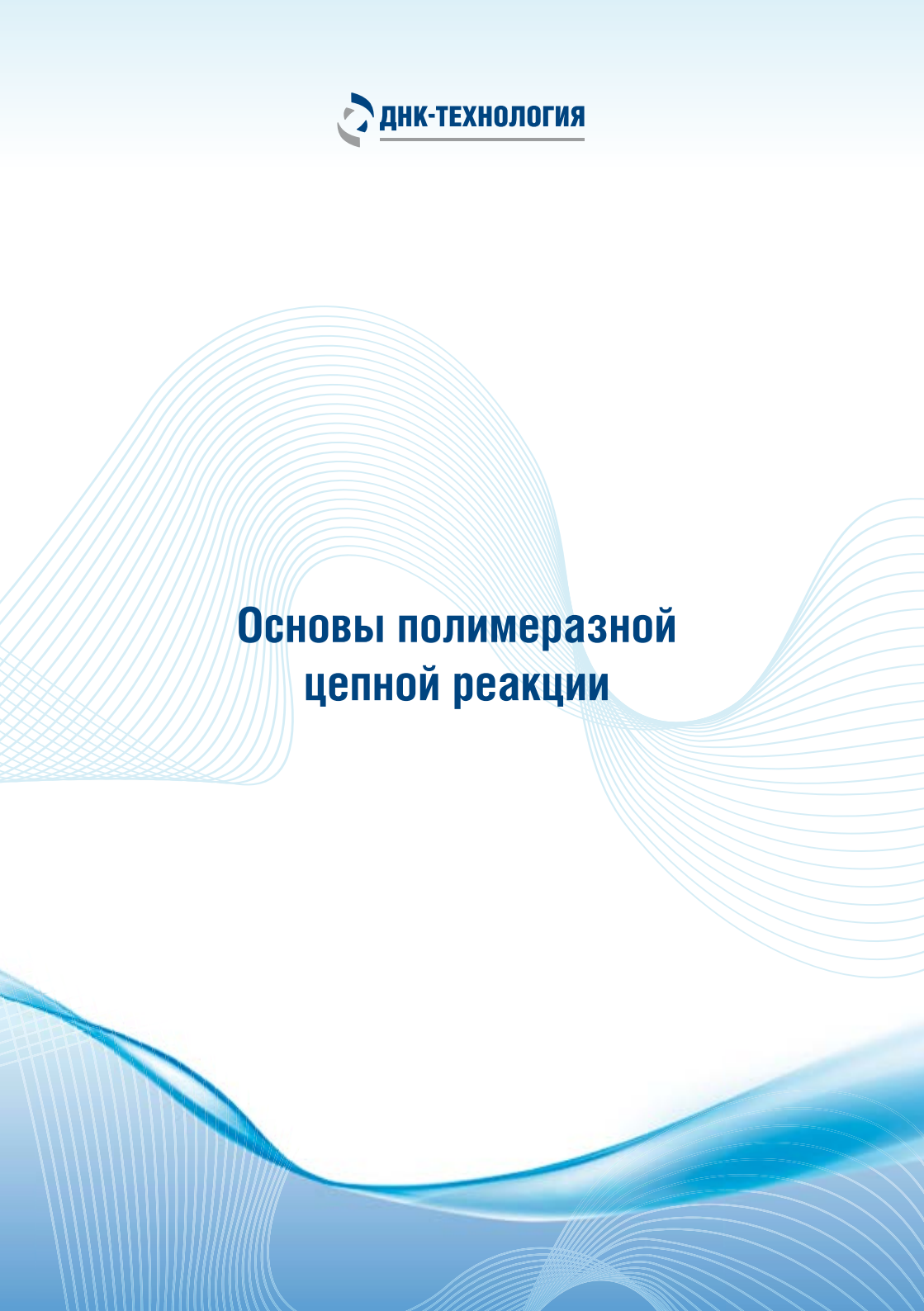




# **Основы полимеразной цепной реакции**



# **Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

методическое пособие

Москва  
2012 г.

## ОТ СОСТАВИТЕЛЯ

Цель пособия «Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР)» — помочь овладеть навыком в постановке ПЦР. Рассмотрены стадии проведения ПЦР, способы контроля прохождения реакции, типичные ошибки интерпретации результатов.

Представлены перспективы практического использования и современные тенденции развития ПЦР-диагностики.

Пособие предназначено для тех специалистов, которые готовятся к открытию клинично-диагностических лабораторий, а также может быть использовано сотрудниками уже действующих лабораторий.

Мы надеемся, что с помощью нашего пособия каждая диагностическая лаборатория сможет проводить ПЦР-диагностику на высоком уровне.

# СОДЕРЖАНИЕ

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b>                                     | <b>7</b>  |
| <b>1. Механизм полимеразной цепной реакции</b>      | <b>9</b>  |
| 1.1. Компоненты реакционной смеси                   | 9         |
| 1.1.1. Основные компоненты                          | 9         |
| 1.1.2. Дополнительные компоненты                    | 10        |
| 1.2. Циклический температурный режим                | 10        |
| 1.3. «Эффект плато»                                 | 12        |
| <b>2. Стадии постановки ПЦР</b>                     | <b>13</b> |
| 2.1. Подготовка пробы биологического материала      | 13        |
| 2.2. Способ постановки ПЦР                          | 14        |
| 2.3. Детекция результатов ПЦР                       | 17        |
| 2.3.1. Метод горизонтального электрофореза          | 17        |
| 2.3.2. Метод вертикального электрофореза            | 18        |
| 2.3.3. Метод гибридизации после амплификации        | 19        |
| 2.3.4. Метод гибридизации в процессе амплификации   | 19        |
| <b>3. Контроль ПЦР</b>                              | <b>23</b> |
| 3.1. Производственный контроль                      | 23        |
| 3.2. Внешний контроль работы лаборатории            | 23        |
| 3.3. Внутренний контроль качества                   | 24        |
| 3.3.1. Внутренние контроли                          | 25        |
| 3.3.2. Положительный контроль                       | 26        |
| 3.3.3. Отрицательный контроль                       | 26        |
| 3.3.4. Специальные контроли                         | 26        |
| <b>4. Ошибки ПЦР</b>                                | <b>29</b> |
| 4.1. Ошибки преаналитического этапа                 | 29        |
| 4.1.1. Место взятия биологического материала        | 29        |
| 4.1.2. Правильность взятия биологического материала | 29        |
| 4.1.3. Обработка биологического материала           | 30        |
| 4.1.4. Хранение биологического материала            | 30        |

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2. Ошибки аналитического этапа                                  | 31        |
| 4.2.1. Выбор системы пробоподготовки                              | 31        |
| 4.2.2. Генетическая изменчивость микроорганизмов                  | 32        |
| 4.2.3. Технические ошибки                                         | 32        |
| 4.3. Ошибки постаналитического этапа                              | 33        |
| 4.3.1. Ошибки интерпретации результатов                           | 33        |
| 4.3.2. Сравнение результатов ПЦР и ИФА                            | 34        |
| 4.3.3. Сравнение результатов ПЦР и микроскопии                    | 37        |
| 4.3.4. Сравнение результатов ПЦР и культурального метода          | 39        |
| 4.4. Контаминация                                                 | 41        |
| <b>5. Устройство ПЦР-лаборатории</b>                              | <b>44</b> |
| <b>6. Перспективы практического использования ПЦР-диагностики</b> | <b>46</b> |
| 6.1. Диагностика инфекций                                         | 46        |
| 6.1.1. Социально значимые инфекции                                | 46        |
| 6.1.2. Особо опасные инфекции                                     | 48        |
| 6.1.3. Гемотрансмиссивные инфекции                                | 49        |
| 6.1.4. Оппортунистические инфекции                                | 50        |
| 6.1.5. TORCH-инфекции                                             | 51        |
| 6.2. Генетические исследования                                    | 51        |
| 6.3. Определение ГМО в пищевых продуктах                          | 56        |
| 6.4. ПЦР в ветеринарии                                            | 57        |
| 6.5. ПЦР в растениеводстве                                        | 60        |
| 6.6. ПЦР в судебно-медицинской экспертизе                         | 61        |
| <b>7. Современные тенденции развития ПЦР</b>                      | <b>64</b> |
| 7.1. Секвенирование                                               | 64        |
| 7.2. Пиросеквенирование                                           | 68        |
| 7.3. Микрофлюидные технологии                                     | 72        |
| 7.4. Развитие ПЦР в режиме «реального времени»                    | 74        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>                                                 | <b>76</b> |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|              |                                       |               |                                                          |
|--------------|---------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------|
| <b>АГ</b>    | артериальная гипертензия              | <b>кДНК</b>   | комплементарная ДНК                                      |
| <b>АлАТ</b>  | аланинаминотрансфераза                | <b>КОЕ</b>    | колониообразующая единица                                |
| <b>АТФ</b>   | аденозинтрифосфат                     | <b>КРС</b>    | крупный рогатый скот                                     |
| <b>ВИЧ</b>   | вирус иммунодефицита человека         | <b>кРНК</b>   | комплементарная РНК                                      |
| <b>ВК</b>    | внутренний контроль                   | <b>МАНК</b>   | методы амплификации нуклеиновых кислот                   |
| <b>ВОЗ</b>   | Всемирная организация здравоохранения | <b>МБТ</b>    | микобактерии туберкулеза                                 |
| <b>ВПЧ</b>   | вирус папилломы человека              | <b>МКБ</b>    | Международная классификация болезней                     |
| <b>ВЭБ</b>   | вирус Эпштейн-Барр                    | <b>ММСП</b>   | Международные медико-санитарные правила                  |
| <b>ГиФА</b>  | гибридизационно-ферментный анализ     | <b>мРНК</b>   | матричная рибонуклеиновая кислота                        |
| <b>ГМО</b>   | генетически модифицированный организм | <b>МУ</b>     | методические указания                                    |
| <b>ГОСТ</b>  | Государственный стандарт              | <b>НИЗ</b>    | неинфекционное заболевание                               |
| <b>ГЭ</b>    | геном-эквивалент                      | <b>ООИ</b>    | особо опасные инфекции                                   |
| <b>ДНК</b>   | дезоксирибонуклеиновая кислота        | <b>ОПИ</b>    | оппортунистические инфекции                              |
| <b>дНТФ</b>  | дезоксинуклеотидтрифосфат             | <b>ОТ-ПЦР</b> | полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией     |
| <b>дАТФ</b>  | дезоксиаденозинтрифосфат              | <b>ПЦР</b>    | полимеразная цепная реакция                              |
| <b>дГТФ</b>  | дезоксигуанозинтрифосфат              | <b>ПЦР-РВ</b> | полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени» |
| <b>дЦТФ</b>  | дезоксцитозинтрифосфат                | <b>РНК</b>    | рибонуклеиновая кислота                                  |
| <b>дТТФ</b>  | дезокситимидинтрифосфат               | <b>СД1</b>    | сахарный диабет первого типа                             |
| <b>ддАТФ</b> | дидезоксиаденозинтрифосфат            | <b>СПИД</b>   | Синдром приобретённого иммунного дефицита                |
| <b>ддГТФ</b> | дидезоксигуанозинтрифосфат            | <b>СП</b>     | санитарные правила                                       |
| <b>ддЦТФ</b> | дидезоксцитозинтрифосфат              | <b>ССА</b>    | серонегативные спондилоартриты                           |
| <b>ддТТФ</b> | дидезокситимидинтрифосфат             | <b>ТОРС</b>   | тяжёлый острый респираторный синдром                     |
| <b>ИА</b>    | индекс авидности                      | <b>УГ</b>     | N-урацил-гликозилаза                                     |
| <b>ИЛ</b>    | интерлейкин                           | <b>УДК</b>    | универсальная десятичная классификация                   |
| <b>ИППП</b>  | инфекции, передаваемые половым путем  |               |                                                          |
| <b>ИРТ</b>   | инфекционный ринотрахеит              |               |                                                          |
| <b>ИФА</b>   | иммуноферментный анализ               |               |                                                          |
| <b>КВМ</b>   | контроль взятия материала             |               |                                                          |

