Башмакова М. А.,
Савичева А. М.

Научно-исследовательский институт
акушерства и гинекологии
им. О. Д. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Для диагностики инфекционных заболеваний в современных условиях наряду с классическими культуральными методами все чаще используются новые достижения молекулярной биологии. В статье кратко изложены основы молекулярно-биологической диагностики инфекций, а также использование амплификации нуклеиновых кислот в разных аранжировках полимеразной цепной реакции, в том числе и осуществляемой в реальном времени. Приведены примеры количественного определения ДНК микроорганизмов, актуальных для акушерства и неонатологии.

Ключевые слова: генодиагностика, инфекции гениталий, ДНК-зонды, ПЦР, Real-time ПЦР

Стремительное внедрение генодиагностики в медицинскую практику можно сравнить с повсеместной компьютеризацией разных сторон повседневной жизни. Возникла целая область диагностической молекулярной микробиологии, основанная на принципе гибридизации нуклеиновых кислот, при помощи которой определяются патогенные микроорганизмы, их типы и подтипы, антибиотикочувствительность.

За относительно короткое время (несколько десятков лет) методы молекулярной биологии стали использовать не только в диагностической микробиологии, но ее применение распространилось на многие другие объекты и тем самым представило потенциальную возможность революционизировать биологическую науку.

Фундаментальные принципы молекулярной генетики выросли из генетики бактерий, бактериофагов, бактериальных энзимов [12]. Открытие двойной спирали ДНК, расшифровка генетического кода, изучение механизмов репликации и синтетических способностей *E. coli* составило основу, на которой развилась современная биотехнология. Благодаря бактериальному ферменту термостабильной ДНК-полимеразе — продукту жизнедеятельности бактерий *Thermus aquaticus* — создан и широко применяется метод цепной полимеразной реакции.

Еще 20 лет назад возможность произвести миллиарды определенных последовательностей нуклеиновых кислот *in vitro* казалась фантазией, а сегодня такая возможность является реальностью и широко используется в разных областях жизни. Первые достижения в генодиагностической микробиологии связаны с применением олигонуклеотидных зондов — синтетических аналогов видоспецифических нуклеиновых кислот. Зонды могут быть направлены как на ДНК мишени, так и на фрагменты РНК, так как одноцепочечные нуклеиновые кислоты соединяются с комплементарными участками зонда. Они могут быть длиной от 20 до 1000 нуклеотидов, что диктуется потребностью опыта. Олигонуклеотидные зонды обладают способностью быстро гибридизироваться, соединяясь с точно таким же участком молекулы-мишени. При строгих условиях опыта олигонуклеотидные зонды могут различать изменения в одном нуклеотиде внутри данной нуклеотидной цепочки [15].

Будучи помеченными энзимами, хемилюминесцентными веществами, радиоизотопами, зонды могут гибридизироваться с мишенью в растворах, на твердых подложках, на бумаге и *in situ* в препаратах из клинических и патологоанатомических образцов. Чувствительность реакции в медицинской практике обычно соответствует чувствительности культурального метода, т. е. может обнаружить 10^4–10^5 молекул.

 ISSN 1684-0461

Значительно чувствительнее методы молекулярной диагностики, основанные на амплификации нуклеиновых кислот. В нашей стране особенно широко распространена полимеразная цепная реакция. Также как и при использовании молекулярной гибридизации, необходимой частью реакции является избирательное присоединение нуклеотидов к комплементарному участку ДНК-мишени. Особенностью ПЦР является энзиматическая дупликация гибрида, что приводит к образованию множества копий и, соответственно, к высокой чувствительности диагностического метода.

При амплификации с помощью ПЦР используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующие интересующий нас участок ДНК. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК.

В реакционном растворе должны присутствовать дезоксинуклеозидфосфаты, из которых строятся отрезки ДНК, а также ПЦР-буфер. Реакции происходят в термоциклерах с автоматическим изменением температуры в нужных пределах. В протокол типичной ПЦР входит 30–40 термальных циклов. Теоретически в каждом цикле происходит удвоение мишени, и таким образом накапливается огромное количество продуктов амплификации — ампликонов.

Учет реакции наиболее часто производят при помощи электрофореза в агарозном геле, помещенном в электрическое поле. Подвижность ампликона зависит от его размера и точно соответствует подвижности контрольного образца. В агарозный гель вводится раствор флюорофора бромистого этидия, который окрашивает двухцепочечную ДНК. Положительный результат ПЦР учитывается по полосе свечения, хорошо различимой в ультрафиолетовом свете.

Одним из уязвимых моментов в электрофоретическом учете результатов является возможность загрязнений (контаминации) при нанесении продуктов амплификации в лунки агарозного геля. Именно поэтому вся работа лаборатории, использующей ПЦР, строго регламентирована, поскольку ничтожное количество ДНК при амплификации многократно увеличивается.

