

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Ильин И.И.^{1,2}, Марданлы С.Г.^{1,2}, Марданлы А.Г.³, Ротанов С.В.⁴



ТЕХНОЛОГИЯ ПРЯМОЙ ПЦР ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ *GARDNERELLA VAGINALIS*

¹АО «ЭКОлаб», 142530, Электрогорск, Россия;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, Орехово-Зуево, Россия;

³Нахчыванский государственный университет (НГУ), AZ7012, Нахчывань, Азербайджанская республика;

⁴ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, Серпухов, Оболенск, Россия

Введение. Для ускоренного получения качественного результата при выявлении ДНК *Gardnerella vaginalis* разработана новая технология постановки реакции амплификации – прямая ПЦР (direct polymerase chain reaction), при которой исключается предварительный этап экстракции и очистки ДНК возбудителя – образец непосредственно добавляется к реакционной ПЦР-смеси.

Цель исследования - апробация инновационной технологии прямой ПЦР для выявления ДНК *Gardnerella vaginalis* при клинической лабораторной диагностике или быстрого получения ампликонов с целью последующего исследования нуклеотидных последовательностей.

Материал и методы. Использованы информационные базы в Интернете, содержащие сведения о генах ДНК *Gardnerella vaginalis*; стандартные реагенты и 120 клинических образцов, содержащих *Gardnerella vaginalis*. Анализ нуклеотидных последовательностей проведён с помощью AlignX; специфичность олигонуклеотидов оценена с помощью BLAST.

Результаты и обсуждение. Эффективность разработанных условий постановки прямой ПЦР сопоставлена с результатами исследования в ПЦР предварительно выделенной и очищенной ДНК (с новыми посчитанными олигонуклеотидами и набором реагентов сравнения «РеалБест ПЦР-12 ИППП»). Выявляемость ДНК *Gardnerella vaginalis* при исследовании 120 клинических образцов составила в прямой ДНК - 96,7%, в классической ПЦР с предварительно выделенной и очищенной ДНК с новыми разработанными условиями постановки и с набором реагентов сравнения – по 98,3%. **Заключение.** Новая ускоренная технология прямой ПЦР успешно апробирована, она может быть рекомендована для качественной диагностики ДНК *Gardnerella vaginalis*. Условия применения новой технологии будут совершенствоваться и будут апробированы на возбудителях иных ИППП.

Ключевые слова: ПЦР; прямая ПЦР; выделение нуклеиновых кислот; ИППП; *Gardnerella vaginalis*

Для цитирования: Ильин И.И., Марданлы С.Г., Марданлы А.Г., Ротанов С.В. Технология прямой ПЦР при выявлении *Gardnerella vaginalis*. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (12): 686-692.

DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-12-686-692

EDN: CIKDON

Для корреспонденции: Ильин Илья Игоревич, микробиолог научно-производственного отделения ПЦР АО «ЭКОлаб», аспирант кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; e-mail: ekolab-ilin@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировало АО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.10.2024

Принята к печати 23.10.2024

Опубликовано 20.11.2024

Ilyin I.I.^{1,2}, Mardanly S.G.^{1,2}, Mardanly A.G.³, Rotanov S.V.⁴

DIRECT PCR TECHNOLOGY FOR THE DETECTION OF *GARDNERELLA VAGINALIS*

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State Educational Institution of Higher Education of the Moscow Region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

³Nakhchivan State University (NSU), AZ7012, Nakhchivan, Azerbaijan Republic;

⁴Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor (FSBI «SSC PMB» of Rospotrebnadzor), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia

Introduction. To accelerate the production of high-quality results in the detection of *Gardnerella vaginalis* DNA, a new technology for setting up an amplification reaction was developed – direct PCR (direct polymerase chain reaction), which eliminates the preliminary stage of extraction and purification of the DNA of the pathogen - the sample is directly added to the reaction PCR mixture.

Purpose of the study. Testing of innovative direct PCR technology for the detection of *Gardnerella vaginalis* DNA in clinical laboratory diagnostics or rapid production of amplicons for subsequent study of nucleotide sequences.

Material and methods. Information bases on the Internet containing information about the genetic composition of *Gardnerella vaginalis* DNA were used; standard reagents and 120 clinical samples containing *Gardnerella vaginalis*. The analysis of nucleotide sequences was performed using AlignX; the specificity of oligonucleotides was evaluated using BLAST. **Discussions and results.** The effectiveness of the developed conditions for direct PCR was compared with the results of a PCR study of pre-isolated and purified DNA (with newly counted oligonucleotides and a set of «RealBest PCR-12 STI» comparison reagents). The detectability of

Gardnerella vaginalis DNA in the study of 120 clinical samples was 96.7% in direct DNA and 98.3% in classical PCR with pre-isolated and purified DNA with newly developed staging conditions and with a set of comparison reagents.

Conclusion. The new direct PCR technique has been successfully tested and is suitable for qualitative diagnosis of the presence of *Gardnerella vaginalis* DNA. The technology will be improved and tested on other STIs.

