

УДК 616-074:577.113

Долгий путь в клинические лаборатории тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот

Проблемы подготовки образцов, риск контаминации и консервативные взгляды тормозят, но уже не могут остановить начавшееся внедрение в практику аналитических диагностических методов

У. Чек

Независимый медицинский и научный писатель, Вильмет, Иллинойс, США

Переведена и печатается с согласия автора и редакции «ASM News» 2001; 67:560-5.

Nucleic Acid-Based Tests Move Slowly into Clinical Labs

Sample preparation problems, contamination, and entrenched attitudes slow but cannot stop adoption of analytically diagnostic methods

W. Check

Freelance medical and science writer, Willmette, Illinois, USA

Translated and reprinted with permission from «ASM News» 2001; 67:560-5.

Диагностические методы, основанные на гибридизации и амплификации нуклеиновых кислот, постепенно внедряются в практику клинических микробиологических лабораторий. Совсем недавно стало казаться, что даже секвенирование ДНК патогенных микроорганизмов также со временем найдет свое клиническое применение.

Тем не менее до настоящего времени молекулярные методы диагностики не заняли на практике своих обещанных позиций, в частности потому, что они весьма трудоемки и дорогостоящи, а для интерпретации результатов исследований требуются опытные высококвалифицированные специалисты, число которых, как правило, ограничено, а их услуги требуют больших экономических затрат.

Однако в связи с тем, что новые молекулярные методы исследования нередко позволяют обнаружить возбудителей, для которых диагностические тесты либо малоинформативны, либо отсутствуют вообще, они прочно вошли в практику некоторых

наиболее крупных научно-исследовательских клинических лабораторий. Накопление в этих лабораториях современных научных знаний, в свою очередь, облегчает процесс внедрения в практику новых молекулярно-биологических методов в целях диагностики.

Трудности, с которыми до сих пор сталкиваются молекулярные методы диагностики патогенных микроорганизмов

«С внедрением в практику диагностического набора для определения уровня вирусной нагрузки у инфицированных ВИЧ пациентов молекулярно-биологические тесты стали в определенной степени рутинными методами», – говорит Тим Алькорн, директор отдела инфекционных болезней (LabCorp центр молекулярной биологии и патологии, Исследовательский треугольный парк, Северная Каролина, США). Появление тестов, обеспечивающих возможность количественного определения вируса у

инфицированных ВИЧ пациентов, повлекло за собой разработку амплификационных методов для выявления *вируса гепатита С* (HCV).

Используемые в настоящее время культуральные методы исследования не позволяют быстро выделить из клинического материала, взятого у пациента, ни один из этих вирусов. Т. Алькорн рассматривает молекулярные методы определения *цитомегаловируса* (CMV), *вируса простого герпеса* (HSV) и *вируса гепатита В* (HBV) в качестве следующего этапа на пути широкого внедрения в практику клинических лабораторий молекулярно-биологических аналитических тестов.

Молекулярные тесты определения CMV и HSV являются примером перехода от традиционных к новым методам исследования. «В связи с тем, что все большее число производителей расширяет списки выпускаемых ими наборов для проведения молекулярно-биологических тестов, эти методы широко распространяются на всех уровнях – от крупных референтных до небольших клинических лабораторий», – говорит Т. Алькорн.

Однако в настоящее время еще существуют определенные трудности, которые необходимо преодолеть, прежде чем методы, основанные на определении нуклеиновых кислот, достигнут обещанных их сторонниками целей. «Я остаюсь полным оптимизма относительно диагностических возможностей молекулярно-биологических методов исследования», – говорит Дэвид Релман, доцент микробиологии, иммунологии и медицины (Медицинский факультет Стэнфордского университета, Стэнфорд, Калифорния, США). «В то же время я буду первым, кто согласится с тем, что обещанные преимущества еще в значительной степени несовершенны и до конца не реализованы на практике. Я считаю, что частично эта проблема состоит в том, что в некоторых случаях новая технология в чистом виде опередила развитие отдельных периферических методов, которые являются необходимым условием распространения этих тестов в практике клинических лабораторий».

