

УДК 616-078:577.2

Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике

Л. В. Лопухов¹, М. В. Эйдельштейн²¹ Казанский институт биохимии и биофизики РАН, г. Казань, Россия² Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, г. Смоленск, Россия

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. Применение этих методов не только в научных целях, но и в практической лабораторной диагностике стало возможным в немалой степени благодаря созданию в середине 80-х годов процесса искусственного многократного копирования ДНК и дальнейшему стремительному развитию этой технологии, в настоящее время известной как *полимеразная цепная реакция* (ПЦР). Менее чем за 15 лет своего существования ПЦР сделала рутинным ана-

лиз специфических ДНК-последовательностей многих патогенных микроорганизмов. Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали метод ПЦР незаменимым для решения различных задач клинической диагностики, таких, как прямое обнаружение и идентификация возбудителей заболеваний, молекулярное типирование и исследование свойств патогенных микроорганизмов, анализ мутаций, связанных с генетическими заболеваниями у человека, идентификация личности человека. Настоящая статья посвящена рассмотрению наиболее общих принципов ПЦР и использованию этой технологии в области клинической микробиологии.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, идентификация возбудителей инфекций, лекарственная устойчивость микроорганизмов.

Polymerase Chain Reaction in Diagnostic Clinical Microbiology

L.V. Lopukhov¹, M.V. Edelstein²¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, RAS, Kazan, Russia² Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia

Today's medicine takes advantage of the latest achievements in natural sciences and successfully employs new techniques to the diagnostics and treatment of diseases. Recently molecular-genetic approaches have been applied in the field of diagnostics of infectious diseases in addition to the conventional culture-based and serological methods.

The widespread use of molecular methods not only in the research laboratories but also in clinical practice has been made possible with the introduction in the mid-80s and subsequent progress of the technology of in vitro specific DNA-amplification currently known as *Polymerase Chain Reaction* (PCR). During the last 15 years PCR has made the analysis of several human and microbial genes a routine practice. The key features of PCR namely the versatility, high specificity and sensitivity and relative ease of use have made it an indispensable tool for many diagnostic applications, including direct

Контактный адрес:

Михаил Владимирович Эйдельштейн

Факс: (0812) 61-1294

Эл. почта: me@antibiotic.ru

detection and identification of microbial pathogens; molecular typing and genetic characterisation of microorganisms; analysis of mutations contributing to the genetic diseases in humans; human DNA fingerprinting. The present paper reviews the very

basic principles of PCR and its application in the field of clinical microbiology.

Key words: Polymerase chain Reaction, identification of microorganisms, antimicrobial resistance.

Что такое ПЦР?

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – искусственный процесс многократного копирования (*амплификации*) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro* (см. рисунок). 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.

Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) иницируется 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 последовательно-

сти ДНК, ограниченной праймерами) теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально.