|              |                                                                                                                                                                       |                 |                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ФСВОК</b> | Федеральная система внешней оценки качества                                                                                                                           | <b>IgM</b>      | (от англ. <i>Immunoglobulin M</i> )<br>иммуноглобулин М                                                                                                                                                                                                  |
| <b>ЦМВ</b>   | цитомегаловирус                                                                                                                                                       | <b>NIBSC</b>    | (от англ. <i>National Institute for Biological Standards and Control</i> )<br>Национального института биологической стандартизации и контроля Великобритании                                                                                             |
| <b>эПЦР</b>  | эмульсионная полимеразная цепная реакция                                                                                                                              | <b>PCR</b>      | (от англ. <i>polymerase chain reaction</i> )<br>полимеразная цепная реакция                                                                                                                                                                              |
| <b>APS</b>   | аденозин-5'-фосфосульфат                                                                                                                                              | <b>PPI</b>      | пирофосфат                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>FDA</b>   | (от англ. <i>Food and Drug Administration</i> )<br>Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США                                     | <b>RACE-PCR</b> | (от англ. <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> )<br>полимеразная цепная реакция длинных фрагментов                                                                                                                                                    |
| <b>FLASH</b> | (от англ. <i>Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization</i> )<br>специфическая гибридизации в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами | <b>SARS</b>     | (от англ. <i>Severe acute respiratory syndrome</i> )<br>тяжелый острый респираторный синдром                                                                                                                                                             |
| <b>GWAS</b>  | (от англ. <i>Genome-wide association study</i> )<br>всегеномное исследования ассоциации                                                                               | <b>SoGAT</b>    | (от англ. <i>Standardisation of Genome Amplification Techniques</i> )<br>группа по стандартизации технологий амплификации генома                                                                                                                         |
| <b>GuSCN</b> | (от англ. <i>Guanidine isothiocyanate</i> )<br>гуанидин изотиоцианат                                                                                                  | <b>SNP</b>      | (от англ. <i>single-nucleotide polymorphism</i> )<br>однонуклеотидный полиморфизм                                                                                                                                                                        |
| <b>HBV</b>   | (от англ. <i>hepatitis B virus</i> )<br>вирус гепатита В                                                                                                              | <b>GWAS</b>     | (от англ. <i>Genome-wide association study</i> )<br>всегеномное исследования ассоциации                                                                                                                                                                  |
| <b>HBeAg</b> | (от англ. <i>HBe antigen</i> )<br>антиген «е» вируса гепатита В                                                                                                       | <b>TORCH</b>    | группа инфекций<br>Т – токсоплазмоз ( <i>toxoplasmosis</i> ),<br>О – другие инфекции ( <i>others</i> ),<br>Р – краснуха ( <i>rubella</i> ),<br>С – цитомегаловирусная инфекция ( <i>cytomegalovirus</i> ),<br>Н – герпес ( <i>herpes simplex virus</i> ) |
| <b>HCV</b>   | (от англ. <i>hepatitis C virus</i> )<br>вирус гепатита С                                                                                                              |                 |                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>HLA</b>   | (от англ. <i>Human Leucocyte Antigens</i> )<br>антигены гистосовместимости человека                                                                                   |                 |                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>HPA</b>   | (от англ. <i>Human Platelet Antigen</i> )<br>тромбоцитспецифические антигены                                                                                          |                 |                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>IgG</b>   | (от англ. <i>Immunoglobulin G</i> )<br>иммуноглобулин G                                                                                                               |                 |                                                                                                                                                                                                                                                          |

## ВВЕДЕНИЕ

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) в биологическом материале (пробе).

Открытию полимеразной цепной реакции предшествовало развитие молекулярно-биологических технологий.

В 1869г. И. Мишером была открыта ДНК. Биологическая функция нового вещества была не ясна.

В 1944г ученые О. Эвери, К. Мак-Леода и М.Мак-Карти провели ряд экспериментов по трансформации бактерий, доказавшие, что за трансформацию (приобретение болезнетворных свойств безвредной культурой в результате добавления в неё мёртвых болезнетворных бактерий) отвечают выделенные из пневмококков ДНК.

Вплоть до 50-х годов XX века точное строение ДНК и способ передачи наследственной информации оставались неизвестными, хотя и было доказано, что ДНК состоит из нескольких цепочек, состоящих из нуклеотидов.

Количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в составе нуклеотидов ДНК были сформулированы в 1949–1951 гг. группой биохимика Э. Чаргаффа и получили название «*правила Чаргаффа*». Суть этих правил заключалась в следующем:

1. Количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а гуанина (Г) – цитозину (Ц):  $A=T$ ,  $G=C$ .
2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов:  $A+G=T+C$ .

Правила Чаргаффа, наряду с данными рентгеноструктурного анализа, сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК и определении *принципа комплементарности* Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году. Ученые пришли к выводу, что ДНК состоит из двух полимерных цепей, удерживаемых водородными связями между азотистыми основаниями и образующих двойную спираль.

При этом азотистые основания формируют парные (*комплементарные*) комплексы аденин – тимин и гуанин – цитозин при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот (рис.1). Каждая цепь служит матрицей при синтезе новой цепи, а последовательность в синтезируемой цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи – матрицы.



Рис.1. Принцип комплементарности

В 1955г. А. Корнберг открыл фермент, который назвал *ДНК-полимеразой*. Этот фермент способен удлинять короткие олигонуклеотидные затравки (*праймеры*), присоединяя к 3'-концу цепи ДНК дополнительный нуклеотид, но для этого необходимо, чтобы праймер был связан с комплементарной цепью ДНК (матрицей). Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать нуклеозидтрифосфаты (дНТФ), используемые в качестве строительных блоков.

В 1971г. Клеппе и соавт. представили данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК-праймеров для получения новых копий ДНК.

Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеиновых кислот еще не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью трудоемкого синтеза праймеров, и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания – охлаждения ДНК-полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1975г. Т. Брок и Х.Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена *Taq-полимераза*. Преимуществом данного фермента была способность стабильно работать при повышенных температурах (оптимум 72-80 °С).

В 1983-1984 гг. К. Мюллис провёл ряд экспериментов по разработке ПЦР и первым начал использовать *Taq-полимеразу* вместо неустойчивой к высоким температурам ДНК-полимеразы. Это позволило ускорить работы по разработке полимеразной цепной реакции. Кроме того, К. Мюллис вместе с Ф. Фалуном разработал алгоритм циклических изменений температуры в ходе ПЦР.

Таким образом, сформировался принцип использования ПЦР, как метода *амплификации* *in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 году Saiki с соавт. опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности  $\beta$ -глобина. С этого момента количество публикаций, о применении ПЦР в своих работах, стало увеличиваться в геометрической прогрессии.

Особенно бурное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека». Были созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Это, в свою очередь, способствовало значительному росту информационных баз данных, содержащих последовательности ДНК различных биологических объектов.

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

Таким образом, открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

# 1. Механизм полимеразной цепной реакции

## 1.1. Компоненты реакционной смеси

### 1.1.1. Основные компоненты

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

**Праймеры** – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

- *Быть специфичными.* Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания, и синтеза фрагментов различной длины, отличных от искомым. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.
- *Не должны образовывать димеры и петли,* то есть не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом.
- *Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций* в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании на такую зону, отжиг праймеров не происходит, и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

**Taq-полимераза** – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

**Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)** – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

**Буфер** – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

**Анализируемый образец** – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

### 1.1.2. Дополнительные компоненты

Для удобства детекции или контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

**Внутренние контроли** – гетерологичный специфическому фрагмент ДНК, как правило, большего размера, ограниченный (фланкированный) специфическими праймерами. Фактически, представляет собой альтернативную матрицу ПЦР и позволяет контролировать эффективность амплификации в каждой конкретной пробе.

**ДНК-зонды** – искусственно синтезированные олигонуклеотиды небольшого размера (около 30 нуклеотидов), комплементарные специфическим ампликонам (продуктам реакции). Благодаря прикрепленным к ним изотопным или флуоресцентным меткам ДНК-зонды могут использоваться для детекции продуктов реакции.

## 1.2. Циклический температурный режим

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

**1. Денатурация** – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (рис. 2).

**2. Отжиг** – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.



Рис. 2. Денатурация ДНК

**3. Элонгация (синтез).** После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

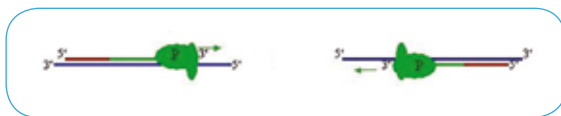


Рис. 3. Отжиг праймера и элонгация

Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу (рис. 3).

Иногда в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию. Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (рис. 4).

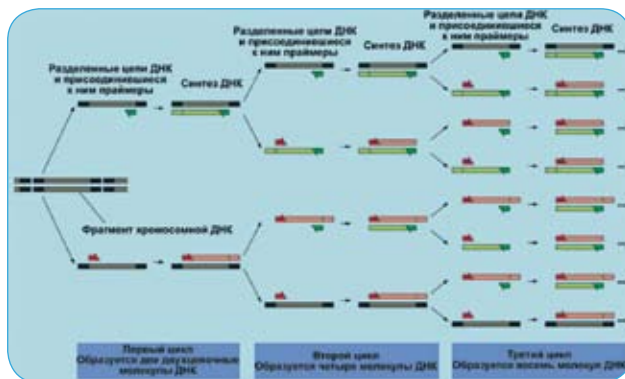


Рис. 4. Этапы ПЦР

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n, \text{ где}$$

A – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

M – начальное количество ДНК-мишеней;

n – число циклов амплификации.