Key words: PCR; direct PCR; nucleic acid isolation; STI; *Gardnerella vaginalis*

For citation: Ilyin I.I., Mardanly S.G., Mardanly A.G., Rotanov S.V. Direct PCR technology for the detection of *Gardnerella vaginalis*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (12): 686-692 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2-84-2024-69-12-686-692>

EDN: CIKDON

For correspondence: Ilyin Ilya Igorevich, microbiologist of the scientific and production department of PCR of JSC «EKOLab», postgraduate student of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines State educational institution of higher professional education in the Moscow Region «State University of Humanities and Technology» (GGTU); e-mail: ekolab-ilin@mail.ru

Information about authors:

Ilyin I.I., <https://orcid.org/0009-0003-0316-7260>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Mardanly A.G., <https://orcid.org/0009-0000-0754-0956>;

Rotanov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>.

Funding. The study was funded by JSC «EKOLab».

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 17.10.2024

Accepted 23.10.2024

Published 20.11.2024

Введение. Дисбиоз влагалища относят к невоспалительным заболеваниям женской репродуктивной системы, поскольку при этой патологии часто могут не определяться такие симптомы как боли, воспаление и отёк; происходит изменение видового и количественного состава микрофлоры: значительное уменьшение количества *Lactobacillus* spp., потребляющих гликоген с образованием молочной кислоты, перекиси водорода и вырабатывающих антимикробные пептиды, и тесно связанное с этим размножение условно-патогенной анаэробной микрофлоры, в составе которой преобладают: *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Atopobium vaginae*. Клиницисты в подобных случаях ставят диагноз бактериального вагиноза - БВ (по МКБ-10 – № 89 – «Другие невоспалительные болезни влагалища»). Возникновению указанной патологии может способствовать нарушение менструального цикла или изменение уровня циркуляции половых гормонов, нерациональное применение антибиотиков и местных спермицидных средств, нарушение правил личной гигиены, частые спринцевания, использование внутриматочной спирали, снижение иммунной защиты, острые и хронические инфекционные заболевания, повышенная лучевая нагрузка, заражение возбудителями инфекций, передаваемых половым путём (ИППП) [1, 2].

Частота распространения БВ в популяции колеблется в пределах 12-80% в зависимости от особенностей контингентов обследуемых женщин. Субъективные жалобы женщин с БВ связаны с образованием обильных выделений из половых путей, часто с неприятным «рыбным» запахом, сопровождающихся дискомфортом, зудом или жжением. Диагноз устанавливается на основании определения врачом трёх из четырёх критериев Amsel:

- гомогенные беловато-серые выделения из половых путей, с неприятным «рыбным» запахом;
- pH влагалищных выделений выше 4,5 (при исследовании лакмусовой полоской);

- положительный аминотест (появление или усиление неприятного «рыбного» запаха при добавлении 10% раствора КОН к нанесённому на предметное стекло отделяемому влагалищу);

- выявление «ключевых» клеток при микроскопии влагалищных выделений (отдельно расположенных клеток эпителия слизистой оболочки влагалища, на поверхности которых в большом количестве прикрепляются гарднереллы и другие патогены; при окраске по Граму или метиленовым синим эти эпителиальные клетки приобретают зернистый вид и нечёткие очертания) [3].

Gardnerella vaginalis является индигенным представителем условно-патогенной микрофлоры влагалища, которая может вызывать клинику БВ только при наличии дополнительных благоприятных условий; более того, в количествах до 10^3 КОЕ/мл гарднереллы расценивают как представителя нормальной микрофлоры.

При незащищённых половых контактах с женщинами, страдающими БВ, у мужчин (особенно иммунокомпromетированных или страдающих хроническими заболеваниями мочеполового тракта) могут развиваться явления уретрита или простатита; но примерно в 10% случаев в мочеполовом тракте у мужчин *G. vaginalis* могут сохраняться бессимптомно, делая их резервуаром и источником возбудителя инфекции.

Согласно современной классификации, род *Gardnerella* spp. включает как минимум 13 генетических видов. Новая таксономическая классификация рода *Gardnerella* spp. создана с учётом биохимических свойств микроорганизма, на основе анализа генов и их генетической близости (рис. 1).

Согласно новым разработкам в области молекулярной генетики, бывший вид *Gardnerella vaginalis* многими исследователями поднят в таксономии до рода, а его отличные в метаболическом и патогенном потенциале генотипы составляют отдельные виды внутри этого рода. Генетические отличия рода *Gardnerella* spp. включают: наборы уникальных гене-

тических маркёров для каждого из видов, что свидетельствует о различиях в их патогенном потенциале; значительный групповой коровый геном, состоящий из 746 генов; частую гомологичную внутригрупповую рекомбинацию генов [4]. Выделяют следующие

виды рода *Gardnerella* spp.: *Gardnerella vaginalis*, *Gardnerella leopoldii*, *Gardnerella swidsinskii*, *Gardnerella piotii* и 9 пока безымянных видов *Gardnerella* spp. (из-за малого числа известных нуклеотидных последовательностей).

