

СРАВНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ MYCOPLASMA HOMINIS МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Ваганова Анастасия Николаевна

младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, РФ, Санкт-Петербург

Шабалина Анна Вячеславовна

студент, Санкт-Петербургский государственный университет, РФ, Санкт-Петербург

Заручейнова Ольга Валентиновна

канд. биол. наук, заведующий лабораторией иммунохимических технологий, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, РФ, Санкт-Петербург

Савельева Елена Леонидовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимических технологий, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, РФ, Санкт-Петербург

Вербов Вячеслав Николаевич

канд. хим. наук, начальник Отдела новых технологий, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, РФ, Санкт-Петербург

Comparison of genetic targets for *Mycoplasma hominis* detection by real-time PCR

Anastasiya Vaganova

Junior scientist, Laboratory of Biomolecular Technologies, Institut Pasteur in Saint-Petersburg for Research in Epidemiology and Microbiology, Russia, St. Petersburg

Anna Shabalina

Student, St. Petersburg University, Russia, St. Petersburg

Olga Zarucheynova

Ph.D, head of Laboratory of Immunochemistry Technologies, Institut Pasteur in Saint-Petersburg for Research in Epidemiology and Microbiology, Russia, St. Petersburg

Elena Saveleva

Ph.D, Senior scientist, Laboratory of Immunochemistry Technologies Institut Pasteur in Saint-

Vyacheslav Verbov

Ph.D, Chief of Department of New Technologies, Institut Pasteur in Saint-Petersburg for Research in Epidemiology and Microbiology, Russia, St. Petersburg

Аннотация. Высокая изменчивость генома *Mycoplasma hominis* затрудняет выбор мишеней для её выявления с помощью ПЦР. Было проведено сравнение систем, подобранных к консервативным участкам генома, в том числе генам *rpsP*, *rpsS*, *rplD*, *dauA* и гену транспортера MATE. Наибольшей аналитической чувствительностью обладала ПЦР-система к гену *rplD*.

Abstract. The pronounced genome variability in *Mycoplasma hominis* complicates the choice of PCR-targets for its detection. PSR-systems targeted to conservative genome regions, included genes *rpsP*, *rpsS*, *rplD*, *dauA* and gene of MATE transporter were compared in this study. PCR system specific to *rplD* sequence had the highest analytic sensitivity.

Ключевые слова: *Mycoplasma hominis*; микоплазмоз; молекулярная диагностика; ПЦР.

Keywords: *Mycoplasma hominis*; mycoplasmosis; molecular diagnosis, PCR.

1. Введение

M. hominis является оппортунистическим патогеном человека, ассоциированным с различными заболеваниями мочеполовой системы, и, в более редких случаях, внегенитальной локализации.

Как и для других микоплазм, для *M. hominis* характерно крайне низкое содержание гуанина и цитозина в геноме, что затрудняет разработку диагностических тест-систем на основе ПЦР для её выявления. Другой особенностью *M. hominis* является высокая генетическая изменчивость. Геном микоплазм содержит кластеры генов, полученных путём горизонтального переноса, в том числе от *Ureaplasma parvum*, оппортунистического патогена, заселяющего те же ниши, что и *M. hominis* [1]. Наличие таких генов дополнительно ограничивает поиск мишеней, пригодных для специфического выявления ДНК данного патогена.

Среди мишеней, ранее использовавшихся для выявления *M. hominis* методом ПЦР консервативная последовательность гена 16 S рРНК [2; 3], специфический участок гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gap*) и ген *fstY*, кодирующий мембранную транслоказу [4, 5]. Ограниченное количество мишеней, применявшихся для выявления *M. hominis*, является, отчасти, следствием недостатка данных о геноме этого микроорганизма, поскольку он был секвенирован лишь в 2014 году.

Наличие данной информации позволяет сегодня путём анализа полногеномных последовательностей, найти максимально консервативные участки. Целью данного исследования был выбор участков генома *M. hominis*, пригодных для использования в качестве мишеней для её выявления в биологическом материале.

2. Материалы и методы

2.1 Штаммы и клинические образцы

Для исследования было взято 17 изолятов *M. hominis* из коллекции лаборатории иммунохимических технологий Отдела новых технологий НИИ ЭМ им. Пастера и 23 генитальных мазка от 23 пациенток СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина».

2.2. Выделение ДНК

Выделение ДНК из культур и клинического материала проводилось с использованием набора М-сорб-ООМ (ООО «Синтол», Москва), согласно инструкции.

2.3 Постановка ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовались реакционные смеси qPCRmix-HS (Eurogen, Москва) согласно инструкции. Объём аликвоты препарата ДНК составлял 2 мкл на реакцию. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Учёт накопления ампликонов, синтезированных на матрице ДНК *M. hominis* проводился по каналу FAM, а на матрице ДНК человека, присутствовавшей в образцах в качестве внутреннего контроля реакции, по каналу HEX. Результат считался положительным в случаях амплификации обеих мишеней. В случаях, когда до 40 цикла происходила амплификация ДНК человека в отсутствии амплификации ДНК патогена, результат считался отрицательным.

