

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Современная медицина успешно использует достижения естественных наук, интенсивно применяет новые технологии для диагностики и лечения заболеваний. В последнее время к традиционным микробиологическим и иммунологическим методам лабораторной диагностики инфекционных заболеваний добавились новые, основанные на использовании молекулярно-генетических технологий.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, лабораторная диагностика.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК (матрице), синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК "с нуля", ей необходима короткая "затравочная" цепь РНК или ДНК, к которой она может начать присоединять нуклеотиды.

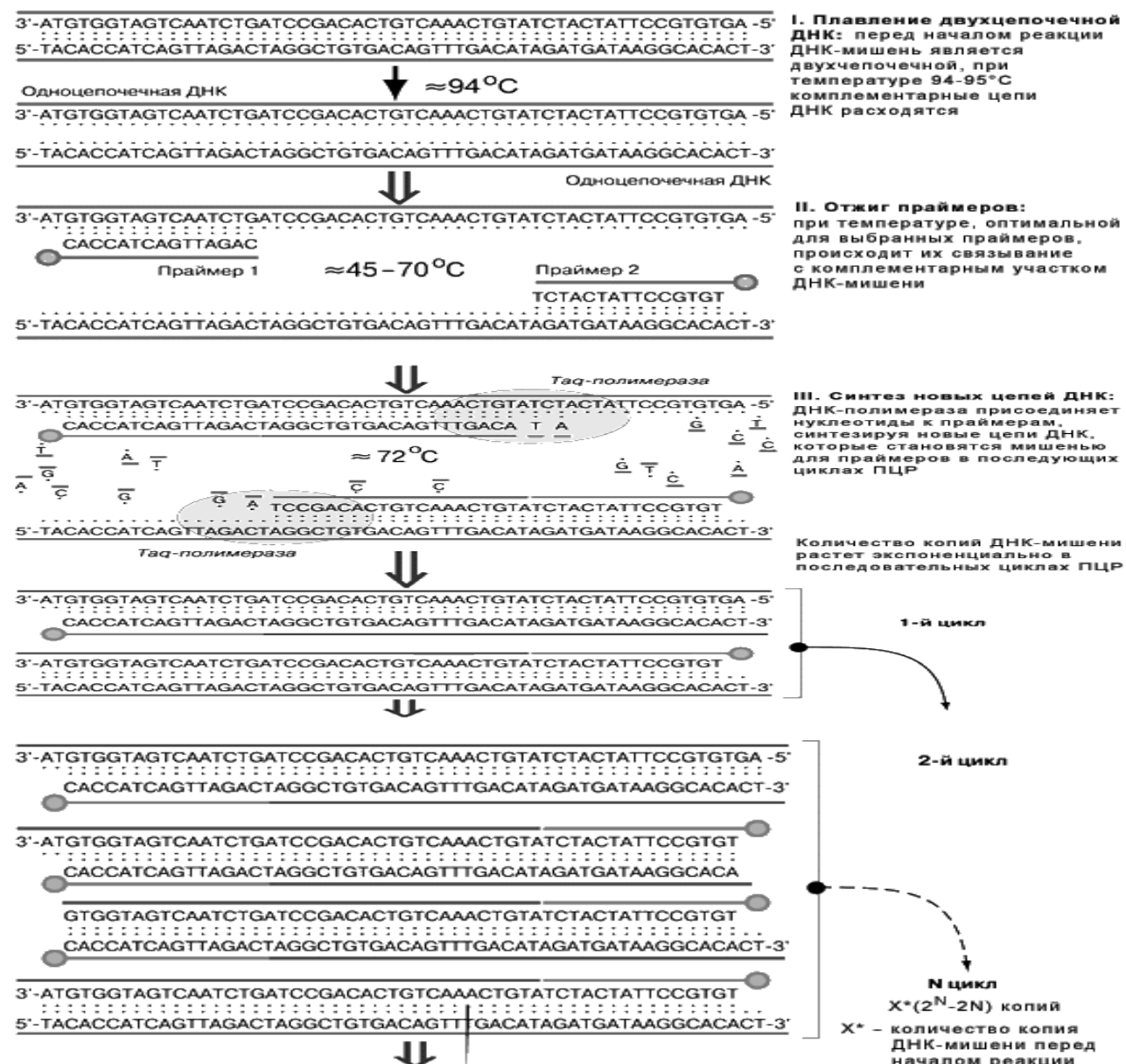


Рисунок 1 - Механизм полимеразной цепной реакции: основные этапы цикла ПЦР и процесс многократного копирования ДНК-мишени в ходе последовательно сменяющихся циклов

Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) инициируется специфическими праймерами (короткими фрагментами "затравочной" ДНК) в каждом из множества повторяющихся циклов. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров "узнавать" строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной комплементарности.

