

Полуян О.С.<sup>1</sup>, Костюк С.А.<sup>1</sup>, Бенько А.Н.<sup>1</sup>, Герасименко М.А.<sup>2</sup>

## Методические особенности разработки мультиплексной in-house тест-системы для выявления р-РНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в биоптатах коленного сустава

<sup>1</sup>ГНУ «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ГУ «РНПЦ Травматологии и ортопедии», Минск, Республика Беларусь

Патогенез хламидия- и микопlasма-индуцированных артритов связан со способностью данных микроорганизмов запускать аутоиммунные процессы, приводящие к диссеминации и персистенции возбудителей с последующим инфицированием полости сустава. В настоящее время для диагностики инфекционных артритов используют метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), мишенью которого является молекула ДНК. Тем не менее, в ряде случаев необходим метод, мишенью которого является более чувствительная и короткоживущая молекула, свидетельствующая не только о наличии микроорганизма, но и его жизнеспособности.

**Цель исследования:** усовершенствовать метод ПЦР-РВ для одновременного выявления жизнеспособных форм *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в синовиальной жидкости и синовиальной ткани коленного сустава.

**Материалы и методы исследования.** В качестве биологического материала для разработки метода использовали синовиальную жидкость и синовиальную ткань 40 пациентов с гонартрозом, находившихся на стационарном лечении в УЗ «Минская областная клиническая больница». Все пациенты были разделены на подгруппы в зависимости от выявленного ранее (при проведении ПЦР в режиме реального времени) этиологического фактора: подгруппа 1 – пациенты с гонартрозом, у которых была выявлена ДНК *Chlamydia pneumoniae*; подгруппа 2 – пациенты с гонартрозом, у которых была выявлена ДНК *Mycoplasma pneumoniae*; подгруппа 3 – пациенты с гонартрозом, у которых была выявлена одновременно ДНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*; подгруппа 4 – пациенты с гонартрозом, у которых ДНК исследуемых микроорганизмов выявлены не была. Для оценки эффективности элиминации возбудителей через 10 дней после последнего дня приема антибактериальных лекарственных средств пациентам подгрупп 1-3 проводили повторную пункцию коленного сустава. Образцы синовиальной ткани предварительно гомогенизировали с использованием TissueLyser II (Qiagen) в течение 3 мин (частота 10/с). Выделение РНК проводили с использованием реагента TRIZol. Каче-

ство и количество выделенной РНК оценивали спектрофотометрически.

**Результаты.** На первом этапе нами были подобраны специфические пары праймеров (forward и reverse), а также молекулярные зонды (probe). Состав реакционной смеси был универсален и различался только вносимыми парой праймеров и зондом. Пробирки инкубировали при 65°C 5 мин, затем при 41°C 5 мин, после чего вносили раствор. Программа амплификации: 41°C – 2 мин, 95 циклов 41°C – 45 с. Детекцию флуоресценции проводили по каналу FAM; наличие р-РНК возбудителей устанавливали при наличии пересечения кривой амплификации и пороговой линии флуоресценции.

При проведении молекулярно-генетических исследований было установлено наличие жизнеспособных форм возбудителей *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* как в образцах синовиальной ткани, так и в синовиальной жидкости пациентов подгрупп 1-3, р-РНК исследуемых возбудителей в биологическом материале пациентов подгруппы 4 выявлена не была, что полностью (100%) совпадало с результатами предыдущих исследований методом ПЦР-РВ. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность разработанного метода составили 100%.

На следующем этапе нами было проведено моделирование мультиплексной ПЦР-РВ для одновременного выявления р-РНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в исследуемом биологическом материале. Для этого использовали ранее подобранные forward-праймеры, общий reverse-праймер, а также специально подобранные зонды для выявления указанных патогенов.

**Заключение.** Подтверждено 100%-ое совпадение результатов моно- и мультиплексной ПЦР-РВ по выявлению р-РНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в образцах синовиальной жидкости и синовиальной ткани пациентов с артропатиями коленного сустава. Показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности составили 100% при использовании в качестве референсного метода как стандартной ПЦР-РВ (с детекцией ДНК возбудителей), так и разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией р-РНК патогенов.

Вследствие отсутствия различий в выявляемости р-РНК *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в образцах синовиальной жидкости и синовиальной ткани рекомендовано использование синовиальной жидкости как наименее травматичного для получения биологического материала.