

## РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

*Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Юнатов Ю.Г., Лятос И.А.*  
УО «Витебский государственный медицинский университет»

Внедрению молекулярно-генетической методологии в клиническую практику способствовала разработка метода *полимеразной цепной реакции (ПЦР)* или *специфической амплификации ДНК*, произошедшая более 20 лет назад. Первооткрыватель этого метода Керри Мулис за свое изобретение был удостоен Нобелевской премии в 1993 году [1].

Преимуществом ДНК-диагностики по сравнению с биохимической или иммунологической диагностикой является использование унифицированного набора методов, практически не зависящего от целей проводимого исследования. Это методы выделения ДНК, ПЦР, электрофорез, рестрикция ДНК, гибридизация со специфическими *ДНК-зондами* и секвенирование [1, 2]. Таким образом, в пределах одной лаборатории можно заниматься ДНК-диагностикой широкого спектра инфекционных заболеваний.

Диагностика ПЦР даёт возможность повторять ряд амплификаций, сохраняя активность фермента. Когда амплификация проходит беспрепятственно, за один цикл количество копий определённого участка ДНК возбудителя возрастает вдвое, после тридцати циклов – в сто десять раз. Именно поэтому ПЦР используется в диагностике для определения достаточно маленьких патогенных организмов, выявление которых без этого невозможно. Следует отметить, что РНК не может быть матрицей для ПЦР в реальном времени. Поэтому, для того, чтобы обнаружить вирусную РНК, перед амплификацией нужно получить ДНК, соотносящуюся с соответствующим её фрагментом. Полимеразная цепная реакция даёт возможность производить измерения ДНК и РНК возбудителя [1, 3, 4]. Полученная таким образом информация используется для проведения наблюдения за эффективностью используемой терапии, а также оценки клинического прогноза. В настоящее время в практическом здравоохранении особое значение имеет применение ПЦР в режиме реального времени.

ПЦР в реальном времени не нуждается в дополнительных действиях относительно расшифровки исследуемой РНК или ампликонов, которые служат барьером для постановки правильного диагноза и приводят к получению ложных результатов. Данный подход позволяет не использовать стадию электрофореза, что ведёт к снижению риска заражения продуктами полимеразной цепной реакции. Также, в связи с уменьшением количества проводимых манипуляций с возбудителем, сокращается время проведения исследования, упрощается его процесс, снижается вероятность возникновения ошибок. ПЦР в режиме реального времени позволяет определить исходное количество копий ДНК возбудителя в клинической

пробе, что помогает выявлять периоды обострений заболеваний и принимать своевременные меры для излечения пациента.

**Целью исследования** создание тест-системы для качественного и количественного обнаружения РНК вируса гепатита С в крови и ткани печени.

**Материал и методы.** С целью создания тест-системы был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генома вируса гепатита С, различных генетических вариантов, представленных в базе данных GenBank, с целью подбора специфичных праймеров. Проведена оценка специфичности и чувствительности ПЦР с использованием выбранных праймеров на панели гомологичных и гетерологичных штаммов вируса и сконструирована ПНР-тест-система, позволяющая выявлять РНК вируса гепатита С в биологическом материале.

Для обеспечения биологической безопасности при работе с диагностическим препаратом был создан к тест-системе рекомбинантный положительный контрольный образец и стандартный образец.

Разработана нормативная документацию на созданную тест-систему. Проведена апробацию сконструированной тест-системы при исследовании клинического материала.

**Результаты и обсуждение/** Проведенные испытания созданной тест-системы для качественного и количественного обнаружения РНК вируса гепатита С показали что при всех клинически значимых генотипах вируса возможна детекция РНК ВГС (таблица 1).

**Таблица 1.** Специфичность тест-системы при генотипах вируса гепатита С

Генотипы	HCV РНК (IU/mL)	HCV (FAM)	RC (ROX)
1a	$1.98 \times 10^5$	+	+
1b	$9.9 \times 10^4$	+	+
2a	$7.52 \times 10^4$	+	+
2b	$7.38 \times 10^4$	+	+
2c	$4.35 \times 10^4$	+	+
2i	$4.77 \times 10^4$	+	+
3a	$2.3 \times 10^4$	+	+
4	$1.73 \times 10^5$	+	+
5a	$8.9 \times 10^4$	+	+
6	$1.09 \times 10^5$	+	+

Анализ параметров созданной тест-системы оценивался по общим техническим условиям) для *in vitro* диагностических медицинских изделий (2009/108/ЕС).

В результате проведенного анализа была установлена высокая специфичность и чувствительность разработанной тест-системы (таблица – 2).

Таблица 2 - Характеристика тест-системы для обнаружения РНК вируса гепатита С

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая РНК ВГС Плазма с ВГС	$\geq 5$ копий за пробег 50 МЕ/ml
Линейный диапазон	Синтетическая РНК ВГС	$> 8$ логарифмов
Частота восстановления	Синтетическая РНК ВГС	100% сверх 6 логарифмов
Распознавание генотипов	Референсные образцы	1a 1b 2a 2b 2c 2i 3a 4 5a 6
Аналитическая специфичность	Различные РНК и ДНК вирусы	100%
Диагностическая специфичность	ВГС негативная плазма	100%
Устойчивость: частота ошибок системы	ВГС плазма	0%
Эквивалентность плазмы и сыворотки	ВГС положительные образцы	100%

### Литература:

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 457 с.
2. The development of a qualitative real-time RT-PCR assay for the detection of hepatitis C virus / A. Clancy [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2008. – № 27. – P. 1177–1182.
3. Pawlotsky, J. M. Molecular diagnosis of viral hepatitis / J. M. Pawlotsky // Gastroenterology. – 2002. – № 122. – P. 1554–1568.
4. ПЦР "в реальном времени"/ под ред. Д. В. Ребрикова. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕТОД ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНОГО ОНКОГЕНА BCR/ABL

*Семенов В.М., Субботина И.А.*

УО «Витебский государственный медицинский университет»

В настоящее время установлено, что специфическим маркером хронического миелолейкоза (ХМЛ) является филадельфийская хромосома (Ph'), которая возникает в результате реципрокной транслокации  $t(9;22) *1+$ . Практически во всех случаях ХМЛ разрыв 22-й хромосомы в гене BCR происходит в небольшом локусе M-bcr размером 5.8 т.п.н. При этом разрыв 9-й хромосомы может возникнуть в протяженной 5'-области гена ABL длиной свыше 300 т.п.н. При осуществлении транслокации  $t(9;22)$  в составе Ph'-хромосомы образуется химерный ген BCR/ABL, белковый продукт которого p210 BCR/ABL служит причиной развития хронического миелолейкоза. Необходимо отметить, что классический цитогенетический