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78-97%. Если в пробе присутствуют ингибиторы реакции это значение может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

$$A = M \cdot (1 + E)^n, \text{ где}$$

$E$  – значение эффективности реакции.

Следует заметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты, однако их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии по формуле:

$$K = M \cdot n, \text{ где}$$

$K$  – количество длинных продуктов амплификации.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

### 1.3. «Эффект плато»

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – «эффект плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает  $0,3\text{--}1$  пмолей.

В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют:

- Утилизация субстратов (дНТФ и праймеров).
- Стабильность реагентов (дНТФ и фермента).
- Количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы.
- Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу.
- Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

## 2. Стадии постановки ПЦР

ПЦР-анализ состоит из трех стадий.

### 2.1. Подготовка пробы биологического материала

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации.

Иногда достаточным бывает кипячение образца в течение 5–10 минут, однако в большинстве случаев требуются более трудоемкие методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, предложенная *Marmur*. Она включает в себя ферментативный протеолиз клеток с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Однако это метод довольно трудоемкий и предполагает работу с такими токсичными веществами, как фенол и хлороформ.

Популярным в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный *Boom* с соавт. Он основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – *гуанидина изотиоционата* (GuSCN) высокой молярности (5М) с последующей сорбцией ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен и технологичен для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок, что имеет большое значение при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР, поэтому при использовании этого метода важны правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологии.

Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, так как возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а примеси, ингибирующие ПЦР. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца, в результате которого клеточные стенки разрушаются, а нуклеиновые кислоты выходят в раствор; и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев он пригоден для работы с клиническим материалом.

Тем не менее, встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников. Кроме того, клеточные стенки некоторых микроорганизмов не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца.

При массовом скрининге, когда важно получить статистические данные, допускается использование простых методов с применением детергентов или обработки биологического материала щелочами с последующей их нейтрализацией. В то же время, использование подобных методов пробопод-

готовки для клинической диагностики может приводить к ложноотрицательным результатам, вследствие использования в реакционной смеси некачественного препарата ДНК.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

### 2.2. Способ постановки ПЦР

На данный момент разработаны варианты постановки ПЦР, направленные на решение следующих задач: увеличение эффективности реакции и снижение риска образования неспецифических продуктов; реализацию возможности проведения как качественного, так и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК/РНК.

Наиболее распространенными в клинко-диагностических лабораториях модификациями ПЦР являются:

*ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR)* – модификация, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody до наступления первой денатурации (проводится при 95 °С в течение 10 минут).

Кроме того, для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и, как следствие, образования неспецифических продуктов реакции до момента полного прогрева, используется легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси.

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления  $T_m$ , при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает  $T_m$ , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции.

Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствие фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

*ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR)* – используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью *ревер-*

тазы (обратной транскриптазы), используя в качестве матрицы мРНК, проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последующей ПЦР. Для этого применяют обратную транскриптазу, выделенную из двух вирусов: *Avian myeloblastosis virus* и *Moloney murine leukemia virus*.

Использование ревертазы связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, данный фермент термолабилен и поэтому может быть использован при температуре не выше 42°C. Так как при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, то эффективность реакции заметно снижается и по разным оценкам приблизительно равна 5%. Этот недостаток может быть устранен при использовании в качестве обратной транскриптазы *термостабильной полимеразы*, проявляющей активность в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ . Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную, так и транскриптазную активность.

Для проведения реакции обратной транскрипции в реакционной смеси так же, как и в ПЦР, в качестве затравки должны присутствовать праймеры и смесь 4-х дНТФ.

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода, например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирусы гриппа, ВИЧ и т.д.) представлены именно РНК.

*ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR)* – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации, не открывая пробирки. Таким образом, решается одна из основных проблем ПЦР – проблема контаминации ампликонами.

Одним из таких вариантов является метод «FLASH» (FLUorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, мечеными флуорофорами).

Ключевым элементом метода «FLASH» является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Зонды добавляют в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, то перед началом реакции флуоресценция отсутствует.

Во время реакции зонды гибридизуются с ДНК-мишенью, на стадии элонгации Taq-полимераза разрушает зонд благодаря 5'-экзонуклеазной активности и флуорофор оказывается свободным от гасителя. Таким образом, количество разрушенных зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся ампликонов. Следует отметить, что регистрация флуоресценции происходит с помощью детектора флуоресценции после окончания реакции, поэтому метод не является количественным.

*ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-PB)* – используется для одновременной амплификации и измерения количества искомой молекулы ДНК. Преимуществом данного подхода является возможность совмещения детекции и количественного определения специфической последовательности ДНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации.

Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК (интеркаляция возможна в случае, если краситель имеет подходящие размеры и химическую природу и может поместиться между основаниями ДНК) или модифицированные дезоксинуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании искомой мРНК в клетке и судить об уровне экспрессии гена в отдельной клетке или ткани.

Отличительными чертами ПЦР-РВ являются не только возможность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

*Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР* — это одновременная амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке. Преимуществом данного метода является возможность выявления ряда патогенов, генетических модификаций организмов или генотипирования множественных аллелей и т.д., поместив пробу в одну пробирку.

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабораториях, например:

*Гнездовая («вложенная», англ. *nested PCR*) ПЦР* — применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

*ПЦР «инвертированная»* — используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для этого проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов.

*Ассиметричная ПЦР* — проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. Сама ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

*Метод молекулярных колоний* — данная модификация основана на использовании акриламидного геля, который до начала ПЦР полимеризуют со всеми ее компонентами на поверхности. В процессе реакции в точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

*ПЦР длинных фрагментов* (англ. *Long-range PCR*) – вариант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Для реализации данного подхода используют смесь двух полимераз, одна из которых – Таq-полимераза с высокой процессивностью (способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью (*Pfu-полимераза*). Она необходима для корректирования ошибок, внесённых Таq-полимеразой, при этом некомплементарные нуклеотиды удаляются с помощью Pfu-полимеразы.

*Групп-специфическая ПЦР* (англ. *group-specific PCR*) – ПЦР с использованием консервативных праймеров к последовательностям ДНК для родственных групп внутри одного или между разными видами. Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным 18S и 26S генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера: последовательность генов 18S и 26S консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов.

*ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE-PCR)*

*Иммуно-ПЦР (immuno-PCR-IPCR)*

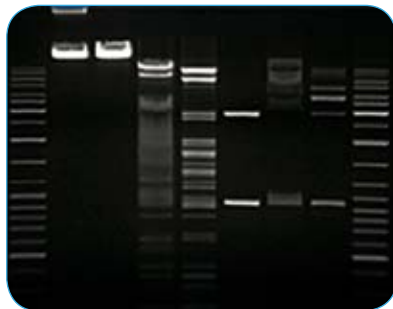
## 2.3. Детекция результатов ПЦР

На сегодняшний день существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

- **Электрофоретический** (в агарозном или полиакриламидном геле)
- **Гибридизационно – ферментный**
- **Гибридизационно – флуоресцентный:**
  - регистрация продукта после окончания реакции амплификации – «анализ по конечной точке»;
  - детекция продукта в режиме «реального времени».

### 2.3.1. Метод горизонтального электрофореза

Наиболее распространенным до недавнего времени являлся метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру (рис. 5). В этом случае визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия.



**Рис. 5.** Разделение молекул ДНК в агарозном геле.

Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки в геле формируют лунки, в которые вносят продукты амплификации. Пластины геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения.

Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК.

Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254 – 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной, поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

### 2.3.2. Метод вертикального электрофореза

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид и специальную камеру для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК с точностью до одного нуклеотида. Однако приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного, кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

Оба варианта электрофоретической детекции позволяют осуществлять только **качественный анализ** и сопряжены с рядом проблем:

- Большие затраты времени на стадию детекции
- Невозможность автоматизации
- Сложность и субъективность трактовки результатов
- Высокий риск контаминации и большие затраты на ее устранение:
  - повышенные требования к организации лаборатории;
  - максимальное удаление зоны детекции от других зон проведения ПЦР;
  - выделение отдельного сотрудника на стадию детекции;
  - постоянный контроль смыслов;
  - большое количество К- для контроля контаминации ампликонами и, как следствие, увеличение объема расходных материалов и времени для подготовки к проведению детекции.

### 2.3.3. Метод гибридизации после амплификации

Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов с продуктами амплификации. Зонды представляют собой искусственно синтезированные участки ДНК, содержащие ту или иную метку, детектируемую специальными приборами.

Для детекции продуктов ПЦР после окончания реакции амплификации необходимо специальное оборудование – *детектор флуоресценции* (например, приборы «Джин» или «Джин-4» производства НПФ «ДНК-Технология»).

В процессе своей работы прибор регистрирует флуоресцентное излучение, возникающее в реакционной смеси при освещении образца источником возбуждающего света. Регистрация производится последовательно для каждой из пробирок при её позиционировании относительно оптического блока с помощью шагового двигателя.

Флуорофоры для каждой из мишеней (например, для специфического искомого участка ДНК и внутреннего контроля) имеют свою длину волны, это позволяет регистрировать одновременно несколько сигналов по соответствующим каналам, что повышает производительность метода.

Такой подход позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами амплификации. Детекция результатов проводится в закрытых пробирках, что позволяет осуществлять ПЦР-исследования в одной комнате и обходиться меньшим количеством персонала. Кроме того, регистрация, интерпретация и хранение полученных результатов проводятся автоматически.

В результате указанный способ детекции существенно сокращает время проведения анализа и исключает возможность субъективной оценки полученных результатов, что повышает качество работы лаборатории. Тем не менее необходимо помнить, что реализация данного подхода позволяет проводить только **качественный анализ**.

Различные варианты детекции по конечной точке позволяют оценить количество исходной ДНК методом серийных разведений, определяя количество работающих разведений и сравнивая их с контрольными образцами с известной концентрацией ДНК. Однако данный подход является слишком трудоемким и практически не применяется в условиях диагностических лабораторий.

### 2.3.4. Метод гибридизации в процессе амплификации

Данный метод, как упоминалось ранее, позволяет учитывать результаты реакции, не открывая пробирки. Регистрация результатов по уровню флуоресценции происходит с помощью специального оборудования.

Ключевым элементом метода является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя.