Более того, необходимо понимать различия между чувствительностью и специфичностью метода с позиций анализа и этими же понятиями с клинической точки зрения. «Очень часто превосходные результаты, о которых можно услышать на различных конференциях, касаются в большей степени аналитических возможностей метода, чем его клинической значимости», – обращает внимание Д. Релман. «На самом деле для нас необходимо и то, и другое».

Патрик Мюррэй, директор отдела клинической микробиологии (Университет медицинской систе-

мы штата Мэриленд, Балтимор, Мэриленд, США) сравнивает настоящее положение диагностических методов, основанных на определении нуклеиновых кислот, с первой волной тестов для *иммуноферментного анализа* (ИФА), ставших доступными для широкого применения около 15–20 лет назад. В самом начале проведение иммунологических аналитических тестов было очень трудоемким и занимало около 4–5 ч. «Я думаю, что многие лаборатории ... испытывали трудности, пытаясь доказать целесообразность проведения многих из этих иммунологических тестов или необходимость замены ими на рынке медицинских товаров существовавших в то время традиционных методов исследования», – вспоминает П. Мюррэй. В настоящее время используется множество быстрых и надежных иммунологических методов диагностики в клинических лабораториях и даже в кабинетах частнопрактикующих врачей.

Так же, как ИФА несколько лет назад, методы молекулярной диагностики, основанные на определении нуклеиновых кислот, в настоящее время представляют собой первое поколение новой технологии, встречающей на своем пути множество проблем. «Нельзя говорить о том, что они не найдут своего широкого применения в будущем», – говорит П. Мюррэй, – «я в этом убежден». Однако на данном этапе требуется совершенствование этих методов.

Особенности работы с клиническими образцами и другие важные проблемы должны быть решены, прежде чем новые методы найдут свое широкое применение

П. Мюррэй подчеркивает, что значительно более важным, чем выделение необходимых нуклеиновых кислот, их амплификация и использование сложных методик, позволяющих провести их идентификацию, является доаналитический этап исследования, на котором осуществляется подготовка клинического материала, позволяющая использовать его для дальнейшего тестирования. Ингибиторы, присутствующие в клинических образцах, могут препятствовать проведению решающих аналитических реакций. Более того, в ходе исследования могут возникать трудности при попытке создания более высоких концентраций микроорганизмов, присутствующих в клиническом материале в небольшом количестве. Другой серьезной проблемой до сих пор остается возможность перекрестной контаминации компонентов реакции.

Любая, даже усовершенствованная молекулярная технология будет иметь ограниченные возможности, обусловленные сущностью самого ме-

тогда. Так, Эллен Джо Барон, директор лаборатории клинической микробиологии и вирусологии, доцент патологии (Медицинский центр Стэнфордского университета, Стэнфорд, Калифорния, США) говорит о том, что «молекулярные технологии не создаются с целью ответить на любой вопрос, касающийся этиологии инфекционных болезней». Один из примеров этому – пневмония: в дыхательных путях здорового человека присутствует большое количество различных инфекционных агентов. При проведении высокочувствительного амплификационного анализа может создаться ситуация, при которой система окажется перегруженной микроорганизмами, не играющими роли в этиологии и патогенезе болезни. «Неправильным было бы считать, что в будущем с помощью амплификационных методов исследования будет возможно все», – говорит она.

Определение последовательности нуклеиновых кислот (*секвенирование*), самый многообещающий метод идентификации патогенных микроорганизмов в условиях клиники, только сейчас вышел за пределы научно-исследовательских лабораторий. Стив Дэй, управляющий по медицинским вопросам компании «Визибл Джинетикс» (Visible Genetics, Атланта, Джорджия, США) говорит о том, что в настоящее время начинает разрабатываться оборудование, специально предназначенное для использования в клинических лабораториях с целью диагностики, а соответствующие тесты для них совершенствуются таким образом, чтобы обеспечить более высокую надежность.

Тем не менее до сих пор существует острая необходимость проведения стандартизации как самих методов, так и образцов контрольных последовательностей ДНК, а также методик интерпретации результатов исследования. Однако он добавляет, что «методы, основанные на секвенировании нуклеиновых кислот и принципах, используемых в фармакогеномике, явились революционными в области диагностики инфекционных болезней и лечения заболеваний в целом и останутся таковыми и в будущем».