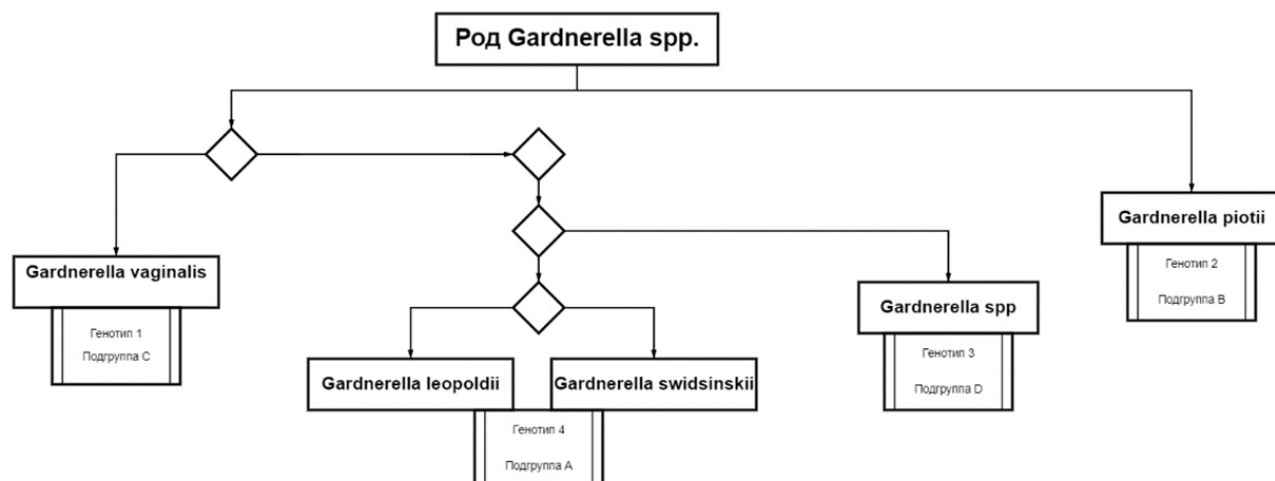


Рис. 1. Новая таксономическая классификация рода *Gardnerella* spp., включающая классификацию по генетическим видам (*Gardnerella vaginalis* и другие), генотипам 1-4 и подгруппам (A, B, C, D).

Для детекции и количественной оценки состава микробиоты отделяемого из половых путей в настоящее время в дополнение к исследованию нативных и окрашенных микропрепаратов применяют современные молекулярно-генетические методы исследования, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью (как в формате моно-, так и мультиплексных исследований в классической или реал-тайм полимеразной цепной реакции, ПЦР) [5-7]. Метод ПЦР основан на выявлении в исследуемой пробе с помощью парных праймеров специфических для изучаемого вида микроорганизмов участков нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) с последующим многократным увеличением – амплификацией их количества благодаря комплементарному присоединению дезокси-нуклеотид-трифосфатов под регулирующим действием фермента Таq-полимеразы и циклического изменения температуры в реакционной среде с помощью амплифицирующего аппарата - термоциклера. По окончании ПЦР производят детекцию продуктов амплификации одним из способов: гибридизационно-ферментным, гель-электрофоретическим, гибридизационно-флуоресцентным [7].

При подготовке исследуемой пробы к проведению анализа методом ПЦР используют различные методы выделения нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) из исследуемого материала и одновременного удаления или нейтрализации посторонних примесей (экспресс-методы температурного лизиса с последующим центрифугированием, сорбентные методы выделения на твёрдофазном носителе, спиртовая преципитация). Каждый метод извлечения нуклеиновых кислот имеет свои особенности и показания к применению. Для ускорения процесса лабораторного исследования разработана

новая технология в рамках постановки реакции амплификации - прямая ПЦР (direct polymerase chain reaction) - при которой исключается этап экстракции и очистки пробы; исследуемый образец непосредственно добавляют к реакционной ПЦР-смеси.

Цель исследования - апробация технологии прямого метода ПЦР (*direct polymerase chain reaction*) в качестве инновационной методики детекции ДНК *Gardnerella vaginalis* с целью клинической лабораторной диагностики или быстрого получения продуктов амплификации (ампликонов) и последующего исследования нуклеотидных последовательностей.

Материал и методы. При постановке ПЦР использованы:

- подобранные олигонуклеотиды (парные праймеры) нужного дизайна (синтезированы фирмой «ДНК-Синтез», Россия);
- набор реагентов для выделения ДНК методом магнитной адсорбции (набор «МагнитЭк», АО «ЭКО-лаб» [8]);
- концентрат 2-х ПЦР буфера (0,5 М Tris Cl, pH 8,6; 0,05 М KCl; 15 мМ MgCl₂; 1% Tween 20);
- вода деионизированная, свободная от нуклеаз («Merck», «Millipore», Германия);

Амплификация, детекция, обработка полученных результатов проведена с помощью амплификатора модели Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, фирмы ООО «Био-Рад Лаборатории» (США) [9].

