностических и прогностических факторов, влияющих на течение и исход беременности // Актуальные вопросы эпидемиологии, клиники, диагностики, профилактики и терапии социально-значимых дерматозов и инфекций, передаваемых половым путем: Тез. докл. на IV Междунар. конф., 4–5 октября 2007. — Алматы: Білім, 2007. — С. 122–123.
- 2 Национальный доклад о ходе работы для ССГАООН: Республика Казахстан (январь 2008 г. – декабрь 2009 г.). — 2010. — 23 с.
- 3 Гомберг М.А. Бактериальный вагиноз и новые инфекции, с ним ассоциированные // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2010. — № 2.
- 4 Руководство «Инфекции, передаваемые половым путем» // Институт здоровья семьи. — 2009. — 168 с.
- 5 Shmuel Razin. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections // Molecular and Cellular Probes. — 1994. — № 8. — P. 497–511.
- 6 Киселев В.И., Дмитриев Г.А., Латыпова М.Ф. Полимеразная цепная реакция в диагностике урогенитальных инфекций: Пособие для врачей. — М.: Медицина, 2000. — 16 с.
- 7 Карамова А.Э., Поляков А.В., Хамаганова И.В. Значение *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma genitalium* как возбудителей воспалительных заболеваний урогенитального тракта // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2004. — Т. 6. — № 4. — С. 365–370.
- 8 Abele-Horn M., Wolff C. et al. Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns // J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1996. — № 15(7). — P. 595.
- 9 Petrikos GL., Hadjisoteriou M., Daikos GL. PCR versus culture in the detection of vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* // Int. J. Gynaecol. Obstet. — 2007. — № 97(3). — P. 202.
- 10 Дмитриев Г.А. Современные методы диагностики наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем // Consilium Medicum. — 2002. — № 5. — С. 256–259.
- 11 Щербо С.Н. Успехи в диагностике инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции // Медицинская картотека. — М.: Медицина, 2002. — 22 с.
- 12 Jean Pierre Menard, Florence Fenollar et al. Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to Predict Bacterial Vaginosis // Clinical Infectious Diseases. — 2008. — № 47. — P. 33–43.

И.А.Кретьова, Д.С.Балпанов, Н.А.Талжанов

Нақты уақыт режиміндегі ПТР әдісімен *Mycoplasma hominis* — урогениталды жолдар инфекциясының патогенді қоздырғышын анықтауға арналған балау тест-жүйесін құрастыру

Нақты уақыт режиміндегі ПТР әдісімен *Mycoplasma hominis* қоздырғышын анықтау үшін отандық балау тест-жүйесі құрастырылды. Жұмысты орындау барысында праймерлер мен таңбаланған зондтар таңдалып, рекомбинантты оң бақылау құру мақсатында геном қоздырғышының учаскелері клондалып, амплификация жүргізілді және ПТР өткізудің оңтайлы жағдайлары мен реакциялық қоспаның негізгі компоненттерінің концентрациясы таңдалынып алынды. Коммерциялық жиынтықтармен реалды уақыт режимінде *Mycoplasma hominis* қоздырғышын анықтау үшін әзірленген тест-жүйе салыстырылды және ПТР-дың тиімділігі анықталды.

A domestic diagnostic test-system has been developed in order to educate *Mycoplasma hominis* by PCR method on a real time basis. The primers and labeled probes had been chosen during the implementation of works, the amplification and cloning of purposeful areas of a provocative genom had been carried out with the aim to create a positive recombinant control, the optimal conditions had been chosen for undertaking of polymerase chain reaction and concentration of the main components of reaction mixture. The efficiency of PCR had been determined. The developed test-system for educating of *Mycoplasma hominis* on a real time basis had been compared with commercial kits.