Помимо коммерческих наборов, созданных для применения молекулярных технологий с целью диагностики, некоторые клинические микробиологи разрабатывают собственные амплификационные аналитические тесты для определения менее распространенных, но клинически значимых возбудителей, таких, как вирус Эпштейна–Барра, энтеровирусы, эрлихии, риккетсии и токсоплазмы. Наличие такого потенциала является одним из преимуществ тех лабораторий, которые возглавляются хорошо подготовленным и опытным микробиологом.

Подход одной из лабораторий к внедрению методов диагностики, основанных на определении нуклеиновых кислот

Стандартным набором молекулярных методов исследования может быть набор тестов, введенный в практику несколько лет назад Лиззи Харрел, помощником директора клинической микробиологической лаборатории, доцентом микробиологии и патологии (Медицинский центр Дьюкского университета, Роли, Северная Каролина, США). «Нашим основным молекулярным методом диагностики уже сейчас является определение вирусной нагрузки у пациентов с ВИЧ-инфекцией», – говорит Л. Харрел. Лаборатория предлагает как стандартный метод, обычно необходимый клиницистам для определения исходного показателя вирусной нагрузки до назначения терапии, так и высокочувствительный тест, требуемый, как правило, после завершения лечения, когда предполагается снижение уровня вирусной нагрузки.

Для определения ДНК цитомегаловируса Л. Харрел предложила использовать неамплификационный анализ, основанный на гибридизации ДНК (*Digene's hybrid capture DNA*), который выполняется непосредственно на образцах, взятых от пациентов. В связи с тем, что Л. Харрел использует тесты, одобренные *Администрацией по контролю за лекарствами и пищевыми продуктами США (FDA)*, в ее лаборатории проводится только качественный, а не количественный анализ. «Некоторые лаборатории используют количественные методы исследования, однако это увеличивает экономические затраты», – говорит она. Исследование на CMV-инфекцию проводится главным образом у пациентов с клиническими симптомами, развившимися после трансплантации органов, и помогает клиницисту исключить реакцию отторжения трансплантата в качестве возможной причины патологического состояния у конкретного пациента.

В своей лаборатории Л. Харрел заменила тесты выявления антигенемии на молекулярный метод, основанный на определении нуклеиновых кислот. Количественные методы определения CMV позволяют установить степень риска развития инфекции. В связи с тем, что эти тесты уже одобрены для применения, в будущем они быстро заменят тесты определения антигенемии и будут использоваться для выявления ранних симптомов инфекции, что, в свою очередь, позволит назначать наиболее предпочтительную терапию.

Л. Харрел также предлагает использовать *электрофорез в пульсирующем электрическом поле (PFGE)* для молекулярно-эпидемиологических ис-

следований, проводимых службами инфекционного контроля, которые могли бы использовать его для эпидемиологического анализа вспышек нозокомиальных инфекций. Использование PFGE позволяет детектировать специфические участки целой хромосомы микроорганизма после рестрикции ее редкощепящими рестрикционными эндонуклеазами. Профиль идентичности достаточно легко определяется и указывает на общий источник вспышки инфекционного заболевания.

Также Л. Харрел обращает внимание как на количественные, так и на качественные методы диагностики и мониторинга пациентов с HCV-инфекцией. В конечном итоге это позволит определить возможность использования амплификационных тестов в условиях собственной лаборатории. Амплификационные методы исследования позволяют подтвердить наличие HCV-инфекции у пациентов с повышенным уровнем активности печеночных аминотрансфераз, а также у пациентов с обнаруживаемыми при проведении ИФА антителами к HCV. Клиницисты, занимающиеся лечением ВИЧ-инфицированных, а также пациентов после трансплантации печени, будут основными пользователями этих тестов.

В лаборатории Л. Харрел также используется набор для неамплификационного анализа – GenProbe, необходимый для идентификации различных микобактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* и *Mycobacterium gordonae*. В США наиболее распространенными среди лиц с ВИЧ-инфекцией и клинически значимыми являются *M. avium*, представляющие собой относительно «инертные» микроорганизмы. Их идентификация с использованием традиционных биохимических тестов может занимать несколько недель или даже месяцев, в то время как молекулярные методы позволяют провести ее в течение нескольких часов с момента появления роста колоний. Л. Харрел рассматривает также возможность использования амплификационного метода для выявления *M. tuberculosis* непосредственно в клиническом материале, взятом у пациента.