Наиболее часто применяется флуоресцентный краситель 6-FAM (6-карбоксифлуоресцеин), с длинной волны возбуждения 488 нм, который легко связывается с олигонуклеотидами и обеспечивает высокую интенсивность сигнала. Поэтому под анализ с его использованием адаптированы многие приборы.

Также активно применяют SYBR Green I, который при связывании с двухцепочечной ДНК вызывает увеличение флуоресценции. В качестве референсного красителя широко используется ROX.

Для выявления продуктов амплификации применяют следующие наиболее распространенные подходы:

*Выщепление 5' концевой метки* – метод основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакцию смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входят флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК, причем, чем больше продуктов амплификации образуется в ходе ПЦР, тем больше молекул зондов свяжется с соответствующими ампликонами. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности (рис. 6).

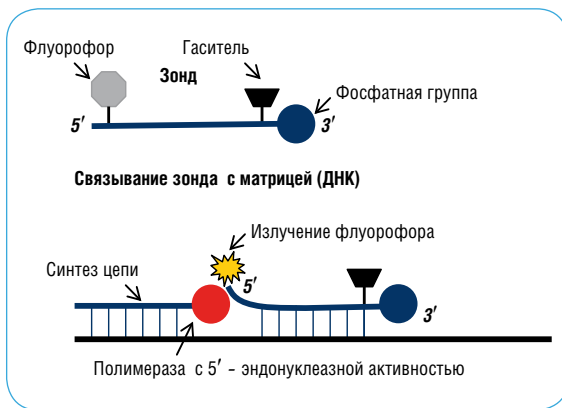


Рис. 6. Выщепление 5' концевой метки

Таким образом происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения. Очевидно, что чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

*Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями* – методика отличается от описанной выше тем, что концевые последовательности зонда представляют собой взаимно комплементарные области, а флуорофор и гаситель присоединяют к концевым нуклеотидам. При температуре отжига свободные зонды образуют шпильки за счет наличия комплементарных участков. При этом флуорофор и гаситель оказываются в непосредственной близости, что приводит к тушению флуоресценции.

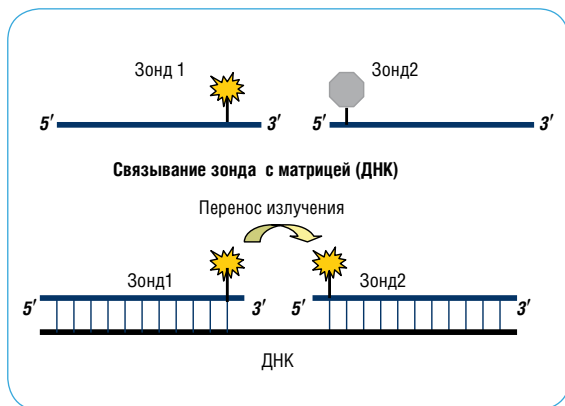
При отжиге праймеров зонды комплементарно присоединяются к амплифицируемому участку ДНК, гаситель оказывается пространственно отделен от флуорофора и наблюдается рост флуоресцентного сигнала. Такие зонды часто называют «молекулярными беконами» (molecular beacons) (рис. 7).



Рис. 7. Зонды с комплементарными концевыми последовательностями

Таким образом, количество присоединившихся зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР.

*Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии* — данный способ детекции отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого зонда, ко второму флуорофору, который находится на 5'-конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида. При одновременном связывании обоих зондов с ДНК матрицей излучение, испускаемое первым флуорофором передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором (рис. 8).



**Рис.8.** Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии

*Использование интеркалирующих красителей* — этот способ детекции основан на том, что флуоресценция интеркалирующих красителей значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК. Таким образом, можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации.

*Для анализа в режиме «реального времени»* используют специальные *ДНК-амплификаторы* с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе реакции. При амплификации образца детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков:

- 1 — базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора);
- 2 — экспоненциальная амплификация;
- 3 — плато.

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом, момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового — так называемый пороговый цикл — зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Главным преимуществом детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени» является возможность проведения **количественного анализа**.

При количественном исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами, в которых заведомо известно количество ко-

пии ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК.

Следует отметить, что для выполнения количественного ПЦР-анализа рекомендуется использование препаратов ДНК с высокой степенью очистки, так как присутствие нежелательных примесей (ингибиторов) снижает эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК.

Для контроля точности количественного анализа используют калиброванные внутренние контроли. В некоторых случаях возможны потери ДНК на стадии выделения, приводящие к существенному искажению значения реального количества ДНК в образце. Для контроля за такими потерями в образец перед пробоподготовкой вносят внутренний контроль, количество которого определяют вместе с количеством ДНК инфекционного агента.

Кроме того, появляется возможность реализовать **анализ кривых плавления**, когда после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается.

Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу полосок, получаемых на электрофореze, то есть числу разных типов ампликонов. Применение кривых плавления не ограничивается только детекцией продуктов амплификации с помощью интеркалирующих флуорофоров. При использовании кривых плавления в системах с ДНК-зондами возможно различать точечные мутации, расположенные внутри областей связывания ДНК-матрицы и зонда.

Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления зонда и изменениям в графике кривой плавления. Использование кривых плавления не требует от оператора амплификатора никаких дополнительных манипуляций с пробирками, а интерпретация полученных данных автоматизирована и формализована.

К приборам, позволяющим получать количественные результаты ПЦР анализа, следует отнести модели ДТ-96 (ДТпрайм) и ДТ 48 (ДТлайт) (НПФ «ДНК-Технология», Россия) «iQ5» и CFX (BioRad, США), «COBAS Amplicor» (Roche, США), «ABI PRISM 7400» (ABI, США), «RotorGene» (Qiagen, GmbH Германия), Smart Cycler (Cepheid, США) и другие. Эти приборы позволяют следить за кинетикой накопления продуктов амплификации.

Таким образом, данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с методами анализа по конечной точке:

- количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа.

### 3. Контроль ПЦР

Лаборатории, использующие в своей работе метод ПЦР, должны осуществлять следующие виды контроля:

- *Производственный*
- *Внутрилабораторный*
- *Внешний контроль работы лаборатории*

#### 3.1. Производственный контроль

Производственный контроль регламентирован СП 1.1.1058-01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» с изменениями и дополнениями (СП 1.1.2193-07). Программа (план) производственного контроля должна включать перечень официально изданных санитарных правил, методов и методик контроля факторов в соответствии с осуществляемой деятельностью. Обязательным является выполнение требований санитарных правил и проведение санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, подтвержденных проведением самопроверки (производственным контролем). В этом случае необходимости в постоянных проверках со стороны надзорных органов не возникает.

#### 3.2. Внешний контроль работы лаборатории

Согласно Методическими указаниями (МУ1.3.2569-09) «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», лаборатория должна осуществлять следующие виды контроля:

- Лаборатория должна принимать участие, в установленном порядке, в мероприятиях (программах) по внешней оценке качества лабораторных исследований (ФСВОК и т.д.) по конкретным нозологическим формам не реже 1 раза в год.
- Внутрилабораторный и внешний контроль качества лабораторных исследований осуществляются путем анализа шифрованных аттестованных контрольных панелей, содержащих «положительные» и «отрицательные» пробы

*Федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК)* – один из важнейших элементов системы обеспечения качества клинической лабораторной диагностики, функционирует с 1995 года.

Деятельность ФСВОК осуществляется под общим руководством Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор), во взаимодействии с ее территориальными органами и органами управления здравоохранением и в соответствии с приказом МЗ РФ № 9 от 26.01.94, № 117 от 03.05.95, № 60 от 19.02.96, № 380 от 25.12.97, № 45 от 07.02.2000

и письмами Росздравнадзора руководителям территориальных Управлений и руководителям медицинских организаций № 01И-787/05 от 26.12.05 и 01И-748/07 от 20.11.07 .

В настоящее время система состоит из 141 раздела (89 собственных разделов ФСВОК и 52 раздела, совместных с зарубежными системами внешней оценки качества), охватывающих все основные виды клинико-лабораторных исследований. Ежегодно в ФСВОК участвует около семи тысяч клинико-диагностических лабораторий Российской Федерации.

Основными разделами ФСВОК относительно ПЦР являются:

- ПЦР – выявление микобактерий туберкулеза
- Молекулярно-генетическое выявление лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза
- ПЦР – выявление вируса гепатита В (HBV)
- ПЦР – выявление HCV
- ПЦР – выявление ВИЧ
- ПЦР – выявление *C. trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*
- ПЦР – выявление *N. gonorrhoeae*
- ПЦР – выявление вируса папилломы человека (ВПЧ)
- Количественное определение ДНК вируса гепатита В (ВГВ) методом ПЦР
- Количественное определение РНК вируса гепатита с (HCV) методом ПЦР

### 3.3. Внутренний контроль качества

Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества определяется в МУ 1.3.2569-09 следующими мероприятиями:

- В лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) в диагностических целях, проводят внутрилабораторный контроль качества проводимых исследований с периодичностью, зависящей от объема выполняемой работы и определяемой руководителем лаборатории, но не реже одного раза в квартал.
- При проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований могут использоваться аттестованные на наличие аналита (его количества) панели производителей коммерческих наборов или внутрилабораторные аттестованные образцы, содержащие и не содержащие нуклеиновые кислоты конкретных возбудителей в различной концентрации, стабильные в условиях хранения.

Реализация указанных положений возможна при использовании следующих подходов:

1. Постановка внутренних контролей (**БК**)
2. Использование отрицательных контрольных образцов (**К-**)
3. Использование положительных контрольных образцов (**К+**)
4. Постановка специальных контролей
5. Регулярные смывы с поверхностей

### 3.3.1 Внутренние контроли

Препарат ДНК, подготовленный к ПЦР из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, заметно снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях и приводящих к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомого возбудителя. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью.

Для этой цели в каждую пробирку добавляют дополнительный, так называемый, *внутренний контроль*. Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма. Для инфекционных тест-систем иногда используют, например,  $\beta$ -глобиновый ген, к концам которого с помощью генно-инженерных манипуляций «пришивают» участки ДНК, гомологичные праймерам, входящим в состав тест-системы.

При отсутствии регистрации внутреннего контроля и выявления специфической ДНК результат следует считать недостоверным. В этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется перевыделить ДНК.

Если внутренний контроль внести в реакционную смесь, то он станет такой же мишенью для отжига праймеров, как и ДНК искомого возбудителя инфекции. Размер продукта амплификации внутреннего контроля подбирают таким образом, чтобы он отличался от специфических ампликонов в 2 и более раз.