В обычной реакции ПЦР используется пара праймеров, которые "ограничивают" амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-матрицы. Для многократного увеличения количества копий исходной ДНК нужна цикличность реакции. Как правило, каждый из последовательно повторяющихся циклов ПЦР состоит из трех этапов:

1. денатурации, или "плавления" ДНК, когда двухцепочечная ДНК под действием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние;
2. связывания (отжига) праймеров с матричной ДНК;
3. элонгации, или удлинения цепи.

Смена этапов каждого цикла осуществляется путем изменения температуры реакционной смеси (рис. 1). Сначала праймеры могут связаться только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с копиями этой последовательности, синтезированными в предыдущих циклах. При этом количество основного продукта ПЦР (копии последовательности ДНК, ограниченной праймерами) теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально.

Усовершенствование технологии ПЦР

Первоначально для осуществления ПЦР использовали обычные ДНК-полимеразы, которые подвергались температурной инактивации в каждом цикле на этапе денатурации ДНК. Полимеразе приходилось многократно добавлять в реакционную смесь, что было довольно трудоемко и не позволяло автоматизировать процесс.

В реакции используются термостабильные ДНК-полимеразы, выдерживающие высокую температуру на всех этапах цикла ПЦР в течение нескольких десятков циклов. Количество коммерчески доступных термостабильных ДНК-полимераз, отличающихся некоторыми своими свойствами, достаточно велико. Наиболее часто используется Taq-полимераза, первоначально выделенная из термофильного микроорганизма *Thermus aquaticus*. Другие полимеразы чаще применяются для особых приложений ПЦР. Современные коммерческие препараты термостабильных полимераз обеспечивают, как правило, стабильную воспроизводимую активность, что позволяет использовать технологию ПЦР в стандартной лабораторной практике.

Для осуществления ПЦР в основном используются приборы (термоциклеры), которые изменяют температуру автоматически на основе заданной программы.

Таким образом, стандартная ПЦР может быть осуществлена за 1 – 3 ч. Многие приборы позволяют программировать специальные усложненные температурные профили, необходимые для специфических модификаций процесса ПЦР.

Параллельно с усовершенствованием технологии ПЦР развивались и методы анализа продуктов реакции. Метод гель-электрофореза с последующим окрашиванием красителем, специфичным к ДНК, например бромистым этидием, традиционно применяется во многих лабораториях для обнаружения амплифицированной ДНК и определения ее размера.

Использование гибридизации с внутренними ДНК-зондами позволяет в ряде случаев значительно повысить чувствительность и специфичность детектирования ПЦР-продуктов. Благодаря отсутствию необходимости в подготовке и проведении электрофоретического разделения, возможности автоматизации для анализа большого количества образцов и использования нерадиоактивного формата детектирования, этот метод становится все более распространенным. В некоторых случаях применение специальных флуоресцентных "маркеров" позволяет контролировать проведение амплификации или детектирование конечных продуктов ПЦР непосредственно в реакционной пробирке [4,8].

Использование ПЦР в медицинской микробиологии

Среди множества различных направлений клинической диагностики медицинская микробиология занимает, пожалуй, лидирующее место по количеству и разнообразию приложений, использующих технологию ПЦР. Внедрение в практику этого метода наряду с серологической диагностикой существенно расширило возможности современной клинической микробиологии, основу которой до сих пор составляют методы выделения и культивирования микроорганизмов на искусственных питательных средах или в культуре клеток.