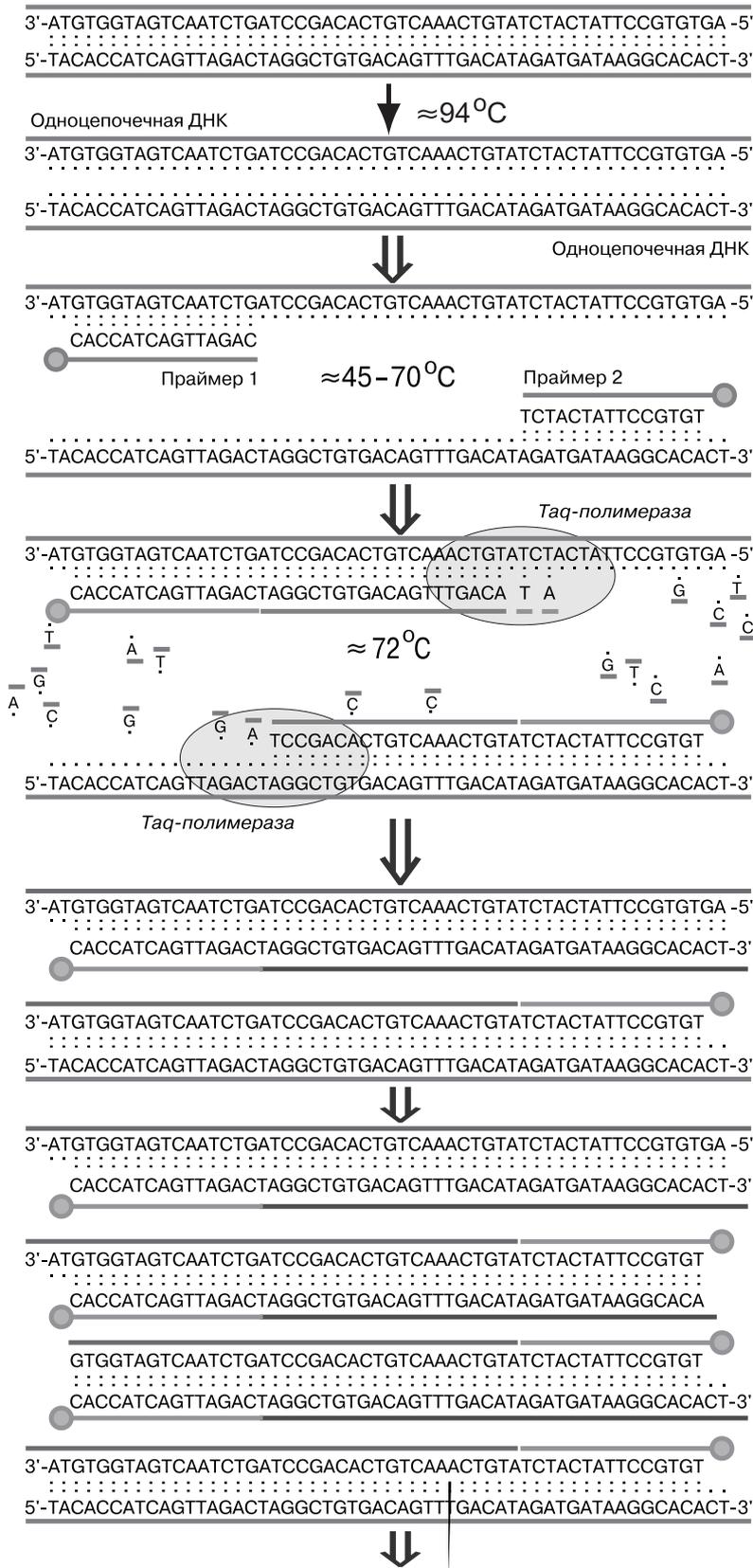
Усовершенствование технологии ПЦР

Первоначально для осуществления ПЦР использовали обычные ДНК-полимеразы, которые подвергались температурной инактивации в каждом цикле на этапе денатурации ДНК. Полимеразу 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.

Техническое оформление смены температуры реакционной смеси также стремительно развивалось в последнее время. Сначала ПЦР осуществлялась при помощи трех водяных бань, настроенных на разную температуру: для денатурации ДНК, отжига праймеров и полимеризации. Пробирки переносились из одной водяной бани в другую “по кругу”, благодаря чему происходила смена температуры на разных этапах цикла. Существовали и варианты приборов, где в водяную баню, в которой находились пробирки с реакционной смесью, поочередно подавался вода разной температуры. Смена циклов в этих случаях занимала много времени, и процесс плохо поддавался автоматизации.