В результате, если внести ДНК внутреннего контроля в реакционную смесь вместе с испытуемым образцом, то независимо от наличия микроорганизма в биологическом образце, внутренний контроль станет причиной образования ампликонов, которые отличаются по размеру от специфических ампликонов, получаемых после постановки ПЦР в присутствии специфической ДНК микроорганизма.

Наличие ампликонов внутреннего контроля в реакционной смеси будет свидетельством нормального прохождения реакции амплификации и отсутствия ингибиторов. Если ампликоны нужного размера не образовались, но не образовались также и ампликоны внутреннего контроля, можно сделать вывод о возникшей проблеме при прохождении ПЦР как следствие наличия в анализируемом образце нежелательных примесей, от которых следует избавиться, либо технологических нарушений. В любом случае результат реакции следует признать недостоверным.

Важно отметить, что если в реакционной смеси находится нужная ДНК, то эффективность ее амплификации может заметно снижаться из-за конкуренции за праймеры с ДНК ВК. Это особенно заметно при низких концентрациях ДНК в испытуемом образце и может приводить к ложноотрицательным результатам. Поэтому концентрация внутреннего контроля должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомым молекул ДНК.

Количественный анализ ВК позволяет в каждой пробе оценивать потери выявляемой ДНК/РНК на стадии пробоподготовки, а также определить снижение эффективности за счет ингибиторов обратной транскрипции или ПЦР. В связи с этим ВК должен удовлетворять следующим требованиям:

- Амплификация ДНК ВК должна происходить и регистрироваться независимо от присутствия и количества искомой ДНК в реакционной смеси для всего диапазона определяемых концентраций, т.е. ВК не должен быть конкурентным.

- Эффективность амплификации ВК и исследуемых проб должна быть одинаковой, а ее количество должно соответствовать линейному участку диапазона определяемых концентраций ДНК-мишени.
- В случае диагностики инфекций, вызываемых РНК-содержащими вирусами, в состав ВК должен входить целевой фрагмент специфической РНК, из которой перед проведением ПЦР будет синтезирована кДНК посредством обратной транскрипции. Применение ВК на основе ДНК-конструкций при количественном анализе РНК не позволяет учитывать ее потери за счет повышенной физической и ферментативной деградации, а также контролировать процесс обратной транскрипции.

### 3.3.2. Положительный контроль

Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров, например, ДНК искомого микроорганизма или клонированные специфические участки его генома. Неспецифические ампликоны отличаются по размеру от ампликонов, образующихся в результате амплификации с контрольным препаратом ДНК. Они могут быть как большего, так и меньшего размеров по сравнению с положительным контролем. В худшем случае их размеры могут совпадать и читаются в электрофореze как положительные.

Для контроля специфичности образуемого продукта амплификации можно использовать гибридизационные зонды, меченные флуоресцентными метками или радиоактивными изотопами и взаимодействующие с ДНК в соответствии с теми же принципами, что и праймеры.

### 3.3.3. Отрицательный контроль

Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала или препарата ДНК вносится соответствующее количество деионизованной воды или экстракта, не содержащего исследуемой ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключения учета ложноположительных результатов.

### 3.3.4. Специальные контроли

Использование специальных контролей при постановке ПЦР позволяет решить ряд задач, в первую очередь, касающихся оценки эффективности процесса амплификации и контроля специфичности полученных результатов, а также дает возможность реализовать подход к количественному анализу ДНК.

Принципиальным моментом является постановка специальных контролей при исследовании сложных многокомпонентных систем, таких как биоценозы, поскольку появляется возможность качественного и количественного анализа взаимодействия компонентов системы и характеристики их отношения к биотопу.

К специальным контролям можно отнести следующее:

- *Маркеры длин фрагментов ДНК*
- *Контроль фона*
- *Стандарты и калибраторы*
- *Контроль взятия материала (КВМ)*

*Маркеры длин фрагментов ДНК* используются при детекции результатов ПЦР методом гель-электрофореза. Стандарты (маркеры) представляют собой фрагменты двуцепочечной ДНК строго определенной длины, позволяющие идентифицировать и охарактеризовать полосы, полученные в геле, и оценить результаты анализа с точки зрения их специфичности.

*Контроль фона* наиболее актуален при использовании метода гибридизации в процессе амплификации. Это обусловлено тем, что помимо флуоресценции, возрастающей пропорционально синтезу ампликонов (ПЦР-РВ) или определяющейся после амплификации (FLASH), прибор регистрирует фоновую флуоресценцию, величина которой зависит от: свойств меченых зондов; изменения концентрации отдельных компонентов реакционной смеси в зависимости от серии, режима и продолжительности хранения; используемого пластика; особенностей регистрирующей аппаратуры.

Анализ величины целевого сигнала от ампликонов над фоновой флуоресценцией и шумами в процессе ПЦР-РВ позволяет установить некоторое пороговое значение флуоресценции. Оно одинаково для всех совместно анализируемых проб, и осуществляется автоматически, не требуя дополнительных манипуляций по приготовлению фоновых образцов. При проведении же анализа методом FLASH существует необходимость введения отдельных фоновых пробирок.

*Стандарты и калибраторы* наиболее часто используются при осуществлении количественного анализа методом ПЦР. Введение этого типа контролей предполагает построение калибровочного графика в координатах с серией разведений ДНК-стандарта, из которого находят концентрацию субстрата в экспериментальных образцах.

Точность метода зависит от того, насколько условия ПЦР серии стандартов (прежде всего, эффективность амплификации) близки к условиям ПЦР экспериментальных образцов.

В тех случаях, когда требуется оценить «абсолютное» количество субстрата, выбор стандартов для градуировочного графика представляет собой сложную задачу.

Для определения количества матрицы в ПЦР-РВ существуют следующие варианты стандартов:

- Очищенный продукт ПЦР-РВ.
- Рекомбинантная ДНК.
- Рекомбинантная РНК с последующей обратной транскрипцией.
- Синтетический олигонуклеотид, содержащий амплифицируемую последовательность.

Если достаточно определить лишь относительную концентрацию субстрата, для построения калибровочного графика удобно использовать серию разведений одного из экспериментальных образцов. В тех случаях, когда образцы могут сильно отличаться по примесям и доле амплифицируемого фрагмента в реакционной смеси, необходимо приготовить серию разведений каждого из них и сравнить эффективности.

Однако приготовление серии стандартов непосредственно из экспериментального образца может привести к низкой достоверности данных. Во-первых, концентрация субстрата в образце может быть недостаточно высокой для того, чтобы при разведении в 8–10 раз давать достоверные результаты. В этом случае можно попробовать сконцентрировать образец. Во-вторых, содержание приме-

сей в препарате может негативно отражаться на эффективности реакции, в то время как разведение препарата будет уменьшать концентрацию примесей и, соответственно, увеличивать эффективность.

Использование стандартов и калибраторов позволяет определить концентрацию ДНК в двух вариантах (например, при анализе на наличие патогенных микроорганизмов в пробе):

- количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в единице объема клинического образца (ГЭ/мл), что отражает абсолютную концентрацию данных микроорганизмов в клиническом материале;
- расчет соотношения количества геномов на количество геномов клеток человека. Для этой цели в ПЦР-смеси наряду с калибраторами ДНК микроорганизма присутствуют калибраторы человеческой ДНК. Полученные таким образом относительные значения концентрации ДНК микроорганизма к ДНК человека могут отражать плотность обсемененности искомыми микроорганизмами.

*Контроль взятия материала* – ключевой момент в определении качества взятой для исследования пробы. Данный подход позволяет исключить ошибки преаналитического этапа при исследовании биологического материала, содержащего клетки человека, и избежать получения недостоверных, ложноположительных или ложноотрицательных результатов ПЦР. Кроме того, он может быть использован для оценки количества геномной ДНК человека.

Таким образом, существует спектр подходов, обеспечивающий получение достоверных результатов, которые позволяют контролировать качество и эффективность прохождения ПЦР и оптимизировать работу лаборатории.

Тем не менее, в процессе реализации данного молекулярно-генетического метода исследования возникает ряд типовых ошибок.

## 4. Ошибки ПЦР

Выделяют три основных этапа при подготовке и проведении анализа методом ПЦР, в которых наиболее часто допускают ошибки, приводящие к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов:

- *Преаналитический этап*
- *Аналитический этап*
- *Постаналитический этап*

### 4.1. Ошибки преаналитического этапа

Данный этап включает взятие биоматериала, его хранение и транспортировку, пробоподготовку (СП 1.2.036-95, СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08).

#### 4.1.1. Место взятия биологического материала

В первую очередь, необходимо **правильно определить место взятия биологического материала** для исследования, а именно: *место предполагаемой локализации инфекционного процесса*.

В первую очередь, это касается тех микроорганизмов, для которых известна тропность ко многим видам тканей, например, *M.tuberculosis* (обуславливает развитие внелегочных форм туберкулеза, в том числе: органов пищеварительной и мочеполовой систем; центральной нервной системы и мозговых оболочек; костей и суставов; кожи; глаз); *C.trachomatis* (вызывает воспалительные заболевания экстрагенитальной локализации – воспалительные заболевания органов малого таза и брюшины, и восходящий инфекционный процесс – поражения слизистой оболочки матки, труб, яичников, околоматочных связок). Исходя из этого, выбор универсального материала, например, мокроты для выявления кислотоустойчивых микобактерий, либо соскоба из влагалища, цервикального или мочеиспускательного каналов для выявления *C.trachomatis* может привести к ложноотрицательным результатам в ПЦР.

Кроме того, распространенным, но при этом ошибочным является подход к выявлению спектра патогенных микроорганизмов, особенно возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП), в крови пациента. Необходимо учитывать, что для большинства возбудителей ИППП гематогенный путь распространения не является основным, либо не доказан, соответственно, кровь, как материал для исследования, не является пригодной.

Кроме того, даже в случае присутствия в крови отдельных клеток микроорганизмов – возбудителей ИППП, вероятность их обнаружения крайне мала, поскольку оказывается ниже предела чувствительности стандартных тест-систем.

#### 4.1.2. Правильность взятия биологического материала

Второй распространенной ошибкой преаналитического этапа является **неправильное взятие материала на исследование**. Даже при правильном определении места взятия материала необходимо учитывать тот факт, что он *должен содержать максимальную концентрацию искомым микроорганизмов, а также быть лишен нежелательных примесей, ингибирующих ПЦР*.

Так при исследовании на наличие внутриклеточных патогенов, проба должна содержать максимальное количество клеток, например, эпителиальных для выявления *C. trachomatis*, ВПЧ. Для выявления вируса Эпштейн-Барр (ВЭБ) и цитомегаловируса (ЦМВ) целесообразно использовать лейкоцитарную массу крови. Принципиальным является также стадия заболевания, а именно: осуществляется ли взятие материала в период ремиссии или обострения, что напрямую влияет на концентрацию искоемых микроорганизмов в пробе.