Использование ПЦР для прямой диагностики и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний

В тех случаях, когда использование культуральных методов является проблематичным или связано с недостаточной диагностической эффективностью, возможность замены биологической амплификации (то есть роста на искусственных средах) на ферментативное удвоение нуклеиновых кислот *in vitro* с помощью ПЦР представляется особенно привлекательной. Существуют различные подходы к использованию ПЦР для диагностики возбудителей инфекций.

Наиболее распространенный вариант ПЦР (specific PCR) предусматривает использование праймеров, комплементарных специфического участка гена, характерной для строго определенного вида микроорганизма. Например, ПЦР-амплификация специфического участка гена, кодирующего главный белок наружной мембраны (*MOMP*) *Chlamydia trachomatis*, в сочетании с нерадиоактивной гибридизацией для детектирования продуктов реакции позволяет обнаружить единичные копии хламидийной ДНК в исследуемых образцах [2,3]. При этом ПЦР значительно превосходит по диагностической эффективности культивирование и методы прямого обнаружения хламидийного антигена (микробиоиммунофлуоресценцию и иммуноферментный анализ), традиционно используемые для выявления *S. trachomatis*.

Имеется также возможность использования сразу нескольких пар видоспецифических праймеров в одной реакционной пробирке для одновременной амплификации ДНК различных возбудителей. Такая модификация получила название множественной ПЦР (multiplex PCR). Множественная ПЦР может быть использована для выявления этиологической роли различных микроорганизмов, вызывающих заболевания определенного типа. Так, например, описаны варианты применения множественной ПЦР для одновременного обнаружения двух (*S. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* при заболеваниях урогенитального тракта [5]) или даже четырех возбудителей (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* и *A. otitidis* при хроническом гнойном отите [10]).

Альтернативный подход в ПЦР-диагностике связан с использованием универсальных праймеров, которые позволяют амплифицировать фрагменты генов, присутствующих у всех микроорганизмов определенной таксономической группы. Количество видов, которые могут быть выявлены с помощью этого метода, может ограничиваться как рамками небольших систематических групп (рода, семейства) [11], так и крупных таксонов на уровне порядка, класса, типа. В последнем случае мишенью для ПЦР чаще всего являются рибосомные гены (16S и 23S рРНК), которые имеют сходную структуру у различных прокариотических микроорганизмов.

Использование праймеров, комплементарных консервативным участкам этих генов, позволяет амплифицировать ДНК большинства видов бактерий [7,8]. Полученные в результате ПЦР фрагменты рибосомных генов могут быть затем проанализированы с помощью различных лабораторных методов с целью идентификации бактерий, которым они принадлежат. Наиболее точным методом "молекулярной" идентификации является определение полной нуклеотидной последовательности (секвенирование) амплифицированной ДНК и сравнение ее с соответствующими последовательностями известных видов [1,9].

Несмотря на наличие автоматизированных систем, использующих описанный принцип идентификации, на практике обычно используются менее трудоемкие и дорогостоящие методы, которые тем не менее позволяют достоверно выявлять определенные различия в последовательности ДНК-фрагментов. Наиболее распространенными являются методы, основанные на анализе расположения в ДНК участков расщепления ферментами-рестриктазами – метод ПДРФ (RFLP) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, или на определении электрофоретической подвижности ДНК в одноцепочечной форме (метод SSCP – одноцепочечный конформационный полиморфизм) [12].

ПЦР с использованием универсальных праймеров может применяться как для идентификации выделенных в чистой культуре микроорганизмов, так и для прямой диагностики широкого спектра возбудителей непосредственно в клинических образцах. Следует

однако отметить, что чувствительность ПЦР "широкого спектра", как правило, ниже по сравнению с "видоспецифическими" тест-системами. Кроме того, ПЦР с универсальными праймерами обычно не используется для исследования образцов, в которых может находиться большое количество различных микроорганизмов, из-за трудности анализа продуктов реакции, полученных в результате амплификации ДНК разных видов.