Клинические образцы биологического материала в виде мазков ($n=120$), содержащих ДНК *Gardnerella vaginalis*, получены от компании «INVITRO» (г. Москва); до начала исследования их хранились при температуре -20°C .

В качестве эндогенного внутреннего контроль-

ного образца (ВКО) в выделении использован ген β -глобулина человека. Детекция ВКО по окончании реакции амплификации свидетельствует о правильном проведении всех этапов исследования: хранения, экстракции, амплификации.

Детекция нуклеиновых кислот для сопоставления результатов амплификации с разработанными олигонуклеотидами проведена при помощи набора реагентов «РеалБест ПЦР-12 ИППП» (РУ № РЗН 2021/14056, фирмы «Вектор-Бест», Россия), согласно положениям инструкции по его применению.

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank проведён с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Специфичность подобранных олигонуклеотидов изучена с помощью компьютерной программы BLAST online [10].

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008.

Результаты и обсуждение. Для отработки основных положений технологии прямой ПЦР (*direct polymerase chain reaction*) просчитаны последовательности олигонуклеотидов, специфичные исключительно к *G. vaginalis*, подобран состав реакционной смеси для ПЦР и программа амплификации.

Олигонуклеотиды. В рамках подбора специфических олигонуклеотидов проанализированы основные представители рода *Gardnerella* spp.

Согласно данным, просчитанным по оценке Ньюджента, клинически важными для человека считаются *Gardnerella vaginalis*, *Gardnerella swidsinskii*, *Gardnerella piotii*, поскольку их связывают с клинической картиной БВ. Клиническое значение *Gardnerella leopoldii* и *Gardnerella* spp. при БВ не доказано [4].

При разработке последовательности парных олигонуклеотидов для ПЦР решено взять за основу геном *Gardnerella vaginalis* внутри нового рода *Gardnerella* spp. Примерами специфических генов внутри генетического вида *Gardnerella vaginalis* можно назвать: *16S*; *23S*; *Sialidase A*; *vly*; *cpn60* и прочие. Часть этих генов достаточно консервативны, например: *Sialidase A* (благодаря ему синтезируется фермент сиалидаза, разрушающий слизистые барьеры влагалища, что, в свою очередь, является клинически значимым фактором патогенеза). Иные гены, такие как: *vly* (благодаря которому происходит синтез токсина-фактора вирулентности вагинолизина) считаются достаточно варибельными [11].

Для изучения и подбора специфических олигонуклеотидов для ПЦР отобраны последовательности нуклеотидов вышеназванных генов различных штаммов *G. vaginalis* из базы данных GenBank NCBI. Проведено множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей; для полученных версий выравненных последовательностей нуклеотидов каждого гена, созданы варианты дизайнов праймеров для амплификации. При утверждении дизайнов учитывали: температуру гибридизации олигонуклеотидов, температуру отжига, последовательность азотистых оснований подбираемых праймеров, длину подбираемых нуклеотидов [12]. Подобранные варианты олигонуклеотидов проверены на сходство и специфику к геномам *G. vaginalis* по алгоритмам BLAST.

В результате проведённой разработки получено не-

сколько вариантов праймеров и зондов для различных генов, но по результатам серии опытных постановок большинство подобранных олигонуклеотидов отсеяны. Основной причиной отсеивания являлась недостаточная специфичность подобранных олигонуклеотидов по отношению к *G. vaginalis* (у отсеянных вариантов отмечена перекрёстная реактивность с другими представителями рода *Gardnerella* spp.).

Итогами подбора олигонуклеотидов явилось: выбор гена *Sialidase A* как наиболее консервативного для *G. vaginalis*:

- прямой праймер 5'-AAGAATGCGCAACAAAGT-GGCTAGT-3';
- обратный праймер 3'-CGTCGTCCGAGTAG-ATTTGCGCTATA-5'
- зонд 5'-TTGCAAGCGAAAGTCAGCCATTATTTGC-3'.

На основе данных нуклеотидных последовательностей синтезированы рабочие праймеры и зонды для непосредственной постановки ПЦР. Разработанные олигонуклеотиды специфичны лишь к *G. vaginalis* среди всех представителей рода *Gardnerella* spp. Последовательности нуклеотидов совпали при сопоставлении с геномом эталонного штамма *G. vaginalis* ATCC 14019. (NCBI Ap: NC_014644.1)

Буфер для ПЦР. Подобрана специальная буферная смесь для проведения амплификации (в том числе и технологии прямой ПЦР), включающая:

- $MgCl_2$, ионы которого образуют растворимые комплексы с дезоксирибонуклеозидтрифосфатами (dNTPs), формируя субстрат для ДНК-полимеразы. Экспериментальным путём выбрана концентрация 15 мМ на смесь;
- 0,5 М Tris-Cl, поддерживающий необходимую pH буферного раствора. С учётом существенного изменения pH при нагревании во время процесса амплификации, выбрана pH=8,6;
- термостабильная Taq-полимераза, устойчивая к воздействию высоких температур, в дальнейшем экспериментально успешно опробованная для прямой ПЦР;

- «присадки», улучшающие результат ПЦР, к которым можно отнести неионный детергент Tween 20 в концентрации 1% и KCL в концентрации 0,05 М.

