

## **РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЦР ТЕСТ–СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *TOXOPLASMA GONDII***

**Домонова Э.А., Сафонова А.П., Пиксасова О.В., Шипулина О.Ю.**

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Токсоплазмоз относится к группе паразитарных инвазий. В 1972 г. эксперты ВОЗ включили токсоплазмоз в число зоонозов, наиболее опасных для здоровья человека. У пациентов с иммунодефицитами при первичном инфицировании или обострении латентно протекающей инфекции могут возникать тяжелые формы заболевания с летальным исходом. Токсоплазмоз все чаще регистрируется не только при СПИДе, но и у больных со злокачественными новообразованиями и при пересадке органов. У больных с иммунологическими нарушениями первыми появляются пневмонии, энтероколит, тяжелые часто не обратимые поражения ЦНС кистозно-некротического характера. Токсоплазмоз в здоровом организме с хорошей иммунорезистентностью редко дает манифестные формы, чаще он протекает латентно или идет под другим диагнозом: В 80-90% это заболевание протекает бессимптомно и остается недиагностированным. Токсоплазмоз играет значительную роль в патологии детей и взрослых, вызывая прерывание беременности в ранние сроки, мертворождение, рождение детей с аномалиями развития и поражением ЦНС и других органов. При инфицировании женщин в течение всего периода беременности в среднем рождается 61% здоровых детей и 39% детей с врожденным токсоплазмозом. Инфицирование плода в первом триместре гораздо чаще приводит к возникновению аномалий развития.

Малая информированность о возбудителе приводит к целому ряду ошибок, как в диагностике болезни, так и её лечении. В организме человека *Toxoplasma gondii* может обнаруживаться только 2 формами - тахизоитами и цистами. Тахизоиты имеют размеры 4 - 7 мкм в длину и 2—4 мкм в ширину. Размножаются внутриклеточно во всех клетках млекопитающих за исключением безъядерных (эритроциты) и обнаруживаются в тканях в острой стадии инфекции. Скопление тахизоитов внутри одной клетки называют псевдоцистой. Эти формы токсоплазм нестойки вне клетки. Цисты формируются в организме хозяина и имеют собственную плотную оболочку, внутри них содержится 3000 - 5000 тахизоитов. Через плотную оболочку цист не проникают ни антитела, ни лекарственные препараты. Цисты очень устойчивы к различным воздействиям и в организме хозяина сохраняются десятки лет. Большая часть их локализуется в скелетных мышцах, миокарде, центральной нервной системе.

Ранняя диагностика токсоплазмоза трудна в связи с отсутствием патогномичных клинических признаков и малой информативностью результатов рутинных лабораторных методов исследования. Причинами низкой чувствительности ПЦР в диагностики токсоплазмоза являются низкая аналитическая чувствительность реакции – выбор мишени (мультикопийный ген) и методики, а так же недоступность возбудителя или его недостаточное количество в клиническом материале.

Первой тест-системой для диагностики токсоплазмоза с электрофоретической детекцией была «АмплиСенс-100-К *Toxoplasma gondii* – 325». Диагностической мишенью для нее был многокопийный ген *Toxoplasma gondii* **TGR1E**, размером 353 п.о.. В настоящее время ген **TGR1E** не используется в качестве диагностической мишени для ПЦР, в связи с гетерогенностью нуклеотидных последовательностей среди различных его копий и невозможности выбора в связи с этим специфических праймеров. Возникла необходимость поиска оптимальной мишени для идентификации ДНК *Toxoplasma gondii* в соответствии с современными молекулярно–генетическими сведениями.

Новой диагностической мишенью стал многокопийный ген *Toxoplasma gondii* **B1**, размер 2214 п.о. Ген B1 консервативен и представляет собой 35 тандемных повторов размером 2,2 т.п.о. Аналитическая чувствительность этой тест-системы составляет 16 тахизоитов/мл.

**Целью** настоящей разработки явилось создание тест-систем, для качественного выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в различном клиническом и аутопсийном материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и с электрофоретической детекцией. Разработанные тест-системы предназначены для подтверждения диагноза токсоплазмоз и для мониторинга эффективности терапии.