Для осуществления ПЦР в основном используются приборы (*термоциклеры*), которые изменяют температуру автоматически на основе заданной программы. В термоциклерах пробирки с реакционной



I. Плавление двухцепочечной ДНК: перед началом реакции ДНК-мишень является двухцепочечной; при температуре $94-95^{\circ}\text{C}$ комплементарные цепи ДНК расходятся

II. Отжиг праймеров: при температуре, оптимальной для выбранных праймеров, происходит их связывание с комплементарным участком ДНК-мишени

III. Синтез новых цепей ДНК: ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды к праймерам, синтезируя новые цепи ДНК, которые становятся мишенью для праймеров в последующих циклах ПЦР

Количество копий ДНК-мишени растет экспоненциально в последовательных циклах ПЦР

1-й цикл

2-й цикл

N цикл

$X \cdot (2^N - 2N)$ копий

*X – количество копий ДНК-мишени перед началом реакции

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

смесью помещаются в металлический блок, температура которого изменяется с помощью элемента Пельтье. Элемент Пельтье позволяет изменять температуру блока с большой скоростью, что сокращает продолжительность каждого цикла ПЦР.

Современные термоциклеры приспособлены для использования специальных тонкостенных пластиковых пробирок для реакционной смеси, что позволяет ускорить теплообмен между блоком прибора и реакционной смесью и в конечном итоге дополнительно сократить время проведения реакции.

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 [18, 31].

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 [31]. В некоторых случаях применение специальных флуоресцентных “маркеров” позволяет контролировать проведение амплификации или детектирование конечных продуктов ПЦР непосредственно в реакционной пробирке [4, 8, 31].

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.

Возможности и ограничения традиционных методов культивирования

Традиционный для микробиологических лабораторий культуральный метод диагностики, как правило, хорошо оправдывает себя для выявления и исследования таких свойств, как чувствительность к антибиотикам, вирулентность легкокультивируемых микроорганизмов. Однако некоторые микроорганизмы (пневмококки, гемофилы, нейссерии, микоплазмы, облигатные анаэробы и др.) могут быть чрезвычайно чувствительными к условиям забора клинического материала, транспортировки и культивирования, наличию специальных факторов роста или способны к размножению *in vitro* только в культуре клеток (вирусы, хламидии, риккетсии).

Медленный рост на искусственных средах таких микроорганизмов, как микобактерии и грибы, является еще одним естественным ограничением, связанным с использованием культурального метода для диагностики этих микроорганизмов. Кроме того, работа с живыми культурами выделенных возбудителей, причем не только особо опасных, но иногда и условно-патогенных, может представлять угрозу для здоровья персонала лаборатории.

Среди возбудителей болезней человека известны также и некультивируемые виды бактерий, например *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, и многие виды вирусов, включая вирусы папилломы человека и гепатита С, попытки выращивания которых в клеточной культуре пока остаются безуспешными. Наконец, даже при успешном культивировании существует необходимость последующей идентификации выделенных микроорганизмов.

Традиционные микробиологические методы идентификации основаны на использовании различных фенотипических тестов, таких, как выявление специфической ферментативной активности, способности метаболизировать сахара или поддерживать рост на средах с селективными добавками. Сложность стандартизации условий подобных тестов, а также естественная фенотипическая вариабельность, присущая многим микроорганизмам, могут быть причиной неправильной идентификации.

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

Таблица 1. Наиболее распространенные методы генетического типирования микроорганизмов с использованием ПЦР

Метод	Основной принцип	Область применения	Точность, воспроизводимость	Трудоемкость	Стоимость
RAPD (AP-PCR) [22]	Амплификация произвольных участков генома в условиях нестрогого связывания праймеров	Локальные эпидемиологические исследования любых штаммов микроорганизмов, выделяемых на искусственных питательных средах	+	+	+
Rep-PCR (ERIC-PCR) [24]	Амплификация участков генома, ограниченных консервативными повторяющимися последовательностями ДНК	Типирование многих грамотрицательных и грамположительных бактерий	++	+	+
ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP) [28]	Амплификация специфических участков ДНК и их расщепление с помощью рестриктаз	Возможно типирование возбудителей, находящихся непосредственно в клинических образцах или в культуре клеток	++	++	++
AFLP [26]	Расщепление геномной ДНК рестриктазами, лигирование (сшивание) фрагментов с ДНК-адаптерами и амплификация с помощью комплементарных им праймеров	Широкомасштабные эпидемиологические исследования любых штаммов микроорганизмов, выделяемых на искусственных питательных средах	+++	+++	+++