Разработанный состав буфера обеспечивает проведение амплификации нуклеиновых кислот как с этапом их предварительной очистки, так и без неё.

Программа амплификации. Выбранный вариант амплификации (рис. 2) включает этапы:

- первоначальный прогрев реакционной смеси при 55 °C в течение 15 минут;
- денатурацию ДНК, необходимую для разрушения водородных связей между двумя цепями ДНК, из-за чего они расходятся;
- отжиг праймеров, обеспечивающий связь одноцепочечных матриц с праймерами;
- элонгацию праймеров (Taq-полимераза обеспечивает синтез второй цепи ДНК, начиная от праймера).

Результаты экспериментальных постановок. Экспериментальным путём проверена эффективность предложенных разработок и избранной программы для амплификации нуклеиновых кислот. Работоспособность подобранной ПЦР-системы проверена на выделенных

и очищенных клинических образцов ДНК *G. vaginalis*. Всего выделено 120 образцов, содержащих ДНК *G. vaginalis*, при помощи разрабатываемой методики для маг-

нитной адсорбции с набором реагентов МагнитЭК [8]. Выделенные образцы исследованы в ПЦР с просчитанными праймерами и предложенным буфером.

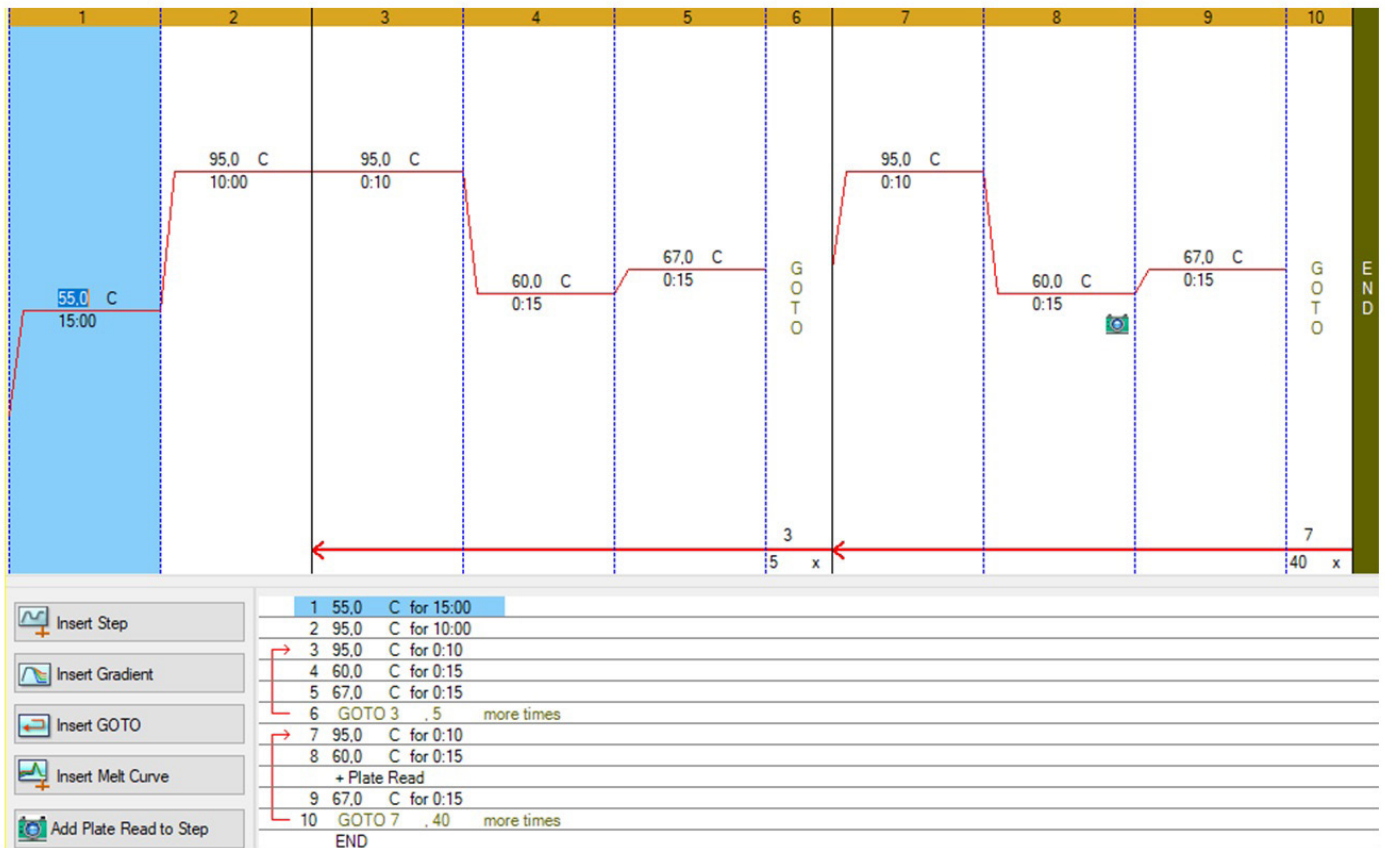


Рис.2. Программа амплификации нуклеиновых кислот для прибора Bio-Rad CFX 96 как для классической ПЦР с предварительной экстракцией нуклеиновых кислот, так и для прямой ПЦР.