Кроме того, необходимо минимизировать количество примесей в пробе, например, слизи, гноя и крови в эпителиальном соскобе, для чего их избыток необходимо удалить стерильным ватным тампоном непосредственно перед взятием образца.

Таким образом, следующей распространенной ошибкой может стать **неправильная обработка материала**.

### 4.1.3. Обработка биологического материала

При работе с кровью важно учитывать тот факт, что для предотвращения ее свертывания в процессе доставки необходимо использовать антикоагулянты. Однако, наиболее распространенный антикоагулянт — гепарин является мощным ингибитором ПЦР, поэтому его использование в данном случае недопустимо.

Относительно гепарина следует заметить, что его присутствие в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, также может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

При необходимости использовать в качестве материала для исследования мочу (клеточный осадок первой порции утренней мочи) важно тщательно промыть пробу физиологическим раствором. Это обусловлено тем, что осадок содержит большое количество солей и мочевины, которые, при использовании технологий флуоресцентной детекции, денатурируют зонды, приводя к ложноположительным результатам.

### 4.1.4. Хранение биологического материала

Принципиальным для получения адекватных результатов ПЦР является **хранение биологического материала**.

Необходимо помнить о температуре хранения биологического материала, а также сроках и способах его доставки в ПЦР-лабораторию в случае, если транспортировка требует значительного времени. При нарушении сроков хранения или транспортировки биоматериала ДНК или РНК возбудителя могут разрушаться, что приведет к ложноотрицательным результатам. Образцы рекомендуется хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 24-48 часов, для более длительного хранения необходимо замораживание. Единственное исключение — цельная кровь, которая не подлежит замораживанию.

При проведении исследований на наличие вирусов гепатитов В и С, ВИЧ и т.д. необходимо получение плазмы крови, и в этом случае возможно однократное замораживание пробы.

В настоящее время, процессы взятия материала, его предварительной обработки, хранения и перевозки, передачи исследуемого материала в другие организации осуществляются согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций, инструкциям к наборам реагентов и в соответствии с СП 1.2.036-95, СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08.

## 4.2. Ошибки аналитического этапа

### 4.2.1. Выбор системы пробоподготовки

Проведение собственно лабораторного исследования также может сопровождаться рядом ошибок, среди которых одной из основных является **неправильный выбор системы пробоподготовки**.

Возвращаясь к сказанному выше, наиболее часто в лаборатории используют следующие варианты пробоподготовки:

- Экспресс-методы – упрощенные методики, основанные на кипячении, протеолизе
- Сорбентные методы
- Методы одновременного выделения ДНК/РНК, выделение из цельной крови

Выбор метода выделения должен определяться характером биоматериала, степенью его загрязнения потенциальными ингибиторами ПЦР.

Использование экспресс-методов существенно сокращает время пробоподготовки, делает минимальными потери ДНК в процессе выделения и существенно сокращает риск кросс-контаминации, что представляется весьма привлекательным для рутинного использования в лаборатории.

Однако, существенным недостатком данной группы методов является низкая степень очистки пробы от ингибиторов, следствием чего 3-5% образцов дают недостоверные результаты в ПЦР.

При необходимости использования экспресс-методов со «сложными» образцами возможно введение дополнительных способов очистки и концентрации материала, например, в случае избытка слизи в пробе (для мокроты и эякулята, бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, трахеального смыва, синовиальной и плевральной жидкости) целесообразным является ее предварительная обработка муколитиками, типа муколизина.

Тем не менее, даже предварительная обработка материала не подходит для бактерий с крепкой клеточной стенкой и может привести к ложноотрицательным результатам в ПЦР.

В случае исследования крови на наличие вирусов, особенно относящихся к группе РНК-содержащих (ВИЧ, гепатит С и т.д.), вероятность получения ложноотрицательных результатов велика по следующим причинам: исходно низкая вирусная нагрузка и течение болезни в периоде ремиссии (концентрация вирусных частиц ниже предела чувствительности тест-системы); неравномерное распределение материала по пробиркам в дублях; нестабильность исходно выделяемой РНК; большие потери материала на этапе пробоподготовки. Повышение эффективности выделения и получение адекватных результатов ПЦР возможно при использовании гемолитика для предварительной обработки цельной крови и увеличения выхода осадка лейкоцитов.

В данном случае экспресс-методы проявляют крайне низкую эффективность, и наиболее правильным представляется использование сорбентных методов выделения или методов, позволяющих одновременно выделять ДНК/РНК. Данные методы можно определить как «универсальные». Однако для них характерно:

- длительное время выделения;
- опасность кросс-контаминации;
- потери ДНК с сорбентом;
- зависимость от качества сорбента.

#### 4.2.2. Генетическая изменчивость микроорганизмов

Вероятность получения ложноотрицательного результата может быть обусловлена **изменчивостью микроорганизмов**. При конструировании тест-системы в качестве мишени используется высоко консервативный участок генома. Однако изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке ДНК и становиться недоступными для анализа данной тест-системой.

Например, у 30% пациентов с установленным диагнозом «хламидиоз», обусловленным *C. trachomatis*, при проведении исследований методом ПЦР результат анализа был отрицательным при полном соблюдении технологии. Это обусловлено тем, что часть коммерческих тест-систем в качестве мишени использовали плазмиду патогена, тогда как патологический процесс был связан с бесплазмидными штаммами бактерий.

#### 4.2.3. Технологические ошибки

Основной ошибкой аналитического этапа при реализации метода ПЦР с детекцией результатов с помощью гель-электрофореза является **риск принять неспецифичные фрагменты за специфичные**, если они близки по длине и нет возможности сравнить с К+ и маркером длин фрагментов.

Проблемой, наиболее актуальной для лабораторий, работающих с ПЦР в формате FLASH, является **неправильное приготовление фоновых пробирок**. В первую очередь, это связано с тем, что в разных сериях реактивов могут отличаться концентрации компонентов реакционной смеси, поэтому высока вероятность различного уровня флуоресценции. Приготовление фоновых пробирок без учета серии тест-системы может привести к большому количеству недостоверных результатов.

Кроме того, при приготовлении фонов необходимо исключить добавление в них полимеразы, так как, если в тест-систему входит внутренний контроль и/или отрицательный образец проходит стадию выделения, все отрицательные значения будут недостоверными.

Еще одним фактором возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов в ПЦР с детекцией по конечной точке может быть **неправильное хранение фоновых пробирок**. Это объясняется тем, что при неправильном хранении зонды в фоновых пробирках могут разрушаться, и нормировочные значения существенно увеличиваются за срок от нескольких часов до нескольких дней, при этом значения флуоресценции в образцах оказываются в большей или меньшей степени занижены.

Главным критерием достоверности полученных результатов в данном случае могут служить отрицательные пробы. При отсутствии расхождений между фоновыми и амплификационными пробирками отрицательные образцы имеют значения флуоресценции близкие к **1** или, в редких случаях, незначительно выше.

Если значения флуоресценции в одном или нескольких образцах или отрицательном контроле существенно ниже **1**, с большой долей вероятности можно утверждать, что фоновые пробирки не соответствуют данному исследованию, в этом случае необходимо их поменять.

В случае **неправильного хранения амплификационных пробирок** (длительное пребывание пробирок при комнатной температуре) фоновая флуоресценция в них возрастает, в то время как в фоновых пробирках флуоресценция остается неизменной. В этом случае увеличивается

содержание положительных результатов с низкими значениями флуоресценции. Результаты при этом получаются такие же, как при контаминации в лаборатории, однако в данном случае все низкие значения флуоресценции будут примерно одинаковы, что в случае контаминации встречается достаточно редко, поскольку маловероятно, что во все отрицательные пробирки попадет равное количество постороннего материала.

Несмотря на очевидные преимущества метода ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, возможны ошибки аналитического этапа, обусловленные следующим: **колебанием флуоресценции в приборе**, которое может быть зафиксировано программой, как ложноположительный или ложноотрицательный результат. В этом случае необходимо провести анализ индивидуальной кривой. Пороговая линия должна пересекать индивидуальную кривую в области начала экспоненциального роста флуоресценции.

### 4.3. Ошибки постаналитического этапа

Основной проблемой постаналитического этапа является **неверная интерпретация врачом результатов ПЦР-анализа** вследствие ошибочных представлений об инфекционном агенте или о возможностях метода.

#### 4.3.1. Ошибки интерпретации результатов ПЦР

Одной из наиболее распространенных ошибок при интерпретации результатов ПЦР-анализа является **не принятие во внимание особенностей персистенции и элиминации возбудителя**. Например, назначение контрольного исследования через 1 неделю после окончания курса антибиотикотерапии ряда инфекционных заболеваний. В подавляющем большинстве случаев результат анализа на выявление микроорганизма — возбудителя инфекции будет положительным. Из этого можно сделать вывод о неэффективности проведенной терапии. Такое заключение ошибочно в силу того, что ДНК микроорганизма может сохраняться в течение нескольких недель после его элиминации и не свидетельствует о жизнеспособности. Если речь идет о микроорганизмах, ассоциированных с эпителием, окончательный вывод об излеченности, можно сделать не ранее, чем через 5–6 недель после курса антибиотикотерапии. Это срок необходим для смены эпителиального слоя.

С другой стороны, если целью анализа является оценка состояния микрофлоры урогенитального или желудочно-кишечного трактов, то назначение исследования через 1–2 недели на фоне проведенной антибактериальной терапии, скорее всего, приведет к отрицательному результату в ПЦР. В случае сбалансированной и устойчивой системы, ее самовосстановление произойдет не ранее 2 нед. — 1 месяца, тогда проведение ПЦР анализа будет информативным и позволит оценить динамику состояния, либо определить меры коррекции.

Другая ошибка — **клиническая оценка положительного результата ПЦР, определение его прогностической значимости**. Показано, что только у 40% — 60% лиц с обнаруженной в крови методом ПЦР ДНК цитомегаловируса клинически может развиваться заболевание. В данной ситуации при оценке результатов исследования, совершается типичная ошибка, заключающаяся в отождествлении двух принципиально различных понятий — «инфицированность» и «инфекционный процесс».

То же можно сказать и про ПЦР — диагностику инфекций, обусловленных ВПЧ. Метод ПЦР крайне важен с точки зрения возможности идентифицировать отдельные типы ВПЧ (высокого и низкого онкогенного риска). Однако существует большой риск интерпретировать положительный результат с точки зрения прогноза развития неопластических процессов шейки матки, хотя в 80-90 % случаев инфицирование ВПЧ носит кратковременный характер и заканчивается спонтанной элиминацией вируса (через 6-24 месяца). Положительный результат при лабораторном исследовании имеет значение, если на фоне ВПЧ — инфекции имеется картина неоплазии эпителия шейки матки, что позволяет прогнозировать степень канцерогенного риска.

