

Рисунок. Специфичность тест-системы для обнаружения ДНК парвовируса В19.

Выводы

Разработанная тест-система может быть использована в практическом здравоохранении для диагностики и оценки эффективности лечения при парвовирусной инфекции.

Литература:

1. Heegaard, E. D. Parvovirus B19 / E. D. Heegaard, K. E. Brown Human // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, № 3. – P. 485–505.
2. Katta, R. Parvovirus B19: a review / R. Katta // Dermatol Clin. – 2002. – № 20. – P. 333–342.
3. Young, N. S. Parvovirus B19 / N. S. Young, K. E. Brown // N Engl J Med. 2004. – № 350. – P. 586–597.
4. American College of Obstetrics and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Perinatal viral and parasitic infections // Int J Gynaecol Obstet. – 2002. – № 76. – P. 95–107.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО- ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

*Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Акулич Н.Ф., Шпигун Н.В.,
Зенькова С.К., Горбачев В.В.*

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Цитомегаловирус (ЦМВ) – один из наиболее часто встречающихся вирусов, имеет способность к быстрому росту, размножению и длительной персистенции в организме человека, сохраняется в лимфоцитах. ЦМВ

относится к семейству Herpesviridae, подсемейству Betaherpesvirinae 5-го типа, роду Cytomegalovirus. В настоящее время зарегистрированы следующие штаммы ЦМВ: АД169, Davis, Kerr, Towne [1].

ЦМВ-инфекция является достаточно распространенной, так как носителями выступают до 90% взрослого населения. С целью диагностики цитомегаловирусной инфекции применяют вирусологические, цитологические, серологические методы. Выявление специфически измененных цитомегалических клеток (ЦМК) – самый доступный метод, однако его информативность составляет лишь 50-70%. Наиболее достоверным методом является выявление в материале самого вируса или его ДНК [1, 2]. Золотым стандартом до сих пор остается вирусологический метод, однако для его выполнения требуется значительное количество времени, поэтому ретроспективный характер диагностики не позволяет проводить адекватную терапию и профилактику. Для диагностики необязательно выделять сам вирус, достаточно выделить его антиген. Для этого широко используют реакцию иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), ДНК-ЦМВ-гибридизацию, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [2]. Метод ПЦР благодаря своей высокой чувствительности выявляет даже отрезок ДНК ЦМВ и считается весьма прогрессивным. Наиболее важное его преимущество - возможность диагностики ранних стадий процесса, латентной и персистирующей инфекции. В тоже время существует мнение о том, что данный метод имеет недостаток, заключающийся в низкой прогностической ценности, связанной с тем, что ПЦР выявляет ДНК вируса даже в латентном состоянии [2, 3]. В связи с этим в настоящее время широкое распространение получил метод ИФА, который позволяет выявить антиген ЦМВ и специфические антитела классов G и M [1]. Выявление IgG имеет второстепенное значение. Оно должно осуществляться одновременно с выявлением IgM, особенно для диагностики первичной инфекции. При однократном выявлении IgG анализ уровня их авидности (способности удерживать антиген) может в какой-то мере помочь в дифференциации между активной и персистирующей инфекцией. Выявление индекса авидности (ИА) до 35% может свидетельствовать об острой инфекции, показатель от 36 до 41% указывает на стадию реконвалесценции, ИА больше 42% говорит о наличии в сыворотке крови анамнестических высокоавидных антител к ЦМВ.

Необходимо подчеркнуть, что серологическая диагностика цитомегаловирусной инфекции и определение ИА могут служить лишь вспомогательными методами, подтверждающими те или иные стадии заболевания. Нужно иметь в виду, что специфические антитела могут не выявляться у лиц со сниженным иммунитетом, при белковом голодании и т.д. Определение IgG необходимо проводить в парных сыворотках с интервалом не менее 10 дней. Рецидивирующая форма ЦМВИ диагностируется при повторном выделении вируса у серопозитивных лиц. Диагноз внутриутробной ЦМВИ устанавливается на протяжении первых

трех недель жизни. Наличие IgM у новорожденного до двух недель жизни свидетельствует о внутриутробной инфекции, после - о приобретенной [1].

Достоверным критерием значительной активности возбудителя, доказывающим его этиологическую роль в развитии того или иного клинического синдрома, может служить количественное обнаружение ДНК ЦМВ. Высокие титры ДНК обнаруживаются у 100% лиц с клинически выраженными признаками ЦМВИ и отсутствуют у пациентов с другими оппортунистическими заболеваниями. Этот критерий может служить показателем острого течения ЦМВИ. По нему можно судить не только о диагнозе, но и о прогнозе течения заболевания. Он также дает возможность оценивать эффективность проводимого лечения [1, 3].