В результате апробации разработанной ПЦР-системы положительные результаты получены со 118

(98,3%) образцов. Наглядным примером может послужить рис. 3.

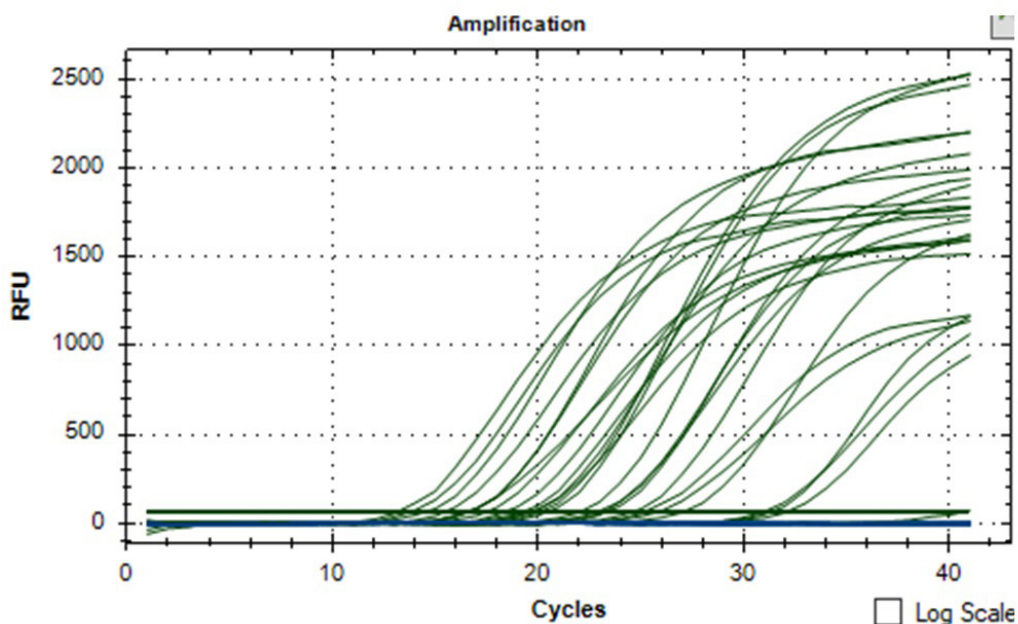


Рис. 3. Доказанная работоспособность набора реагентов ПЦР-системы на образцах, содержащих их ДНК *Gardnerella vaginalis*.

Для контроля работоспособности разработанной ПЦР-системы все выделенные образцы последовательно исследованы в ПЦР при помощи коммерческого набора сравнения «РеалБест ПЦР - 12 ИППП» (РУ № РЗН 2021/14056). Результаты детекции искомой

ДНК совпали, положительные результаты получены с теми же 118 (98,3%) образцами. Скорее всего, два (1,7%) отрицательных результата получены с двумя образцами, не содержащими ДНК *G. vaginalis* (см. таблицу).

Оценка работоспособности и диагностической эффективности разработанной ПЦР-системы в сравнении с результатами ПЦР коммерческого набора

Реагенты для постановки ПЦР	Результаты исследования ДНК <i>G. vaginalis</i>	
	Положительный (ДНК выявлено) (абс., %)	Отрицательный (ДНК не выявлено) (абс., %)
Реагенты разработанной ПЦР-системы	118 (98,3%)	2 (1,7%)
Набор реагентов «РеалБест ПЦР-12 ИППП»	118 (98,3%)	2 (1,7%)

В качестве дополнительного контроля специфичности просчитанных олигонуклеотидов, разработанная смесь для детекции ДНК *G. vaginalis* апробирована на перекрёстную реактивность с другими часто встречающимися возбудителями ИППП, такими как: *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*. Во всех постановках ПЦР с определением перекрёстной реактивности результаты исследования отрицательные, что демонстрирует высокую специфичность разработанных олигонуклеотидов в отношении ДНК *G. vaginalis*, отсутствие генетического родства с возбудителями

иных ИППП, зачастую протекающих у обследуемого пациента сочетано с БВ.

Результат апробации прямой ПЦР на *G. vaginalis*.
 После получения результатов, связанных с разработкой олигонуклеотидов для ДНК *G. vaginalis*, подборкой состава реакционной смеси и программы амплификации с образцами выделенной и очищенной ДНК проведены исследования в прямой ПЦР. Результаты исследования ДНК *Gardnerella vaginalis* с новой технологией прямой ПЦР сопоставлены с результатами исследования ДНК, предварительно выделенной и очищенной с использованием метода магнитной адсорбции [8].