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 *специфической последовательности* ДНК, характерной для строго определенного вида микроорганизма. Например, ПЦР-амплификация специфического участка гена, кодирующего главный белок наружной мембраны (МОМР) *Chlamydia trachomatis*, в сочетании с нерадиоактивной гибридизацией для детектирования продуктов реакции позволяет обнаружить единичные копии хламидийной ДНК в исследуемых образцах [3]. При этом ПЦР значительно превосходит по диагностической эффективности культивирование и методы прямого обнаружения хламидийного антигена (микроиммунофлюоресценцию и иммуноферментный анализ), традиционно используемые для выявления *C. 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 (*C. 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 [8, 9, 32, 33]. Полученные в результате ПЦР фрагменты рибосомных генов могут быть затем

Таблица 2. Примеры использования ПЦР для выявления резистентности к антимикробным препаратам у различных видов микроорганизмов

Микроорганизм	Антимикробные препараты	Генетические механизмы резистентности	Методы обнаружения
Стафилококки (обычно <i>S. aureus</i> и <i>S. epidermidis</i>)	Метициллин, (оксациллин) и другие β -лактамы	Наличие гена <i>mecA</i> , кодирующего дополнительный пенициллинсвязывающий белок (ПСБ-2а)	ПЦР-электрофорез [30], ПЦР-гибридизация [14]
Энтеробактерии (обычно <i>E. coli</i> и <i>K. pneumoniae</i>)	ЦС III*, другие β -лактамы, кроме карбапенемов	Мутации в генах β -лактамаз TEM-, SHV- и OXA-типа, расширяющие спектр активности этих ферментов	ПЦР-ПДРФ [19], ПЦР-SSCP [7]
	Изониазид	Мутации в гене каталазы – пероксидазы (<i>katG</i>), реже в генах <i>inhA</i> и <i>ahpC</i>	ПЦР-ПДРФ [17], ПЦР-SSCP [29], ПЦР-секвенирование [16], другие методы
	Рифампицин	Мутации в гене β субъединицы РНК-полимеразы (<i>rpoB</i>)	
	Этамбутол	Мутации в гене <i>embB</i> , кодирующем синтез арабиногалактана	
	Стрептомицин	Мутации в генах 16S рРНК (<i>rrs</i>) и рибосомного белка S12 (<i>rpsL</i>)	
<i>M. tuberculosis</i>	Пиразинамид	Мутации в гене пиразинамидазы (<i>pncA</i>)	
	Фторхинолоны	Мутации в гене А субъединицы ДНК-гиразы (<i>gyrA</i>)	
Вирус простого герпеса (ВПГ)	Ацикловир	Мутации в гене тимидинкиназы (<i>tk</i>), реже в гене ДНК-полимеразы	ПЦР-секвенирование [25]
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	Ингибиторы обратной транскриптазы	Мутации в гене полимеразы (<i>pol</i>)	ОТ-ПЦР**-секвенирование [23]

* ЦС III – цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон и т. д.).

** ОТ-ПЦР – обратнотранскриптазная ПЦР – метод обнаружения специфической РНК путем создания ее ДНК-копии и последующей амплификацией с помощью ПЦР.

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, 8, 33].

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* [12], или на определении электрофоретической подвижности ДНК в одноцепочечной форме (метод SSCP – *одноцепочечный конформационный полиморфизм*) [32].

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.

Методы молекулярного типирования микроорганизмов на основе ПЦР

ПЦР широко используется не только для диагностики и идентификации, но также и для субвидового типирования и анализа генетического родства (клональности) выделенных штаммов микроорганизмов, особенно при проведении эпидемиологических исследований. По сравнению с традиционными фенотипическими методами (био-, фаго- и серотипированием) генотипирование на основе

ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем дифференциации, возможностью использования количественных методов для оценки идентичности штаммов и высокой воспроизводимостью. Описано много методов генотипирования, которые можно рассматривать как производные технологии ПЦР (табл. 1). На практике выбор определенного метода типирования зависит от характера и целей проводимого эпидемиологического исследования с учетом видовой принадлежности штаммов, их количества, источника выделения, требуемого уровня дифференциации, необходимости сравнения результатов с данными, полученными из других источников, а также от возможностей конкретной лаборатории.