Для учета результатов ПЦР применяют также гибридизационный иммуноферментный анализ с использованием специальной аппаратуры и реактивов.

Сходна по существу с ПЦР лигазная цепная реакция (ЛЦР), в которой используется фермент лигаза, а учет результатов осуществляется с помощью дополнительной иммунолюминесцентной реакции. При этом снижена возможность контаминации, однако ЛЦР требует специальной аппаратуры, еще не выпускаемой в России.

Имеются также и другие модификации реакции амплификации нуклеиновых кислот: множественная и гнездная амплификация, SD-амплификация, ПЦР после обратной транскрипции (ОТ ПЦР). Для этих модификаций ПЦР созданы автоматические системы учета, что делает такую аппаратуру достаточно дорогой.

Одним из последних методов амплификации нуклеиновых кислот по времени разработки и внедрения является ПЦР в реальном времени (Real-time PCR). Существуют тест-системы для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Gardnerella vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Candida albicans, Trichomonas vaginalis, Cytomegalovirus,* вирусов гепатита В и С. Система iCycler iQ фирмы Bio Rad состоит из амплификатора и оптического модуля. Оптический модуль осуществляет динамическое измерение флюоресценции, генерируемой флюорофорами — либо интеркалирующими (SYBR-green 1), либо пришитыми к зондам. Увеличение флюоресценции за счет накопления продуктов амплификации отображается на дисплее прибора в конце каждого цикла. Автоматическая регистрация, математический анализ, интерпретация полученных результатов с возможностью выражения количества копий ДНК в геном/эквивалентах или в метрических единицах повышают объективность оценки, обеспечивают воспроизводимость реакции. Исключается необходимость проведения пост-ПЦР этапов, таких как электрофорез или гибридизационный иммуноферментный анализ. Резко снижается риск контаминации, ускоряется получение результатов, что существенно при анализе большого числа материалов. Существует возможность одновременного использования нескольких флюорохромов и, следовательно, нескольких ДНК-зондов для одновременного обнаружения ДНК-мишений в одной пробе: либо нескольких генотипов одного микроорганизма, либо генотипов разных микроорганизмов.

Весьма важно, что *Real-time PCR* обеспечивает точную оценку числа копий ДНК, так как присутствующее в пробе количество ДНК оценивается по началу логарифмической фазы реакции, а не по количеству продуктов амплификации в конце реакции. *Real-time PCR* незаме-

нима при определении эффективности лечения гепатитов, СПИДа, ряда других инфекций.

Поскольку увеличение флюоресценции может быть связано как с накоплением амплифицированного специфического продукта, так в ряде случаев и с накоплением неспецифических субстратов (праймеры-димеры, шмеры), для получения истинных результатов производят дополнительный анализ полученных ампликонов с помощью построения кривых плавления (*melting curves*). После окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют (автоматически) флюоресценцию. При достижении точки плавления продукта амплификации флюоресценция резко снижается. Точки плавления ДНК разных видов микроорганизмов различны, таким образом кривые плавления подтверждают данные флюоресценции. Полная автоматизация всего процесса реакции ведет к значительному ускорению и увеличению точности исследования. Так, например, за 70–120 минут можно определить количество вируса гепатита В в сыворотке крови больных [8].

В диагностике урогенитального хламидиоза давно и в широких масштабах применяется традиционная модель постановки ПЦР, которая с 1989 года оценена как высоко специфический метод распознавания *Chlamydia trachomatis* [13]. ПЦР в реальном времени для выявления *C. trachomatis* стала возможной относительно недавно [1]. В ней используется флюоресцент интеркалирующий зонд SYBR Green 1, что делает метод относительно недорогим. Праймеры и дезоксинуклеозидфосфаты отделены от остальных компонентов ПЦР-смеси парафиновой прослойкой, что обеспечивает проведение ПЦР с «горячим стартом».

Амплификацию и детекцию флюоресценции проводят с помощью прибора «iCycler iQ» (Bio-Rad США), после окончания ПЦР анализируются кривые плавления ДНК. Опыты показали, что ПЦР в реальном времени снижает время проведения анализа, исключает риск контаминации, снимает проблему субъективной оценки, которая возможна при детекции с помощью электрофореза. Важно также цифровое выражение полученных данных.

Микроорганизмы, которые при определенных условиях могут приводить к патологическим процессам, так называемые условно патогенные микробы, обычно вызывают воспалительный процесс при высокой их концентрации. Традиционная ПЦР — реакция качественная, количество реагирующей ДНК остается неизвестным. Это в первую очередь относится к генитальным микоплазмам (*Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma genitalium*), которые в небольших количествах в норме обитают на слизистых гениталий здоровых людей. ПЦР, осуществляемая в реальном времени, позволяет установить начальные значения кинетики ДНК и, следовательно, количество микроорганизмов. Уже появились исследования по уяснению роли *Mycoplasma genitalium* при уретритах с помощью *Real-time PCR*. Установлена более высокая концентрация *Mycoplasma genitalium* в моче у мужчин с уретритом, хотя низкие концентрации выявлены при отсутствии симптомов заболевания [16].