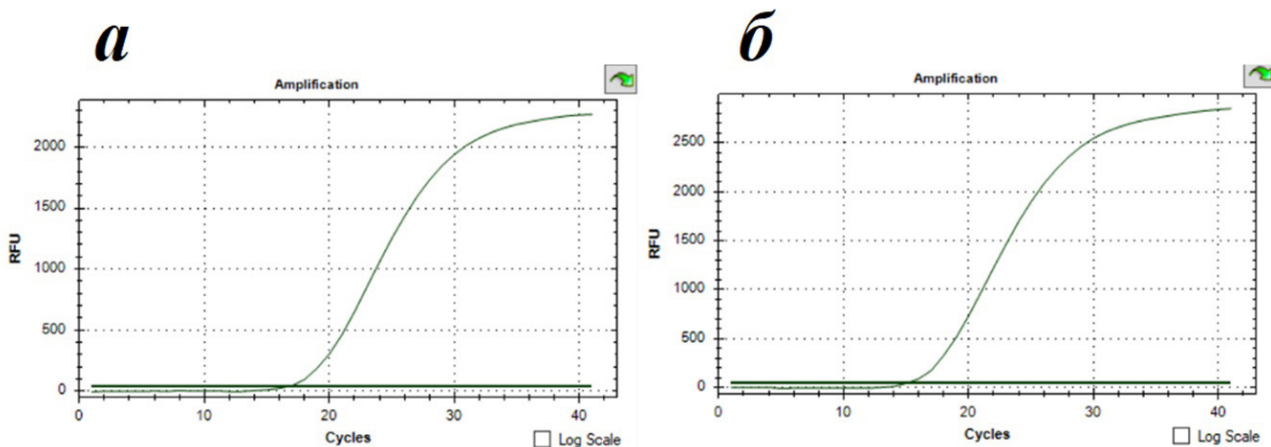


Рис. 4. Амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis* напрямую и после этапа её предварительной экстракции. а - прямая ПЦР без этапа экстракции ДНК; б - классическая ПЦР с этапом выделения нуклеиновых кислот при помощи метода магнитной адсорбции.

Как следует из рис. 4, а, б, подготовка и реализация технологии прямой ПЦР в проведении амплификации нуклеиновых кислот успешные. С применением новой ускоренной технологии положительные результаты детекции ДНК *G. vaginalis* получены со 116 (96,7%) клиническими образцами, тогда как с образцами ДНК, прошедшими процедуру выделения, в 118 (98,3%). В ряде случаев, таких, как на представленном рис. 4, показатели Ct и RFU для образцов, прошедших предварительную экстракцию, незначительно лучше, чем в прямой ПЦР. Все эти факты и показатели свидетельствуют о полезности этапа очистки для получения качественного результата исследования в ПЦР. Но при этом проделанная работа имеет важное значение, поскольку при её выполнении доказана сама возможность

детекции ДНК *G. vaginalis* и получения её ампликонов в качественных клинических или исследовательских целях методом ПЦР-РВ без предварительного этапа экстракции.

Инновационная методика прямой ПЦР позволяет ускорить детекцию ДНК *G. vaginalis* в рамках качественной диагностики гарднереллёза и обеспечить более быстрый процесс получения копий ДНК данной бактерии для последующих исследований.

Заключение. Быстрая и эффективная диагностика инфекционных заболеваний методом ПЦР, как и ускоренное получение копий ДНК для научного исследования зачастую очень важны. Классический вариант ПЦР включает предварительный этап экстракции и очистки нуклеиновых кислот для их последующей амплифика-

ции, что занимает различное время в зависимости от избранного метода выделения нуклеиновых кислот.

Для ускорения исследования ДНК *G. vaginalis* путём амплификации для разных целей апробирован метод прямой ПЦР (direct polymerase chain reaction), при котором исследуемый образец вносится непосредственно в реакционную смесь для проведения ПЦР. Для реализации этого подхода просчитаны специфичные к *G. vaginalis* олигонуклеотиды для ПЦР, разработан буфер для ПЦР, подобрана программа амплификации.

Апробация прямой ПЦР успешно воспроизведена при исследовании 120 клинических образцов, содержащих ДНК изучаемого патогена; результаты исследования сопоставлены с результатами разработанной методики выделения и классической амплификации после экстракции. Расхождение в эффективности выявления составили 2 (1,7%) случая.

Разработанную методику прямой ПЦР можно рекомендовать к использованию при качественной детекции ДНК *G. vaginalis* для целей клинической диагностики или быстрого получения ампликонов.