Одним из первых, оправдавших себя диагностических приложений технологии, основанной на определении нуклеиновых кислот, стало использование ее для обнаружения *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* в клинических образцах. Амплификационные методы быстро доказали более высокую чувствительность по сравнению с культуральными методами, и в настоящее время рассматриваются в качестве стандарта для идентификации указанных возбудителей болезней, передающихся половым путем. В Дьюке, говорит Л. Харрел, этот

тест проводится уже в двух клинических лабораториях. «Мы твердо убеждены в том, что этот метод исследования должен использоваться в микробиологических лабораториях», – сообщает Л. Харрел. «Диагностические тесты должны группироваться по областям их применения, а не по используемым методам».

Исключением может быть использование амплификационного метода для определения вируса папилломы человека в мазках отделяемого шейки матки, который был включен многими учреждениями в программу скринингового обследования с целью идентификации сомнительных мазков, исследованных с помощью световой микроскопии. В Дьюке этот тест проводится в патологоанатомической лаборатории с целью установления корреляции с результатами гистологического исследования.

Тесты, основанные на определении нуклеиновых кислот, иногда вводят в заблуждение

Несмотря на то что амплификационные методы повышают качество диагностики инфекционных болезней, в определенных случаях они становятся причиной ряда проблем. До переезда в Мэриленд П. Мюррэй работал в Вашингтонском университете (Сент-Луис, Миссури, США), где однажды произошел следующий случай. При использовании лигазной цепной реакции для определения *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* были получены результаты, находившиеся непосредственно на уровне пороговой чувствительности метода в так называемой «серой зоне». Данную ситуацию П. Мюррэй назвал «очень тревожной», поскольку в конечном итоге она привела к ложноположительным результатам.

В ходе дальнейшего наблюдения было выявлено, что данная проблема возникала постоянно на протяжении всего исследования. Были также получены ложноотрицательные результаты, связанные, в частности, с исследованием образцов мочи, которая, как известно, является ингибитором лигазной цепной реакции. П. Мюррэй объясняет эти неудачи техническими проблемами, существовавшими при проведении исследования. После повторного анализа каждого полученного положительного результата исследователи решили использовать диагностические наборы, выпускаемые фирмой «Becton Dickinson», в связи с тем, что в них применялся внутренний амплификационный контроль, позволяющий определить присутствие в образце ингибиторов реакции.

Однако при работе с данными диагностикумами обнаружилась другая проблема – возможность контаминации амплификационным контролем. Поставщик оборудования оказал большую по-

мощь, но в конечном итоге исследователям все равно пришлось заменить оборудование и тестировать в другом помещении. «Мы не могли деконтаминировать лабораторию», – говорит П. Мюррэй. «С такими же проблемами столкнулись и в других лабораториях, использовавших оба вышеуказанных метода». Тем не менее П. Мюррей остается оптимистичным по поводу того, что диагностические системы будут усовершенствованы, считая при этом, что подобные проблемы не устраивают многих пользователей.

Кроме выявления генетических маркеров резистентности к антибиотикам у *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*, другие методы, основанные на определении нуклеиновых кислот и предназначенные для выявления таких маркеров резистентности, как ген *mecA* у метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* и *van* гены у ванкомицинорезистентных энтерококков, в определенных ситуациях обладают огромным преимуществом перед традиционными методами исследования. «Амплификация генов резистентности представляет собой самый чувствительный метод ее выявления у этих микроорганизмов», – говорит П. Мюррэй.

Действительно, определение резистентности к оксациллину и ванкомицину у этих возбудителей стандартными методами – дисков и пограничных концентраций – часто оказывается затруднительным, что связано с их гетерорезистентными свойствами, заключающимися в том, что не у всех бактерий, несущих ген резистентности, будет наблюдаться его экспрессия.

Э. Барон подчеркивает, что амплификационные методы могут вводить в заблуждение в том случае, когда они используются, например, для диагностики пневмонии. «Многие думают, что пневмония является болезнью, при которой молекулярная технология может заполнить серьезный пробел в тех случаях, когда не удается установить этиологический диагноз», – констатирует Джон Бартлетт, заведующий кафедрой инфекционных болезней (Университет Джона Хопкинса, Балтимор, Мэриленд, США). Однако использование амплификационных методов следует ограничить только определением микроорганизмов, не являющихся представителями нормальной микрофлоры дыхательных путей, таких, как легионеллы, *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*. Наиболее распространенные возбудители пневмонии – пневмококк и *Haemophilus influenzae* – будут присутствовать в качестве контаминантов слишком часто, чтобы считать результаты амплификационных методов их исследования достоверными для постановки диагноза.