Количественное определение ДНК возбудителя важно также при изучении процесса, обусловленного и другими условно патогенными микроорганизмами — обитателями слизистых оболочек урогениталий, а также при бессимптомном течении латентных и персистирующих инфекций, например генитального хламидиоза. При сравнении результатов ПЦР с помощью тест-системы «АмплиСенс Chlamydia trachomatis» (электрофоретический метод детекции) и с помощью тест-системы для *Real-time PCR* совпадение результатов наблюдалось в 100%, но процесс учета в *Real-time PCR* происходил в автоматическом режиме с цифровым выражением полученных данных [1].

Среди вирусных генитальных инфекций наибольшее внимание уделяется цитомегалии. Количество ДНК цитомегаловируса в цельной крови и в плазме у пациентов с ВИЧ-инфекцией служит диагностическим признаком текущей цитомегалии. Критический уровень концентрации ДНК в цельной крови равен 3×10^3 копий в 1 мл, в плазме крови — 10^3 копий/мл. Эти концентрации ДНК цитомегаловируса коррелируют с наличием доказанного заболевания [2]. Для акушерства особый интерес представляет цитомегаловирусная инфекция, передаваемая от матери плоду. Количество ДНК в околоплодных водах у женщин с первичной цитомегаловирусной инфекцией, установленной с помощью серологических реакций (сероконверсия специфических IgG-антител, наличие IgM-антител и низкая авидность IgG-антител), коррелировало с исходом беременности и состоянием плода. Количество ДНК вируса цитомегалии было самым высоким в тех случаях, когда ультразвуковое исследование показало значительные патологические изменения у плода. Оно было равно $2,8\times10^5$ геном-эквивалент/мл [7]. Беременность у этих женщин была искусственно прервана. При нормальном течении беременности и отсутствии патологических изменений у плода по данным УЗИ беременность протекала нормально, закончилась родами, новорожденные дети не имели признаков цитомегалии. Количество ДНК вируса цитомегалии было низким и отличалось существенно от концентрации ДНК в околоплодных водах женщин, беременность которых пришлось прервать ($p=0,014$). Количе-

ственная ПЦР при исследовании околоплодных вод помогает различать инфекцию от заболевания плода [11]. Гепатит у новорожденных детей может быть обусловлен цитомегаловирусом. Применение Real-time PCR для определения количества вируса в крови больных гепатитом новорожденных детей показало наличие ДНК цитомегаловируса. Количество копий ДНК снижалось параллельно с нормализацией уровня аланинтрансаминазы [5].

Вторая вирусная инфекция, передаваемая вертикально от матери плоду, обусловлена герпетическими вирусами 1-го и 2-го типов.

При неонатальной герпетической инфекции определяли число копий ДНК в сыворотке и спинномозговой жидкости. С помощью *Real-time PCR* при диссеминированной инфекции установлены высокие уровни ДНК герпесвируса в сыворотке крови, при поражении головного мозга — высокий уровень ДНК вируса в спинномозговой жидкости. При тяжелейшем течении инфекционного процесса у новорожденных, умерших вскоре после рождения, определен самый высокий уровень вирусной нагрузки. Вирус герпеса 2-го типа чаще поражает головной мозг, при этом выше вирусная нагрузка. Естественно, прогноз заболевания хуже при высоких цифрах вирусной нагрузки [9].

Известны трудности различения герпетических вирусов 1-го и 2-го типов. *Real-time PCR* в 99% случаев позволяет определить тип герпетического вируса [3] и определить чувствительность к антивирусным препаратам [14]. *Real-time PCR* используют также для определения шестого типа герпетического вируса в слюне и лимфатических узлах [4].

Real-time PCR применима также для количественного определения ДНК *Toxoplasma gondii* в крови, спинномозговой жидкости, околоплодных водах, что позволяет судить о реактивации процесса и производить мониторинг паразита в ходе терапии [10].

Подведя итог изложенным материалам, можно с уверенностью сказать, что молекулярно-биологические методы диагностики инфекционных заболеваний нашли свое место и прочно лидируют среди всех других методов установления этиологического диагноза заболевания.

Развитие и совершенствование автоматических приборов не только сокращают число ручных манипуляций, но и обеспечивают точность диагностики и отсутствие ложно положительных результатов из-за контаминации. С этой точки зрения наиболее совершенной системой на сегодня является ПЦР в реальном времени. За исключением выделения ДНК из исследуемого образца, методика полностью автоматизирована и занимает всего 120 минут. В клинических условиях она полезна как для определения разных стадий инфекции, так и для контроля за лечением антимикробными препаратами.