Несмотря на разнообразие методов ПЦР-типирования, общим для большинства из них является использование гель-электрофореза для разделения фрагментов ДНК разной длины, полученных от каждого отдельного штамма. При этом сравнительный анализ индивидуальных электрофоретических профилей, проводимый визуально или с помощью компьютера, позволяет оценить степень генетического родства исследуемых штаммов.

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 (см. примеры в табл. 2).

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 [27].

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.

Например, резистентность грамотрицательных бактерий к аминогликозидным антибиотикам может быть вызвана продукцией различных аминогликозидмодифицирующих ферментов или изменением проницаемости клеточной стенки. В этом случае результаты ПЦР-анализа, который всегда характеризует строго определенный специфический участок ДНК, не могут служить основанием для оценки чувствительности микроорганизма в целом.

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), являются 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.

Таким образом, весь процесс ПЦР-анализа – от момента поступления образца в лабораторию до по-

лучения конечного результата – занимает обычно не более одного рабочего дня. 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 [30].

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, 18, 20]. Даже единичные молекулы загрязняющей ДНК могут быть многократно копированы в процессе ПЦР, приводя к образованию целевого ДНК-продукта, а следовательно, к **ложноположительному результату**.

Существуют разные источники ПЦР-загрязнения. Наиболее частым является контаминирование реакционной смеси ДНК-продуктами предыдущих реакций. В результате ПЦР в каждой реакционной пробирке может образовываться более миллиарда копий исходной последовательности ДНК, каждая из которых, в свою очередь, является потенциальной мишенью для последующей амплификации. В процессе анализа синтезированные фрагменты ДНК могут легко распространяться в лаборатории в виде аэрозоля (при открывании реакционных пробирок), через руки исследователей и лабораторные принадлежности, загрязняя реактивы и материалы, используемые в ПЦР, и приводя к ложноположительному результату анализа образцов, в которых исходно отсутствовала ДНК искомого возбудителя.

В случае высокой концентрации микробной ДНК в исследуемом клиническом материале ПЦР-загрязнение может происходить при переносе даже небольшого количества ДНК из одного образца в другой, например через поверхность перчаток при открывании пробирок с образцами или через приспособления, используемые для механической гомогенизации тканей.

При использовании ПЦР с универсальными праймерами (см. выше) источником загрязняющей ДНК могут служить коммерческие препараты ДНК-полимераз и других реактивов, применяемых в ПЦР.

В связи с опасностью получения ложноположи-

тельных 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-помещения”, где осуществляются обработка образцов и приготовление реакционных смесей, и “после-ПЦР-помещения”, 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 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 [18]. 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 устране-

ния 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 расходных 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 микробиологических приложений 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.

Кроме того, возможность использования ПЦР для решения многих практических задач в области микробиологической диагностики зависит от ответов на следующие принципиальные вопросы.

1. Как быстро микробная ДНК элиминируется из различных тканей после гибели возбудителя в результате проводимого лечения и в каких случаях ПЦР может быть использована для контроля эффективности антимикробной терапии?
2. Можно ли при помощи ПЦР дифференцировать состояния колонизации, латентной или активной инфекции и реинфекции?
3. Может ли обнаружение микробной ДНК в “стерильных” в норме биологических жидкостях (кровь, спинномозговая жидкость) служить показателем патологического процесса?

Несомненно, накопление опыта использования ПЦР и сравнение результатов ПЦР-анализа с дан-

ными других диагностических методов позволит найти ответы на эти вопросы.