### **Материалы и методы**

В качестве клинических образцов использовались пробы крови от 300 клинически здоровых людей. Полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией адаптирована к работе на амплификаторах разных фирм (например, «Терцик», «ДНК-технология», Россия). Полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводилась с использованием прибора «Rotor Gene 3000/6000» производства Corbett Research, «iQ5» ABIPrism. Производства BioRad США, Applied Biosystems, США.

### **Результаты**

Результатом явилась разработка качественных тест-систем, включающих в себя выделительную и амплификационную части.

В тест-системах в качестве положительных контролей использована тотальная ДНК выделенная из культуры *Toxoplasma gondii* методом фенольной экстракции и преципитации этанолом. ДНК разведена

до концентрации  $6,5 \times 10^4$  геq/ml геномов (геномных эквивалентов или копий ДНК *Toxoplasma gondii* в мл). Измерение количества копий ДНК проводили с помощью ПЦР методом лимитирующих разведений.

В качестве экзогенного неконкурентного внутреннего контроля использовался искусственно сконструированный фрагмент ДНК, клонированного в ДНК фаг-λ.

Для полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» диагностической мишенью был выбран повторяющийся ген *Toxoplasma gondii* размером 529 п.о., функция которого неизвестна (Homan W.L. et al., 2000; Reischl U. et al., 2003).

Для полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией диагностической мишенью стал многокопийный ген *Toxoplasma gondii* **B1**, размер 2214 п.о. Ген B1 консервативен и представляет собой 35 тандемных повторов размером 2,2 кб.

Для определения аналитической чувствительности ПЦР тест-системы «АмплиСенс® *Toxoplasma gondii* – FRT» использовали серию 10-кратных разведений лизата чистой культуры *Toxoplasma gondii* штамм RH (Sabin A., 1941) с концентрацией  $5 \times 10^7$  тахизоитов/мл. Из лизата чистой культуры готовились ряды десятикратных разведений. Проводилась амплификация в повторах. Из последней точки ряда, проходящей в 100% случаев готовился ряд двукратных разведений и тестировался в ПЦР в повторах. Последнее разведение, проходящее в 100% случаев принималось за аналитическую чувствительность. Аналитическая чувствительность составила 4 тахизоита/мл.

Для определения аналитической чувствительности ПЦР тест-системы с электрофоретической детекцией «АмплиСенс *Toxoplasma gondii*-211» использовали серию 10-кратных разведений лизата чистой культуры *Toxoplasma gondii* штамм RH (Sabin A., 1941) с концентрацией  $5 \times 10^7$  тахизоитов/мл. Из лизата чистой культуры готовились ряды десятикратных разведений. Проводилась амплификация в повторах. Из последней точки ряда, проходящей в 100% случаев, готовился ряд двукратных разведений и тестировался в ПЦР в повторах. Последнее разведение, проходящее в 100% случаев принималось за аналитическую чувствительность. Аналитическая чувствительность этой тест-системы составляет 16 тахизоитов/мл.

Проверка аналитической специфичности ПЦР тест-систем показала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК 50 различных видов микроорганизмов (в том числе ДНК трех видов близкородственных простейших), а также эукариотических ДНК человека и 10 видов животных (лося, крупного рогатого скота, лошади, овцы, козы, свиньи, кролика, собаки, кошки, крысы, мыши).

С целью оценки аналитической специфичности были проведены

клинические испытания ПЦР тест–систем “АмплиСенс® *Toxoplasma gondii* -- FRT” и “АмплиСенс -100-К *Toxoplasma gondii*” на 322 образцах периферической крови здоровых людей. Во всех случаях выявлялся валидный сигнал внутреннего контроля и не выявлялся сигнал ДНК *Toxoplasma gondii*.

### **Выводы**

Показаны высокая аналитическая чувствительность и специфичность разработанных тест-систем. Использование неконкурентного внутреннего контроля позволяет увеличить линейный диапазон измерения и, как следствие, увеличить аналитическую чувствительность теста. Использование **экзогенного** внутреннего контроля позволяет контролировать основные процессы ПЦР-анализа (выделение ДНК, проведение реакции амплификации ДНК).

Поэтому разработанные тест-системы могут быть использованы для первичного выявления пациентов инфицированных *Toxoplasma gondii* и для мониторинга последующего течения болезни. В качестве клинического материала возможно использование: цельной периферической и пуповинной крови; белых клеток периферической и пуповинной крови; спинномозговой жидкости, бронхо-альвеолярного лаважа, амниотической жидкости.