Традиционные клинические лабораторные тесты плачут под звон фанфар в честь новых методов

Несмотря на ажиотаж вокруг применения молекулярных тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот, в условиях клинической лаборатории традиционные методы микробиологического исследования остаются неотъемлемой частью программы качественного ведения пациентов, – утверждает Дж. Бартлетт. «Традиционным микробиологическим методам в последние годы был нанесен огромный удар», – говорит он. «Качество микробиологических исследований ухудшается, однако это связано не со снижением квалификации микробиологов, а со страховою медициной, переводом микробиологии на коммерческие проекты, а также с внедрением положений программы CLIA (Мероприятия по усовершенствованию клинических лабораторных исследований), отдаляющих клиническую микробиологию от практических врачей. Уровень клинической микробиологии в госпиталях США в настоящее время не настолько высок, как это было 20–30 лет назад».

Дж. Бартлетт считает «до известной степени парадоксальной» ситуацию, при которой наряду с большим энтузиазмом, проявляемым к развитию высокотехнологичных методов исследования, забываются ценные простые методики. Традиционные методы следует сохранить в клинической практике, однако их необходимо усовершенствовать. «Я полагаю, что достаточно странно выглядит ситуация, когда вы приходите в лабораторию и видите микробиолога, работающего так же, как Луи Пастер работал 100 лет назад», – говорит Дж. Бартлетт. Другая ситуация наблюдается в химических лабораториях, которые были радикально модернизированы в последние 10 лет. «Я могу понять энтузиазм, проявляемый к высокотехнологичным методам исследования», – говорит Дж. Бартлетт, – «но я считаю, что нам нужны как высокотехнологичные, так и наиболее совершенные простые тесты».

Традиционные методы, «особенно культуральное исследование, представляют большую ценность», – соглашается Дэвид Рэлман, доцент микробиологии, иммунологии и медицины (Медицинский факультет Стэнфордского университета, Стэнфорд, Калифорния, США). «Очень важно иметь жизнеспособные культуры микроорганизмов в морозильной камере или в пробирке». Тщательное изучение микроорганизмов может пролить свет на природу заболеваний и эпидемиологические характеристики вновь возникающих инфекций. Более того, некоторые методы диагностики, основан-

ные на определении нуклеиновых кислот, на начальных этапах требуют использования живых неповрежденных культур микроорганизмов. Например, методы идентификации, основанные на анализе всего генома с помощью микрогибридизационных матриц, прежде всего зависят от того, сможет ли кто-нибудь типировать штаммы возбудителя и установить их возможное родство.

По поводу сниженного финансирования традиционной микробиологии и дефицита высококвалифицированных лаборантов Д. Рэлман говорит следующее: «Мне хочется верить, что это – временный феномен и что когда-нибудь люди осознают нанесенный ими ущерб. Возможно, для этого потребуются громкие протесты некоторых специалистов, работающих в данной области медицины».

Подготовка образцов и другие технические проблемы также требуют внимания

Прежде чем амплификационные методы станут рутинными в практике клинических лабораторий, необходимо будет преодолеть ряд серьезных препятствий. Важный момент – подготовка клинических образцов, позволяющая выделить необходимую нуклеиновую кислоту и избежать при этом действия ингибиторов, а также обеспечивающая высокую концентрацию нуклеиновой кислоты в образцах без накопления ингибиторов реакции. Выбор клинического материала для исследования также требует внимания. «Мы думаем, что знаем, где найти микроорганизмы», – говорит Д. Рэлман. «Но я не уверен в том, что мы четко представляем себе, какие виды образцов могут оказаться диагностически полезными, а какие – неподходящими для исследования».