Необходимо продолжить научные исследования для нивелирования различий в результатах прямой ПЦР по сравнению с результатами амплификации после выделения нуклеиновых кислот. Этот технологический подход необходимо апробировать при исследовании нуклеиновых кислот других возбудителей инфекций, передаваемых половым путём, таких как *Candida albicans*, *Human papillomavirus* и прочих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бактериальный вагиноз. Клинические рекомендации М.: Минздрав РФ, Российское общество дерматовенерологов и косметологов; 2022. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/206_2 (дата обращения 24.06.2024).
2. Рахматулина М.Р., Плахова К.И. Бактериальный вагиноз, ассоциированный с *Atopobium vaginae*. *Акушерство и гинекология*. 2012; 3: 88-92.
3. Герасимова А. Ключевые клетки в мазке женщин: что это и чем опасны. Электронный ресурс: Университетская клиника. Режим доступа: <https://unclinic.ru/kljuchevye-kletki-mazke-zhenshin/> (дата обращения 10.09.2024).
4. Крысанова А.А. *Gardnerella vaginalis*: генотипическое и фенотипическое разнообразие, факторы вирулентности и роль в патогенезе бактериального вагиноза. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2019; 68 (1): 59-68.
5. Боровкова Л. В., Челнокова Е.В. Современные методы диагностики и лечения инфекций, передающихся половым путем. *Медицинский альманах*. 2010; 11 (2): 150-5.
6. Кулаков В.И., Серов В.Н., Абакарова П.Р., Антонов А.Г. Рациональная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. Руководство для практических врачей. Кулаков В.И., Серов В.Н., ред. М.: Литтерра; 2006.
7. Основы полимеразной цепной реакции. Методическое пособие. М.: ООО «ДНК-Технология». https://dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf (дата обращения 10.09.2024).
8. Жигалева О.Н., Ильин И.И., Марданлы С.Г., Марданлы С.С. Разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала на основе магнитной адсорбции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (10): 650-7. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657>.
9. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (ПУ на изделие «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с принадлежностями»), 2024. Режим доступа: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 29.05.2024).
10. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Усачева А.Н. Роль ПЦР в исследованиях взаимосвязи вируса герпеса 6 типа и развития заболеваний. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2023; 3: 4-7. DOI: 10.51620/2687-1521-2023-3-15-4-7.
11. Панфёрова Ю.А. Анализ *in silico* гена *vly*, кодирующего цитоллизин, вагинолизин, у штаммов *Gardnerella vaginalis* различного географического происхождения. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019; 3: 8.
12. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: *Лаборатория знаний*; 2019.

REFERENCES

1. Bacterial vaginosis. Clinical guidelines [Bakterial'nyi vaginoz. Klinicheskie rekomendatsii]. Moscow: Minzdrav RF, RODVK; 2022. Access mode: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/206_2 (accessed: 24.06.2024). (in Russian)
2. Rakhmatulina M.R., Plakhova K.I. Bacterial vaginosis associated with *Atopobium vaginae*. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2012; 3: 88-92. (in Russian)
3. Gerasimova A. Key cells in women's smears: what are they and why are they dangerous? Electronic resource: Universitetskaya klinika. Access mode: <https://unclinic.ru/kljuchevye-kletki-mazke-zhenshin/> (accessed: 10.09.2024). (in Russian)
4. Krysanova A.A. *Gardnerella vaginalis*: genotypic and phenotypic diversity, virulence factors and role in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2019; 68 (1): 59-68. (in Russian)
5. Borovkova L.V., Chelnokova E.V. Modern methods of diagnosis and treatment of sexually transmitted infections. *Meditsinskiy al'manakh*. 2010; 11 (2): 150-5. (in Russian)
6. Kulakov V.I., Serov V.N., Abakarova P.R., Antonov A.G. Rational pharmacotherapy in obstetrics and gynecology. A guide for practitioners [Ratsional'naya farmakoterapiya v akusherstve i ginekologii. Rukovodstvo dlya prakticheskikh vrachey]. Kulakov V.I., Serov V.N., eds. Moscow: Litterra; 2006. (in Russian)
7. Basics of polymerase chain reaction: Methodological manual [Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsii. Metodicheskoe posobie]. Moscow: DNK-Tekhnologiya; 2024. Access mode: https://dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf (accessed: 10.09.2024). (in Russian)
8. Zhigaleva O.N., Ilin I.I., Mardanly S.G., Mardanly S.S. Development of a set of reagents for the isolation of nucleic acids from clinical material based on magnetic adsorption. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (10): 650-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657. (in Russian)
9. Federal Service for Surveillance in Healthcare: State register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices (Registration certificate for a medical product «Thermal cycler for amplification of nucleic acids 1000 with accessories»), 2024. Access mode: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 29.05.2024). (in Russian)
10. Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Usacheva A.N. The role of PCR in studies of the relationship between herpes virus type 6 and the development of diseases. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2023; 3: 4-7. DOI: 10.51620/2687-1521-2023-3-15-4-7. (in Russian)
11. Panferova Yu.A. *In silico* analysis of the *vly* gene encoding the cytolytic vaginalisin in *Gardnerella vaginalis* strains of different geographical origins. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya RAN*. 2019; 3: 8. (in Russian)
12. Rebrikov D.V. PCR in real time [PTSR v peal'nom vremeni]. Moscow: Laboratoriya znaniy; 2019. (in Russian)