Еще одной ошибкой является **неверная интерпретация результатов количественного ПЦР-анализа**. В этом случае необходимо четко определить цель назначения данного вида исследования.

Например, опубликованный в 2010 г УДК [616.36-002.12:578.891]-07/08 «Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С» регламентирует количественные исследования ДНК вирусного гепатита В и, в соответствии с рекомендациями Европейской ассоциации по изучению печени 2009 г. (EASL Clinical Practice Guidelines 2009), определяет показания для проведения противовирусной терапии HBV при наличии уровня ДНК HBV в крови более 10 000 копий/мл (2000 МЕ/мл). Сероконверсия по HBeAg в сочетании со снижением уровня ДНК HBV ниже 2000 МЕ/мл ( $10^4$  копий/мл) расценивается как достижение эффекта терапии.

Однако, проведение количественных исследований методом ПЦР для целого спектра бактериальных и вирусных инфекций на данный момент не регламентировано и не определены критерии диагностической и клинической значимости получаемых результатов. В связи с этим, интерпретация результатов исследования может носить субъективный характер и определять неверную тактику ведения пациента.

Например, количественный анализ отдельных представителей условно-патогенной флоры урогенитального тракта (*Ureaplasma*, *Gardnerella*) без учета количественных показателей ведущего представителя нормофлоры — бактерий рода *Lactobacillus* (обуславливает колонизационную резистентность, поддерживает кислую реакцию среды), а так же при отсутствии клинических проявлений воспаления, дисбиоза и жалоб пациента, может привести к гипердиагностике и необоснованному назначению антибактериальной терапии. Как следствие: стремительный рост антибиотикорезистентности, увеличение числа случаев рецидивирующего бактериального вагиноза и дисбиоза.

Аналогичная ситуация складывается и при интерпретации результатов количественного исследования ВПЧ высокого онкогенного риска. На сегодняшний день отсутствует прямое доказательство роли исходной вирусной нагрузки в развитии неопластических процессов шейки матки и прогнозировании их исхода.

Кроме того, на этапе анализа и интерпретации результатов ПЦР возникают и другие проблемы, которые можно обозначить, как **несовпадение результатов** при использовании различных методов исследования (например, ПЦР и ИФА, ПЦР и бактериальный посев, ПЦР и микроскопические методы исследования).

### 4.3.2. Сравнение результатов ПЦР и ИФА

В случае сравнения результатов, полученных в ИФА и ПЦР, несовпадения могут быть следующими:

- положительный результат в ПЦР и отрицательный результат в ИФА;
- отрицательный результат ПЦР и положительный результат ИФА.

В первом случае, и это наиболее актуально для выявления вирусов гепатита С и иммунодефицита человека, данный факт может быть обусловлен **наличием «серологического окна»**. В условиях постоянно повышающихся концентраций антигена в результате репродукции вируса происходит активное снижение концентрации антител за счёт включения их в состав иммунных комплексов «антиген-антитело». Также происходит подавление гуморального звена иммунного ответа в результате синтеза набора цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета. Как следствие, в течение инфекционного процесса наблюдается длительное «серологическое окно» от момента заражения до сероконверсии.

Обычно заметное количество антител к ВИЧ появляется в крови через 2-10 недель после заражения, однако разброс во времени может быть весьма велик. Так, у 90-95 % зараженных они обнаруживаются в течение 3-х месяцев после заражения, у 5-9 % — через 6 месяцев, а у 0,5-1 % — и в более поздние сроки.

Выявление ДНК/РНК вируса методом ПЦР позволяет уменьшить продолжительность «серологического окна» в среднем на 11 дней и обнаружить патогена уже через 1-2 недели после заражения.

Проведение ПЦР позволяет выявить РНК вируса гепатита С не только в сыворотке крови, но и в биоптате печени, что важно при подтверждении роли вируса гепатита С в формировании гепатоцеллюлярной карциномы. У подобных больных РНК вируса гепатита С регистрируется в гепатоцитах и при отсутствии anti-HCV и РНК вируса гепатита С — в сыворотке крови. У ряда больных с самоограничивающимся течением инфекции anti-HCV не появляются никогда.

Кроме того, отсутствие положительных результатов ИФА на фоне положительного результата в ПЦР может наблюдаться у иммуносупрессированных пациентов и новорожденных с перинатальной инфекцией (нетипичная картина, связанная с антителами матери). Так, при хроническом хламидиозе до 5% больных имеют титр антихламидийных антител, не превышающий критического уровня.

Аналогичная проблема может возникнуть при диагностике сифилиса, в том случае, если заболевание проходит стадию первичного серонегативного сифилиса, когда стандартные серологические реакции крови еще отрицательные (первые 3-4 недели от возникновения твердого шанкра).

При заболеваниях, передающихся половым путем, скрытый период инфекции, когда уровень иммуноглобулинов не больше нормы, составляет в среднем 14 дней.

Кроме того, важно учитывать возможность высокой генетической изменчивости микроорганизмов, которая приводит к формированию серонегативных штаммов.

При обследовании новорожденных на наличие внутриутробных инфекций может быть получен ложноотрицательный результат серологического исследования не только вследствие влияния высокой концентрации материнских антител класса IgG (маскируют наличие IgM у ребенка), но и **развития иммунологической толерантности**.

*Иммунологическая толерантность* — неспособность организма к иммунному ответу на определенный антиген. Сроки ее формирования варьируют от нескольких часов до нескольких суток, а ее длительность зависит от персистенции антигена в организме и скорости образования иммунокомпетентных клеток из их предшественников. Индукции толерантности способствует неспецифическая иммунодепрессия (в том числе, под влиянием лекарственных препаратов).

**Генетически обусловленная серонегативность** ряда заболеваний делает их недоступными для анализа стандартными серологическими методами, а при исследовании методом ПЦР обеспечивается положительный результат, например, серонегативные спондилоартриты (ССА) – заболевания, которые характеризуются поражением крестцово-подвздошных сочленений и имеют тенденцию к семейной агрегации. В группу ССА включают 10 заболеваний: идиопатический анкилозирующий спондилоартрит, псориатический артрит, болезнь Рейтера, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь Уиппла, ювенильный хронический артрит, реактивный артрит (иерсиниозный, шигеллезный, сальмонеллезный), острый передний увеит, синдром Бехчета, объединенных наличием при обследовании HLA-B27 – антигена.

Еще один вариант несовпадения результатов ПЦР и ИФА (отрицательный результат в ПЦР и положительный результат в ИФА) может быть обусловлен **выявлением «иммунологического следа»** – остаточный уровень IgG после ранее перенесенной инфекции. У некоторых людей повышенный уровень антител может сохраняться многие месяцы и годы после полного выздоровления, что связано с индивидуальными особенностями иммунной системы.

Другой причиной расхождения результатов может стать **использование родоспецифических тест-систем для ИФА**.

Например, в случае подозрений на атипичную пневмонию выбор тест-системы, выявляющей несколько видов хламидий, в первую очередь, респираторных (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*), определяет получение положительного результата. При этом, направление на анализ методом ПЦР с указанием только наиболее распространенного этиологического агента хламидийной пневмонии – *C. pneumoniae* может привести к получению отрицательного результата. Это будет связано с использованием видоспецифической тест-системы, направленной на выявление только указанного вида микроорганизма, тогда как возбудителем инфекционного процесса может быть *C. psittaci*.

Еще одним фактором несовпадения данных ПЦР и ИФА является **зависимость результатов анализа методом ПЦР от используемого материала**.

Материал для ПЦР должен быть получен из места предполагаемой локализации инфекционного и/или неинфекционного воспалительного процесса, а для получения достоверного результата ИФА данный подход не является критичным.

Например, при хламидийном сальпингите (воспаление маточной трубы) в крови пациентов будет определяться устойчивый уровень специфических антител, тогда как при анализе соскобного материала из влагалища или шейки матки методом ПЦР хламидии обнаружены не будут. Учитывая тот факт, что в 50% случаев заболевание протекает атипично интерпретация результата ПЦР как отрицательного, может привести к тяжелым последствиям, поэтому для подтверждения положительного результата ИФА и постановки диагноза показана лапароскопия (гидросальпинкс).

Тем не менее, сравнивая возможности ИФА и ПЦР в диагностике заболеваний, следует отметить, что метод **ПЦР не позволяет установить стадию инфекционного процесса**. В связи с этим, роль ИФА в интерпретации результатов исследования может быть весьма существенной, поскольку данный метод позволяет определить авидность антител.

*Авидность* — это прочность связи между антителом и антигеном, которая отражает сроки заражения и длительность инфекционного процесса. Определение индекса авидности (ИА) ниже 30-35% указывает на свежую первичную инфекцию, показатель авидности, равный или превышающий 40%, указывает на то, что в сыворотке содержатся анамнестические высоко-авидные антитела, свидетельствующие об инфекции в прошлом. ИА в интервале 31-39% может свидетельствовать о поздней стадии первичной инфекции или недавно перенесенной инфекции только при условии выявления антител в высокой концентрации.

### 4.3.3. Сравнение результатов ПЦР и микроскопии

На данный момент микроскопические методы исследования широко применяют в диагностике инфекционных болезней бактериальной этиологии, паразитарных и (реже) вирусных заболеваний.

В повседневной практике лаборатории микроскопическое исследование, как правило, используют для ускоренной ориентировочной диагностики.

Основные задачи микроскопии:

- выявление возбудителя в клиническом материале;
- ориентировочная идентификация на основе определения характерных морфологических и тинкториальных признаков микроорганизмов;
- изучение окрашенных мазков из колоний чистых культур.

Этот метод рассматривается, как самый быстрый и дешевый, его использование связано с минимальными требованиями к организации лаборатории.

Тем не менее, существует ряд ограничений в использовании микроскопии для диагностики инфекционных заболеваний:

- низкая чувствительность;
- субъективность оценки результатов;
- ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов;
- приблизительная количественная оценка.

Так, при диагностике трихомониаза микроскопический метод имеет самую низкую чувствительность: в среднем — 30% (для женщин — 50-60%, для мужчин — 10-12%), тогда как метод ПЦР достоверно определяет возбудителя в 90-96% случаев. Такие показатели микроскопии обусловлены потерей микроорганизмом характерной подвижности после извлечения во внешнюю среду.

Особенно затруднительна диагностика в случае низкотитражных препаратов или препаратов, содержащих значительное количество клеток эпителия и лейкоцитов. В очаге воспаления трихомонада часто представлена округлыми формами, напоминающими полиморфноядерные лейкоциты, кроме того, типичные морфологические признаки теряются во время фиксации и окрашивания, создавая трудность для этиологической идентификации.