Л и т е р а т у р а

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.
13. Mickelsen P.A. The Use of Molecular Strain Typing Has Become a Standard of Practice. Clin Microbiol Newsletter 1997;19:137 - 42.
14. Mulder J.G. Comparison of Disk Diffusion, the Etest, and Detection of *mecA* for Determination of Methicillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:567 - 73.
15. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. Methods Enzymol 1987;155:335 - 50.
16. Musser J.M., Kapur V., Williams D.L., Kreiswirth B.N., Van Sulingen D., Embden J.D. Characterisation of the Catalase-Peroxidase Gene (*katG*) and *inhA* Locus in Isoniazid-Resistant and -Susceptible Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA Sequencing: Restricted Array of Mutations Associated with Drug Resistance. J Infect Dis 1996;173:196 - 202.
17. Nachamkin I., Kang C., Weinstein M.P. Detection of Resistance to Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Molecular Methods. Clin Infect Dis 1997;24: 894 - 900.
18. Newton C.R., Graham A. PCR. Oxford: Bios Scientific Publishers; 1996. p.18 - 9.
19. Nuesch-Inderbinen M.T., Hacher H., Kayser F.H. Detection of Genes Coding for Extended-Spectrum SHV β -Lactamases in Clinical Isolates by a Molecular Genetic Method, and Comparison with the E-test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:398 - 402.
20. Persing D.H., Cimino G.D. Amplification Product Inactivation Methods. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington: ASM Press; 1993. p.105 - 21.
21. Pfaller M.A., Herwaldt L.A. The Clinical Microbiology Laboratory and Infection Control: Emerging Pathogens, Antimicrobial Resistance, and New Technology. Clin Infect Dis 1997;25:858 - 70.
22. Ralph D., McClelland M. Arbitrary Primed PCR Methods for Studying Bacterial Diseases. Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications. Totowa: Humana Press; 1998. p. 83 - 102.
23. Richman D.D. Antiretroviral Drug Resistance: Mechanisms, Pathogenesis, Clinical Significance. Adv Exp Med Biol 1996;394:383 - 95.
24. Ridley A.M. Genomic Fingerprinting by Application of rep-PCR. Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications. Totowa: Humana Press; 1998. p.103 - 17.
25. Sasadeusz J.J., Tufaro F., Safrin S., Schubert K., Hubinette M.M., Cheung P.K., Sachs S.L. Homopolymer Mutational Hot Spots Mediate Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir. J Virol 1997;71:3872 - 7.
26. Savelkoul P.H., Aarts H.J., De Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., et al. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. J Clin Microbiol 1999;37:3083 - 91.
27. Scarpellini P., Braglia S., Brambilla A.M., Dalessandro M., Cichero P., Gori A., Lazzarin A. Detection of Rifampin Resistance by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Cerebrospinal Fluid of Patients

- with Tuberculosis of the Central Nervous System. J Clin Microbiol 1997;35:2802 - 6.
28. Swaminathan B., Matar G.M. Molecular Typing Methods. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington: ASM Press; 1993. p. 26 - 50.
29. Temesgen, Z., Satoh K., Uhl J.R., Kline B.C., Cockerill III F.R. Use of Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) Analysis to Detect a Point Mutation in the Catalase-Peroxidase Gene (*katG*) of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes 1997;11:59 - 63.
30. Vannuffel P., Laterre P.F., Bouyer M., Gigi J., Vandercam B., Reynaert M., Gala J.L. Rapid and Specific Molecular Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Endotracheal Aspirates from Mechanically Ventilated Patients. J Clin Microbiol 1998;36:2366 - 8.
31. White T.J. Amplification Product Detection Methods. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington: ASM Press; 1993. p. 138 - 48.
32. Widjoatmojo M.N., Fluit A.C., Verhoef J. Rapid Identification of Bacteria by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism. J Clin Microbiol 1994;32:3002 - 7.
33. Wilson K.H. Detection of Culture-Resistant Bacterial Pathogens by Amplification and Sequencing of Ribosomal DNA. Clin Infect Dis 1994;18:958 - 62.