Цель исследования – создание тест-системы для качественного и количественного обнаружения ДНК всех известных штаммов цитомегаловируса с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»

Материал и методы. Конструирование специфических праймеров и флуоресцентных ДНК-зондов проводили с помощью специального программного продукта - Bio-Premier или Primer Express. Методология TaqMan предусматривала синтез флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеющих по концам две метки. Одна из них - флуоресцентная молекула, другая - молекула-гаситель этой флуоресценции. При такой методике Taq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивала нуклеотидную цепочку, но и разрушала связанный флуоресцентный зонд. При этом интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР растет пропорционально числу копий исходной ДНК. В результате после 20–40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые. По калибровочным кривым с контрольными образцами (созданными для разрабатываемой тест-системы) возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований впервые в Республики Беларусь была создана и зарегистрирована министерством здравоохранения тест-система для качественного и количественного обнаружения ДНК цитомегаловируса методом ПЦР в режиме реального времени.

Специфичность и чувствительность созданной тест-системы представлены в таблице и рисунке.

Таблица. Характеристика тест-системы для обнаружения ДНК цитомегаловируса в режиме реального времени

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК ЦМВ - контроль с ЦМВ	≥ 2 копий за пробег 50 МЕ/ml
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК ЦМВ	> 8 логарифмов
Аналитическая специфичность	ЦМВ негативные образцы (n 126)	100%
Диагностическая специфичность	ЦМВ негативные образцы (n 126)	100%

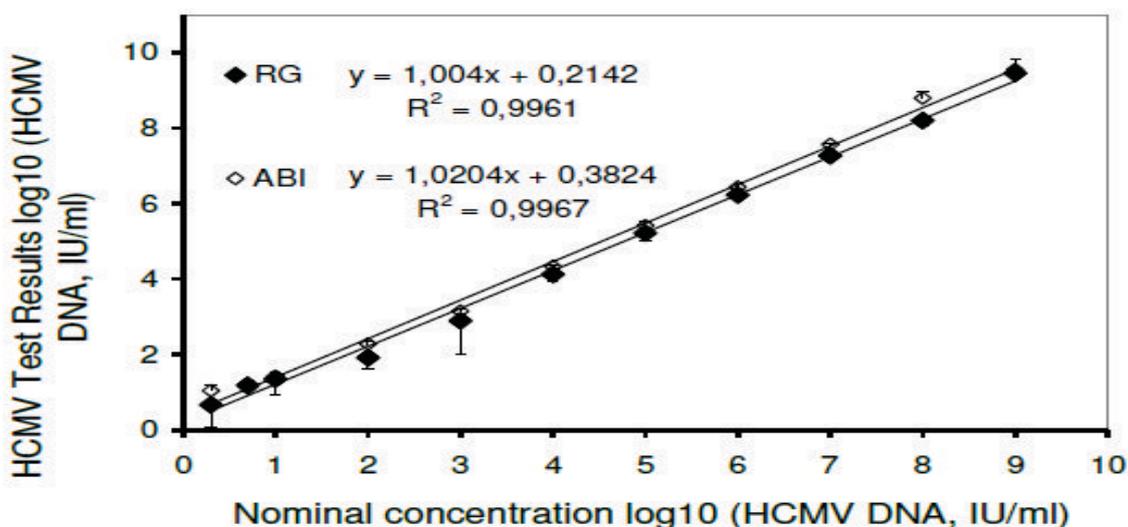


Рисунок. Чувствительность созданной тест-системы для обнаружения ДНК цитомегаловируса методом ПЦР в режиме реального времени

Вывод

Созданная тест-система помимо ее использования в качестве диагностического инструмента, может применяться в качестве прогностического маркера ЦМВ инфекции, в качестве терапевтического маркера для мониторинга успешности противовирусной терапии, а также для оценки контагиозности биологических жидкостей.

Литература:

1. Revello, M. G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant / M. G. Revello, G. Gerna // Clin Microbiol Rev. – 2002. – № 15(4). – P. 680–715.
2. An International Multicenter Performance Analysis of Cytomegalovirus Load Tests / H. H. Hirsch [et al.] // Clin Infect Dis. – 2013. – Vol. 56, N 3. – P. 367–373.
3. Real-time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients / J. Ikewaki [et al.] // J Clin Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 4382–4387.