Использование ПЦР для выявления лекарственной устойчивости у микроорганизмов

В последнее время ПЦР все чаще используется для исследования различных свойств патогенных микроорганизмов, в частности для выявления устойчивости отдельных видов возбудителей к определенным лекарственным препаратам. Как правило, использование ПЦР для определения чувствительности микроорганизмов является целесообразным лишь в тех случаях, когда традиционные фенотипические методы неприменимы или недостаточно эффективны. Например, определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам с помощью культуральных методов занимает обычно от 4 до 8 нед. Кроме того, результаты фенотипических тестов в подобных случаях могут быть искажены в связи со снижением активности антимикробных препаратов в процессе длительного культивирования микроорганизмов.

Исследование молекулярных механизмов лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* и некоторых других возбудителей позволило разработать методы на основе ПЦР для быстрого выявления генетических маркеров резистентности.

Для подобного анализа обычно используется ДНК или РНК возбудителя, выделенного в чистой культуре. Однако в некоторых случаях имеется возможность прямого ПЦР-анализа на антибиотикорезистентность без предварительно культивирования возбудителя. Исследуемый образец клинического материала при этом используется как источник ДНК-мишени для ПЦР, а откопированный ПЦР-продукт подвергается анализу с целью выявления мутаций, связанных с антибиотикорезистентностью. Разработан, например, метод, позволяющий с помощью ПЦР обнаружить у пациентов, страдающих туберкулезным менингитом, устойчивость возбудителя к рифампицину.

Существуют, однако, естественные ограничения для использования генетических методов оценки лекарственной устойчивости микроорганизмов:

- данные о конкретных генетических механизмах резистентности могут отсутствовать;
- резистентность к определенным препаратам часто бывает связана с различными механизмами и мутациями в различных генах, которые независимо влияют на фенотип.

Кроме того, отсутствие международных стандартов и рекомендаций по использованию ПЦР для определения чувствительности к антимикробным препаратам является дополнительным фактором, ограничивающим возможность широкого применения этого подхода в практической диагностике.

Преимущества и недостатки метода ПЦР

О многих преимуществах использования ПЦР по сравнению с традиционными микробиологическими методами уже изложено. Такие свойства ПЦР, как скорость и высокая производительность (то есть возможность параллельного анализа большого количества образцов), являющиеся бесспорными преимуществами данного метода. Стандартные процедуры выделения микробной ДНК из клинического материала или чистой культуры и последующей ПЦР-амплификации обычно требуют для своего завершения не более нескольких часов. Продукты ПЦР могут быть идентифицированы с помощью простых методов (гель-электрофорез, гибридизация) приблизительно за то же время.

Преимущество ПЦР в скорости по сравнению с культуральными методами особенно заметно при исследовании медленно растущих микроорганизмов. Однако даже в случае быстрорастущих культур оперативность ПЦР может быть полезной. Например, выделение, идентификация и определение лекарственной устойчивости у штаммов метициллинорезистентного золотистого стафилококка (MRSA) с помощью традиционных микробиологических методов требуют не менее 3 – 5 дней, в то время как ПЦР-анализ позволяет выявить MRSA менее чем за сутки.

Важное свойство ПЦР – ее высокая специфичность, определяемая, прежде всего уникальностью генетического материала каждого вида микроорганизмов. Поэтому при использовании праймеров, комплементарных определенной "видоспецифической" последовательности ДНК, и соблюдении оптимального температурного режима реакции только ДНК искомого вида подвергается многократному копированию даже в присутствии большого количества другой, "балластной", ДНК, например ДНК человека или других видов микроорганизмов.

При использовании ПЦР для выявления определенного возбудителя специфичность является несомненным достоинством этого метода. С другой стороны, всегда следует помнить об "узкой направленности" ПЦР в отличие от культуральных методов, которые позволяют выявить рост различных видов микроорганизмов при посеве на первичные накопительные среды.

Помимо высокой оперативности и специфичности ПЦР отличается чрезвычайно высокой чувствительностью. Теоретически для осуществления реакции достаточно всего одной копии искомого ДНК(РНК)-последовательности в исследуемом материале. Если в качестве мишени для ПЦР используется фрагмент ДНК, представленный большим количеством копий в геноме возбудителя (например, гены 16S рРНК у многих видов бактерий), то ПЦР позволяет обнаружить менее одного микроорганизма в образце (то есть фрагмент ДНК из лизированной микробной клетки).