Оценку специфичности подобранных праймеров проводили с помощью программы BLAST [6].

3. Результаты

На основании проведённого *in silico* исследования были выбраны консервативные участки, отвечающие требованиям по нуклеотидному составу для создания системы, выявляющей ДНК *M. hominis*, в том числе:

1. Последовательность, включающая фрагмент гена рибосомного белка S16, *rpsP*, межгенный спейсер и часть гена тРНК-гуанин-метилтрансферазы.
2. Ген рибосомного белка S19, *rpsS*
3. Ген рибосомного белка L4, *rplD*
4. Ген вторичного транспортёра MATE
5. Ген фермента диметиларгинин-диметиламиногидролазы, *dauA*

На первом этапе тестирования оценивалась пригодность мишеней для создания диагностической тест-системы. Она определяется отсутствием неспецифического взаимодействия с ДНК человека и нормальной микробиоты организма и способностью выявлять единичные копии целевой последовательности. Накопление продукта в присутствии должно происходить при одновременной амплификации ДНК человека с участием специфических праймеров, поскольку такая реакция используется в качестве внутреннего контроля в диагностических системах для выявления патогенов в клиническом материале.

Для оценки аналитической чувствительности ПЦР при использовании выбранных мишеней было проведено тестирование на серийных десятикратных разведениях ДНК четырёх изолятов *M. hominis* от 10^4 геномных эквивалентов до 1 геномного эквивалента на мкл аликвоты. Оценка проводилась при одновременной амплификации специфического фрагмента ДНК человека, присутствовавшего в образце в количестве порядка 10 000 копий, что соответствует усреднённой содержанию ДНК человека в генитальном мазке.

Системы, специфичные к последовательностям генов транспортёра MATE и *rpsS* не позволили получить продукт ПЦР при содержании целевой ДНК в образце менее 100 копий. При использовании в качестве мишени гена *rpsP* отмечалось неспецифическое взаимодействие

системы с ДНК человека. Способность выявлять единичные копии генома микоплазм при одновременной амплификации ДНК человека на матрице 10 000 копий генома показали только системы, подобранные к генам *dauA* и *rplD*. Они были протестированы на препаратах ДНК изолятов *M. hominis* и клинических образцов.

Для постановки ПЦР на матрицах ДНК 17 изолятов *M. hominis* были взяты образцы ДНК, выделенной из культур с концентрацией 10^4 - 10^5 микробных клеток на мкл. Было показано, что в образцах ДНК трёх изолятов при использовании системы, подобранной к гену *dauA*, амплификация ДНК не происходит или происходит после 40 цикла, в то время как при использовании системы, специфичной к последовательности гена *rplD* накопление продукта ПЦР происходит во всех образцах со значениями пороговых циклов 21-24.

При исследовании клинических образцов в 11 образцах ДНК *M. hominis* была выявлена с помощью обеих тест-систем, в 9 образцах накопления продукта не происходило, в 1 образце был получен положительный результат только при использовании праймеров и зонда к гену *dauA*, а в двух образцах только при использовании системы, направленной на последовательность *rplD*.

4. Обсуждение

Выбор мишеней для специфического выявления ДНК *M. hominis* затруднён из-за высокой изменчивости генома этих бактерий и характерного для микоплазм пониженного содержания гуанина и цитозина в геноме.

В результате проведённого исследования было показано, что среди выбранных мишеней наиболее консервативной и эффективной с точки зрения накопления продукта в ПЦР является ген рибосомного белка L4. Прочие ПЦР-системы либо не позволяли выявлять все варианты микоплазм данного вида, особенно при их низкой концентрации, либо неспецифически взаимодействовали с геномом человека. Рибосомный белок L4 является структурным белком бактериальных рибосом, а также участвует в их сборке и регуляции синтеза их компонентов. Он отличается высокой консервативностью структуры, и, что характерно для жизненно важных последовательностей в геноме микоплазм, отличается большим содержанием гуанина и цитозина. Благодаря этим его свойствам, ген можно рассматривать в качестве мишени для выявления *M. hominis* в клиническом материале.

Список литературы:

1. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L et al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas // PLoS Genet. - 2009. - V. 5. - N. 10. - e1000677.
2. Diaz N, Dessì D, Dessole S et al. Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* by a new multiplex polymerase chain reaction // Diagn Microbiol Infect Dis. - 2010. - V. 67. - N.1. - P. 30-36.
3. Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J et al. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis* // BMC Microbiol. - 2004. - V.4. - N.35.
4. McKechnie ML, Hillman R, Couldwell D et al. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay // J Clin Microbiol. - 2009. - V. 47. - N. 6. - P. 1871-1877.
5. Férandon C1, Peuchant O, Janis C et al. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture // Clin Microbiol Infect. - 2011. - V. 17. - N. 2. - P. 155-159.
6. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W. et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. - 1990. - N. 215. - P. 403-410.