Э. Барон подчеркивает, что до сих пор нет удобных автоматизированных методов выделения нуклеиновых кислот, позволяющих получить образцы для амплификационного анализа. В ее лаборатории в настоящее время проходят испытание два коммерческих набора. «Они не настолько чувствительны, как мануальные методы, однако мануальные методы имеют недостатки с точки зрения эргономики», – говорит она, имея в виду многократное пипетирование, которое иногда становится проблемой для лаборантов.

Д. Рэлман также говорит об обширной проблеме, связанной с фоновой сигнальной контаминацией, которую, по его мнению, более точно следует называть эндогенным микробным молекулярным фоном организма человека. «Имея в распоряжении молекулярные методы, мы в еще меньшей степени, чем при использовании стандартных методов культивирования микроорганизмов, представляем себе,

что нам следует искать у здоровых людей», – говорит он. «Разнообразие последовательностей нуклеиновых кислот намного шире, чем культуральные различия микроорганизмов». Понимание особенностей эндогенной микробной «молекулярной флоры» является решающим при условии, что клинические микробиологи будут правильно интерпретировать результаты молекулярных методов исследования клинических образцов, полученных от различных пациентов.

Недостаток квалифицированного персонала еще больше усложняет процесс внедрения молекулярных технологий в практику

Даже в настоящее время существует дефицит специалистов, соответствующим образом подготовленных в области молекулярных технологий. Э. Барон приводит данные о том, что ежегодная потребность в специалистах лаборатории в последующие 10 лет будет составлять 9300 человек, однако получить профессию смогут всего около 5000 человек в год. Со временем введение автоматизированных систем уменьшит влияние дефицита специалистов, однако это не решит проблему до конца. Что же можно предпринять в последующие 5–10 лет, пока новая технология постепенно распространится в лабораторную практику? «Нам еще придется некоторое время зависеть от людей, умеющих интерпретировать мазки по Граму, определять чувствительность стандартными методами, анализировать результаты посева на питательные среды и оценивать цитопатический эффект вирусов в культуре клеток», – говорит Э. Барон. «Мы не достигли очень важной цели: не сделали работу в клинических лабораториях привлекательной для людей. Мы мало им платим».

Но это представляет лишь часть большой проблемы. «Система здравоохранения имеет серьезные проблемы, связанные с привлечением людей для работы во вспомогательных областях медицины, и не только в микробиологии, но также и в фармации, и сестринском деле», – говорит Дж. Бартлетт. «В настоящее время сложилось критическое положение с обеспеченностью системы здравоохранения вспомогательным персоналом, и я пока не вижу, чтобы кто-нибудь нашел выход из этой ситуации».

В течение нескольких последующих лет, пока амплификационные методы исследования не станут полностью автоматизированными, внедрение этой технологии будет усугублять дефицит квалифицированного персонала. «Я бы рассматривал это как главную проблему», – говорит Л. Харрел. «Причина заключается в том, что наблюдается раз-

личное отношение к проводимым молекулярным тестам».

В традиционной клинической микробиологии технологи обучены асептической технике манипуляций и правилам работы, позволяющим избежать контаминацию.

Однако, когда дело доходит до работы с ампликонами, которые могут присутствовать в количестве нескольких миллионов и миллиардов копий, обычная проблема контаминации становится на несколько порядков сложнее. Даже при работе с наборами, в которых предусмотрены специальные биохимические меры защиты, позволяющие снизить риск контаминации в процессе проведения реакции, «вы все еще хотите убедиться, что вы очень аккуратны, иначе вы не будете знать, получите ли вы ложноположительные результаты», – говорит Л. Харрел. Особенно важно избежать ложноположительных результатов при исследовании на HCV-инфекцию, которое является основанием для постановки диагноза. В то же время тесты на ВИЧ-инфекцию позволяют всего лишь количественно оценить уровень вирусной нагрузки у инфицированных пациентов.

Наличие отдельных помещений для подготовки и непосредственного проведения амплификации – часть решения проблемы, поскольку подобное размещение является оптимальным для предотвращения контаминации используемых в реакции клинических образцов. Тем не менее решающим фактором является высокая бдительность персонала лаборатории, что, в свою очередь, требует привлечения максимально возможного числа сертифицированных медицинских лаборантов.

В связи с этим многим уже работающим лаборантам, проходившим подготовку еще по программам, не включавшим или незначительно касавшимся изучения молекулярных методов исследования, необходимо пройти по месту работы курсы по овладению амплификационными методиками. Л. Харрел реализует эту идею, проводя индивидуальное обучение в лаборатории, а также используя выездные курсы и подготовку на местах, которые проводят сотрудники фирм-изготовителей диагностических наборов и оборудования.