Следовательно, чувствительность порядка 0,5–1 микроорганизма на пробу вполне реальна для ПЦР, что позволяет использовать ее даже в тех случаях, когда серологические и бактериологические исследования не дают положительного результата вследствие крайне низкого микробного титра (например, при контроле инфекционной безопасности донорской крови и органов, диагностике хронических и латентных инфекций).

В то же время экстремальная чувствительность ПЦР требует новых подходов к клинической интерпретации результатов, получаемых в лаборатории. В частности, выявление в клинических образцах сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов может не означать наличия патологического процесса и поэтому не может быть автоматически интерпретировано как диагноз, особенно на фоне благополучной клинической картины у пациента. По этой же причине следует с осторожностью использовать ПЦР для анализа образцов с характерным полимикробным сообществом (кал и материал, полученный из верхних дыхательных путей и гениталий).

Экстремальная чувствительность реакции ферментативной амплификации ДНК является одновременно ахиллесовой пятой технологии ПЦР. Этот парадокс известен также как проблема чувствительности ПЦР к загрязнению (контаминированию) посторонними молекулами ДНК, которые могут служить мишенью для используемого набора праймеров [6]. Даже единичные молекулы загрязняющей ДНК могут быть многократно копированы в процессе ПЦР, приводя к образованию целевого ДНК-продукта, а, следовательно, к ложноположительному результату.

В связи с опасностью получения ложноположительных результатов в лабораториях, постоянно использующих ПЦР в диагностических целях, необходимы соблюдение строгих требований и специальные подходы, направленные на снижение риска ПЦР-загрязнения.

Одним из наиболее существенных требований, предъявляемых к диагностическим ПЦР-лабораториям, является необходимость разделения лаборатории на "пред-ПЦР-помещение", где осуществляются обработка образцов и приготовление реакционных смесей, и "после-ПЦР-помещение", где анализируются продукты реакции. Обязательными являются также раздельное хранение реактивов и материалов, используемых на разных этапах ПЦР, максимальное использование одноразовых пластиковых материалов на этапе, предшествующем амплификации, и регулярная обработка помещений ультрафиолетовым (УФ) излучением, повреждающим загрязняющие последовательности ДНК.

Дополнительные меры, обеспечивающие защиту ПЦР от загрязнения, могут включать использование ламинарных боксов для работы с образцами и приготовления ПЦР-смесей, специальные биохимические (урацилгликозилаза) и физико-химические (УФ излучение +

изопсорален) методы инактивации ПЦР-продуктов. Особенно важно для оценки достоверности данных ПЦР-анализа и отсутствия ложноположительных результатов регулярное исследование отрицательных контролей (не содержащих ДНК-мишень) параллельно с клиническими образцами.

Помимо опасности получения ложноположительных результатов существует и обратная проблема, связанная со снижением чувствительности ПЦР, следствием которого являются ложноотрицательные результаты. На практике вопрос о соотношении теоретической (то есть максимально возможной) и реальной чувствительности ПЦР не всегда решается однозначно. Чувствительность ПЦР может быть снижена вследствие многих причин, наиболее важной из которых является ингибирование реакции компонентами биологических образцов.

Ингибиторы ПЦР могут присутствовать в образцах крови (гемоглобин), мокроты, мочи, биопсийном материале. Различные вещества, например часто используемые антикоагулянты (особенно гепарин) или компоненты кровяных питательных сред, могут также подавлять реакцию амплификации ДНК. Ингибирование ПЦР обычно можно выявить путем искусственного добавления ДНК-мишени к исследуемому образцу и ее последующей амплификации. Отрицательный результат, полученный с заведомо положительным контролем, может говорить о наличии ингибиторов, для устранения которых необходимо использовать разведение образца или специальные методы подготовки проб.

Серьезную проблему представляет также выбор конкретных методов подготовки клинических образцов к исследованию с помощью ПЦР. В настоящее время не существует универсальных подходов к выделению ДНК разных видов микроорганизмов из различных источников. Быстрые методы подготовки проб, предусматривающие возможность автоматизации, иногда не позволяют достичь требуемого уровня чувствительности. С другой стороны, многоэтапные методики, позволяющие очистить и сконцентрировать микробную ДНК для ПЦР-анализа, оказываются трудоемкими и могут увеличивать риск контаминирования образцов.