В ГУ НИИАГ им. Д. О. Отта аппаратура для *Real-time PCR* используется для быстрой и точной диагностики урогенитальных и неонатальных инфекций, особенно вирусной этиологии. Несмотря на высокую стоимость *Real-time* аппаратуры, затраченные средства на ее приобретение и эксплуатацию окупаются современным дизайном лабораторной установки, экономией площади размещения, а главное — быстротой и точностью установления диагноза и гарантией чистоты опыта и отсутствия контаминации.

Литература

1. *Екимов А. Н., Шипулин Г. А.* Выявление Chlamydia trachomatis методом ПЦР в режиме реального времени // Генодиагностика инфекционных болезней.— Сб. тез. 4-й Всероссийской научно-практической конференции.— М., 2002.— С. 176–180.
2. *Atsuhi Y., Shigemi H., Takafumi F. et al.* Diagnosis and monitoring of human Cytomegalovirus diseases in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a Real-Time PCR assay // Clin. Infect. Dis.— 2001.— Vol. 33.— P. 1756–1761.
3. *Burrows J., Nitshe A., Bayly B. et al.* Detection and subtyping of Herpes simplex virus in clinical samples by Light Cycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture // BMC microbiology [electronic resource].— 2002.— Vol. 2(1).— P. 12.
4. *Collot S., Petit B., Bordessoule D. et al.* Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymphnodes and saliva // J. Clin. Microbiol.—2002.— Vol. 40 (7).— P. 2445–2451.
5. *Funato T., Satou N., Abukawa D. et al.* Quantitative evaluation of Cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis // J. Viral Hepat.— 2001.— Vol. 8(3).— P. 217–222.
6. *Gerard H. E., Krauße-Opatz B., Wong Z. et al.* Expression of Chlamydia trachomatis gens encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection // Molecular Microbiol.— 2001.— Vol. 41.— P. 731–741.
7. *Gouarin S., Gautta E., Vabret A. et al.* Real-time PCR quantification of human Cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samles from mother with primary infection // J. Clin. Microbiol.— 2002.— Vol. 40 (5).— P. 1769–1772.
8. Jardi R., Rodriguez E., Buti M. et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescences per assay // J. Viral Hepatitis.— 2001.— Vol. 8.— Issue 6.— P. 465–467.
9. Kimura H., Futamura M., Ito Y. et al. Quantitation of virus load in neonatal herpes simplex virus infection and comparision between type 1 and type 2 // J. Med. Viral.— 2002.— Vol. 67.— N 3.— P. 349–53.
10. Kupflerschmidt O., Krieger D., Held T.K. et al. Quantitative detction of Toxoplasma gondii DNA in humans fluids by Taq man polymerase chain reaction // Clin. Microbiol. Infect.—2001.— Vol. 7.— P. 120–124.
11. *Maine C. T., Lazzarotto T., Landin M. P.* New development in the diagnosis maternal and congenital CMV infection // Exp. Rev. Mol . Diagn.—2001.— Vol. 1 (1).— P. 19–20.
12. *Meselson M., Stahl F. W.* The replication of DNA in Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1958.— Vol. 44.— P. 671–82.

13. *Pollard D. R., Tyler S. D., Ng. C. W., Rozee K. P.* A polymerase chain reaction (PCR) protocol for specific detection of Chlamydia spp // Mol. Cell Probes.—1989.— Vol. 3.— P. 383–389.
14. *Stronsky R., Van Loon A. M., Polman M., Schuurman R.* Application of real-time PCR for determination of antiviral drug susceptibility of Herpex simplex virus // Antimicrobial agents and chemotherapy.—2002.— Vol. 46 (9).— P. 2943–2947.
15. *Unger E. R., Budgeon Z. R., Meerson D., Brigati D. Y.* Viral diagnosis by in situ hybridization: description of a rapid simplified colorimetric method // Amer. J. Surg. Pathol.— 1986.— Vol. 10.— P. 1–8.
16. *Yoshida T., Deduci T., Ito M. et al.* Quantitative detection of Mycoplasma genitalium from first pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR // J. Clin. Microbiol.— 2002.— Vol. 40(4).— P. 1451–1455.

ADVANCED METHODS FOR MOLECULAR-BIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF GENITAL INFECTIONS

Bashmakova M. A.,
Savitcheva A. M.

■ At present to diagnose infectious diseases new achievements of molecular biology are more often used equally with classic cultural methods. The article briefly presents the base of molecular-biological diagnostics of infections and the use of nucleic acids amplification with different arrangements of polimerase chain reaction including that being performed in real time. Examples of quantitative determination of DNA of microorganisms actual for obstetrics and neonatology.

■ **Key words:** gen-diagnostics, genital infections, DNA probes, PCR, Real-time PCR