Применение методов секвенирования нуклеиновых кислот расширяется, несмотря на существующие трудности

Несмотря на то что секвенирование нуклеиновых кислот до сих пор остается еще более сложной задачей по сравнению с амплификационным анализом, оно уже прошло длинный путь от того момента, когда представляло собой сугубо научно-исследовательский метод, при проведении которого ис-

пользовались реагенты, содержащие опасные химические вещества и радионуклиды. В настоящее время этот метод достаточно автоматизирован, а визуализация результатов осуществляется с помощью флюоресцентных красителей, заменивших использовавшиеся ранее радионуклиды.

Тем не менее новые методы, основанные на секвенировании нуклеиновых кислот, все еще используют *электрофорез в полиакриламидном геле* (PAGE), зависят от оборудования, в большей степени созданного для исследовательских целей, занимающего много места, и требуют использования трудоемких методов формирования геля с большим временем полимеризации. Однако секвенирование уже применяется по крайней мере в некоторых наиболее крупных лабораториях, где используется в первую очередь с целью изучения механизмов резистентности у ВИЧ и определения генотипов HCV.

С. Дэй говорит, что компания «Visible Genetics» разработала первую, специально созданную для клинического использования систему для секвенирования ДНК – OpenGene, которая позволяет проводить быструю и удобную отливку геля и содержит справочное программное обеспечение. 27 сентября 2001 г. эта система была одобрена FDA в качестве набора для определения генотипа ВИЧ. «Мы усовершенствовали процесс, который ранее занимал два с половиной часа, и теперь вы можете сделать это менее чем за 5 минут», – сказал Дэй о времени, затрачиваемом на подготовку системы.

Секвенаторы, использующие принципы капиллярного электрофореза для разделения фрагментов ДНК, в настоящее время также доступны для использования в научно-исследовательских целях. Капиллярные секвенаторы более легко автоматизируются; основным требованием при проведении исследования является необходимость замены капилляров после каждых 100 анализов.

«Я смотрю на секвенирование нуклеиновых кислот как на метод, который завоевывает медицинский рынок», – говорит Т. Алькорн. «Когда нам удастся перевести этот метод в формат коммерческих наборов для лабораторий, он «сломает лед», как это сделали наборы для определения вирусной нагрузки на основе амплификационного анализа». И секвенирование, и методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот, позволяют распознавать гены, отвечающие за резистентность возбудителей к антибиотикам, а также идентифицировать виды микроорганизмов, плохо растущие на питательных средах.

Заглядывая в будущее, Т. Алькорн считает, что как микрогибридизационные матрицы, так и микроочипы для анализа экспрессии генов «имеют

огромную возможность стать рутинными клинико-диагностическими методами». В связи с тем, что секвенирование нуклеиновых кислот применяется главным образом в условиях клинических лабораторий, его пользователи потребуют создания более быстрых методов его проведения, при этом с такой же необходимостью могут столкнуться и микрогибридизационные матрицы. В первую очередь должны быть преодолены такие проблемы, как стоимость и технические трудности. Однако в конечном итоге возможно даже в течение 5 лет, предполагает он: «Я думаю, что они станут стандартными методами диагностики».

Молекулярные методы исследования также помогут раскрыть фундаментальные вопросы, что позволит микробиологии перейти на новый уровень развития. «Я являюсь ревностным сторонни-

ком того, что скоро нам придется приложить огромные усилия, чтобы изучить и охарактеризовать нормальное микробное сообщество организма человека», – говорит Д. Рэлман. Молекулярные методы идеально подходят для получения данных о разнообразии идентификационных маркеров, таких, как последовательности микробной ДНК, обнаруживаемые обычно в организме здорового человека в наиболее распространенных местах локализации инфекции – полость рта, пищеварительный тракт, влагалище, кожа, а также в органах и тканях, обычно считающихся стерильными, таких, как кровь, печень и селезенка. «Я думаю, что мы найдем там последовательности нуклеиновых кислот, которые помогут нам при установлении этиологии инфекционных болезней», – говорит Д. Рэлман.