Наконец, ПЦР является дорогостоящей. Для ее реализации необходимо комплексное оснащение лаборатории, включая не только термоциклер и устройство для ДНК-электрофореза, но и отдельные центрифуги, холодильники, дозаторы и другое оборудование. Затраты на ПЦР включают высокую стоимость реактивов и расходуемых материалов. Поэтому только в случае выявления и исследования труднокультивируемых возбудителей ПЦР может быть сопоставима по стоимости с традиционными микробиологическими методами.

Заключение

Уже сейчас ПЦР является незаменимым инструментом в диагностике и исследовании многих возбудителей инфекционных болезней, а количество лабораторных исследований с помощью ПЦР продолжает стремительно расти. Дальнейшее развитие и внедрение этого метода в практику клинических диагностических лабораторий может быть связано с совершенствованием и стандартизацией самой технологии, особенно этапов подготовки образцов и анализа продуктов реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Ллуэлин М.Б. Определение нуклеотидной последовательности ДНК. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир; 1999. с.428 - 47.
- 2 Маккреди Б.Дж., Чимера, Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир; 1999. с.496 - 506.
- 3 Bobo L.D. PCR Detection of Chlamydia trachomatis. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. ASM Press: Washington; 1993. p. 235 - 41.
- 4 Cockerill III F.R. Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:199 - 212.
- 5 Crotchfelt K.A., Welsh L.E., DeBonville D., Rosenstrauss M., Quinn T.C. Detection of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis in Genitourinary Specimens from Men and Women by a Coamplification PCR Assay. J Clin Microbiol 1997;35:1536 - 40.
- 6 Dragon A.D., Spadoro J.P., Madej R. Quality Control of Polymerase Chain Reaction. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington: ASM Press; 1993. p.160 - 8.
- 7 Fatima-Hannachi M., Gascoyne-Binzi D.M., Heritage J., Hawkey P.M. Detection of Mutations Conferring Extended-Spectrum Activity of SHV (-Lactamases using Polymerase Chain Reaction Single Strand Conformational Polymorphism (PCR-SSCP). J. Antimicrob Chemother 1996;37:797 - 802.
- 8 Fredericks D.N., Relman D.A. Application of Polymerase Chain Reaction to the Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Infect Dis 1999;29:457 - 88.
- 9 Greizen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR Primers and Probes for the 16S rRNA Gene of Most Species of Pathogenic Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol 1994;32:335 - 51.
- 10 Hendolin P.H., Markkanen A., Ylikoski J., Wahlfors J.J. Use of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Four Bacterial Species in Middle Ear Effusions. J Clin Microbiol 1997;35:2854 - 8.
- 11 McDonough M., Kew O., Heirholzer J. PCR Detection of Human Adenoviruses. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington: ASM Press; 1993. p. 389 - 93.
- 12 Meijer A., Kwakkel G.J., DeVries A., Schouls L.M., Ossewaarde J.M. Species Identification of Chlamydia Isolates by Analysing Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S - 23S rRNA Spacer Region.

А.Ш. ОРАДОВА

ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕТТІК РЕАКЦИЯ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАДА

Түйін: Қазіргі медицина ойдағыдай табиғи ғылымның табыстарын пайдаланады, қарышты жаңа технологияларды диагностика және ауруға шалдығудың шипасы үшін қолданады. В соңғы уақытты инфекцияның ауруға шалдығуының зертханалық диагностикасының дәстүрлі микробиологиялық және иммунологиялық әдістеріне молекулалық-генетикалық технологияның игерушілігінде жаңа, негізде қосыла кетті.

Түйінді сөздер: полимеразды тізбеттік реакция, зертханалық диагностика.

A.S.ORADOVA

POLYMERASE CHAIN REACTION IN LABORATORY DIAGNOSTICS

Resume: The modern medicine successfully uses achievements of natural sciences, intensively applies new technologies to diagnostics and treatment of diseases. Recently to traditional microbiological and immunological methods of laboratory diagnostics of infectious diseases were added new, based on use of molecular and genetic technologies.

Keywords: polymerase chain reaction, laboratory diagnostics