Сравнение чувствительности микроскопических методов исследования и ПЦР применительно к таким микроорганизмам, как *N.gonorrhoeae* и *C.trachomatis*, свидетельствует, что в первом случае частота выявляемости патогена в микроскопии у мужчин — 80-95%, у женщин — 30-50%, а во втором — 10-12%. При этом, использование метода ПЦР дает возможность определять указанные микроорганизмы с чувствительностью более 95%.

Микроскопия микроорганизмов в нативном состоянии (главным образом фазово-контрастная) имеет ограниченное применение, главным образом, при выявлении их подвижности и изучении морфологии микроорганизмов, лишенных клеточной стенки (микоплазм и L-форм бактерий).

*L-формы* – бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Возникают спонтанно или индуцировано – под воздействием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки: антибиотиков, ферментов, ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, аминокислоты глицина.

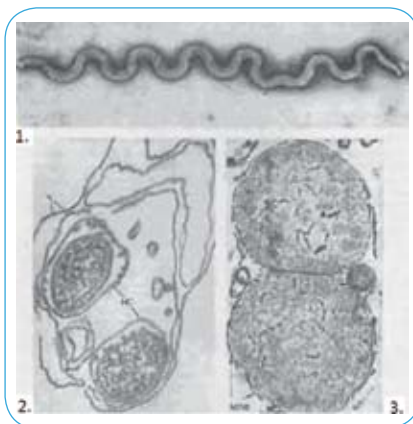
L-форма обнаружена у патогенных видов холерного вибриона, токсигенных штаммов *Clostridium tetani*, *Treponema pallidum* (рис. 9). L-формы нередко обнаруживаются в организме при таких длительно протекающих патологических процессах, как бруцеллез, септический эндокардит.

Важно учитывать, что существенным ограничением микроскопических исследований является также использование их для количественного анализа. Например, анализ состояния биоценоза урогенитального тракта предусматривает количественное определение широкого спектра условно-патогенных аэробных и анаэробных микроорганизмов, для которых доказана роль в развитии воспалительных процессов органов малого таза на фоне снижения количества ключевого представителя нормофлоры – бактерий рода *Lactobacillus*.

Традиционно при световой микроскопии выявляют не более 10 морфотипов: *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., *Fusobacterium* spp., *Leptotrichia* spp., *Veillonella* spp., *Candida* spp. При этом морфотипы факультативно-анаэробных бактерий, обнаруживаемых в мазках, морфологически однотипны у многих видов и родов бактерий – колиформные палочки или грамположительные кокки.

Например, *Atopobium vaginae* не имеет специфических микроскопических признаков, как *G.vaginalis* и *Mobiluncus* spp., и выглядит под микроскопом как обычная коринобактерия, довольно часто встречающаяся у здоровых женщин. При этом данный микроорганизм является одним из основных факторов развития рецидивирующего бактериального вагиноза и его осложнений.

Кроме того, при микроскопии мазков можно выявить микроорганизмы, присутствующие в биоматериале в количестве, обычно превышающем  $10^5$  КОЕ/мл, тогда как многие факультативно-анаэробные и аэробные бактерии могут проявлять патогенный эффект при сравнительно небольшом их количестве (до  $10^4$  КОЕ/мл), которое не выявляется при микроскопии. Поэтому диагностическая ценность микроскопического исследования вагинального отделяемого резко снижается.



**Рис. 9.** *Treponema pallidum*,  
штамм Никольса (1),  
индуцированная трепонема (2),  
ультраструктура L-форм трепонемы (3).

В связи с этим возникает существенная проблема по установлению этиологии воспалительного процесса/дисбиоза, определению тактики ведения пациента и, как следствие, наблюдается увеличение числа рецидивов.

Результаты, полученные методом ПЦР, в данном случае отличаются высокой специфичностью и чувствительностью, поскольку позволяют избежать субъективной оценки морфотипов и их количества, не зависят от тинкториальных особенностей исследуемых микроорганизмов. Кроме того, появляется возможность дифференцировки процесса: аэробный/анаэробный дисбиоз, дисбиоз смешанного генеза и определение наиболее эффективных в каждом отдельном случае терапевтических или коррекционных мероприятий.

#### 4.3.4. Сравнение результатов ПЦР и культурального метода

Культуральный метод, наряду с микроскопией микроорганизмов, входит в «золотой стандарт» диагностики. Объективными причинами тому являются:

- возможность обнаруживать все живые микроорганизмы, которые могут вырасти;
- возможность определять антибиотикоустойчивость.

Но в применении культурального метода существуют не менее объективные ограничения:

- длительные сроки культивирования — от 5 дней до 2-х месяцев;
- повышенные требования к транспортировке и хранению материала;
- отсутствие возможности культивирования большинства анаэробов;
- невозможность выявлять некультивируемые формы микроорганизмов;
- повышенные требования к лаборатории.

Существует несколько общих условий взятия материала для проведения исследований с помощью культурального метода. Пробы берут до начала антибактериальной терапии или после выведения антибактериального препарата из организма. Если исследование необходимо провести в период лечения, то при посеве материала в него добавляют ингибитор препарата (например, пенициллиназу в случае применения бета-лактамого антибиотика).

Количество материала должно быть достаточным для проведения анализа. Материал, полученный от больных с хроническими вялотекущими инфекционными процессами, содержит меньше микроорганизмов, чем при остром процессе, поэтому для выделения возбудителя требуется большее его количество.

Транспортировку материала для исследования осуществляют в предельно сжатые сроки. Охлаждение материала в холодильнике при температуре 4°C (или на льду) позволяет увеличить время до начала исследования на 30–60 мин. Более длительное хранение может привести к гибели возбудителей или изменению количественных соотношений компонентов микрофлоры.

Поэтому в случаях, когда хранение и транспортировка длятся более суток, используют консервант или транспортные (поддерживающие, накопительные) среды и специальные средства, сохраняющие жизнедеятельность микроорганизмов. Так, для транспортировки образцов материала, предназначенных для выделения анаэробных бактерий, применяют герметизированные флаконы или пробирки, заполненные бескислородным газом.

В некоторых случаях посев необходимо производить *ex tempore* (при коклюше, менингококковой инфекции, дизентерии). Методы, позволяющие провести посев материала у постели больного, значительно повышают вероятность выделения возбудителя.

При соблюдении перечисленных требований чувствительность культурального метода, например, при диагностике гонореи у мужчин, составляет – 95-98%, тогда как у женщин – не более 80-85%. В случае выявления трихомонады – 70-85%, *C.trachomatis* – 60-80%. Во всех перечисленных случаях метод ПЦР демонстрирует чувствительность не менее 95-98%.

Метод ПЦР особенно эффективен при выявлении труднокультивируемых, некультивируемых, требующих сложной питательной среды и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях.

*Некультивируемыми* называют такие формы микроорганизмов, которые в ответ на действие неблагоприятных факторов прекращают рост на питательных средах, но сохраняют жизнеспособность, а при улучшении условий культивирования возобновляют пролиферацию. В настоящее время известно около 45 видов микроорганизмов, относящихся к 30 родам, у которых обнаружена некультивируемая форма. Из них 30 видов – патогенны для человека, 15 видов – условно-патогенны или являются зубионтами человека, животных или растений. Среди бактерий есть возбудители таких инфекций, как чума, холера, туляремия, легионеллез, шигеллез, сальмонеллез.

Достаточно часто наблюдаются расхождения результатов культурального метода и ПЦР на этапе количественной оценки компонентов сложных систем, таких, как биоценозы. Это вполне объяснимо с точки зрения невозможности синхронизировать рост микроорганизмов – компонентов биоценоза – и определить их соотношения в единицу времени. Кроме того, основные этиологические агенты анаэробных дисбиозов не культивируются в стандартных лабораторных условиях, что искажает картину при анализе состояния микрофлоры того или иного биотопа.

Таким образом, можно заключить, что несовпадение результатов между различными лабораторными методами исследования и ПЦР – достаточно распространенная ситуация, которая обоснована пределами чувствительности методов, поставленными задачами и квалификацией специалиста. Проведенная в зарубежных исследовательских центрах оценка чувствительности различных методов диагностики показала, что экспресс-тесты, имеют чувствительность 40-60%, ИФА-50-70 %, прямая иммунофлуоресценция – 55-75%, культуральное исследование – 60-80%, а ПЦР – 90-100 %.

Потенциально высокая чувствительность полимеразной цепной реакции делает совершенно необходимым особенно тщательное устройство ПЦР-лаборатории. Это связано с наиболее острой проблемой метода – контаминацией.

## 4.4. Контаминация

**Контаминация** – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул нуклеиновых кислот, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Основными видами контаминации являются:

- *Перекрестная контаминация* – кросс-контаминация (от пробы к пробе) происходит в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси и приводит к появлению спорадических ложноположительных результатов
- *Контаминация продуктами амплификации (ампликонами)*, имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются продуктами для реамплификации.
- *Контаминация следовыми количествами ампликонов* лабораторной посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории, что приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Основными правилами предотвращения контаминации в лаборатории ПЦР являются:

- Разделение функциональных рабочих зон
- Соблюдение поточности и направления движения анализируемых образцов
- Отдельные лабораторные халаты в каждой рабочей зоне
- Одноразовые перчатки без талька
- Наконечники для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля
- Одноразовые пластиковые пробирки, посуда, наконечники
- Химическая и УФ дезинфекция всех поверхностей рабочих зон.

Существует несколько способов борьбы с контаминацией.

Одним из этих способов является использование фермента N-урацил-гликозилазы (УГ). В основе этого метода лежит способность УГ расщеплять молекулы ДНК со встроенным урацилом. Реакцию амплификации проводят с использованием смеси дНТФ, в которой дТТФ заменен на дУТФ (урацил), и после термоциклирования все образующиеся в пробирке ампликоны будут содержать урацил. Если до амплификации в реакционную смесь добавить УГ, то попавшие в реакционную смесь ампликоны будут разрушены, тогда как нативная ДНК останется целой и будет в дальнейшем служить мишенью для амплификации.

Другим способом инактивации ампликонов служит фотохимическое воздействие на молекулы ДНК. Для этого используют псорален или изопсорален, которые активируются кратковременным облучением ультрафиолетовым светом. Модифицированные этими соединениями молекулы ДНК не могут участвовать в реакции амплификации.

Однако, как известно, ни одна биологическая или химическая реакция не идёт со 100%-ной эффективностью и, соответственно, после инактивации продуктов амплификации из миллиардов копий амплифицированного фрагмента хотя бы несколько останутся целыми, что существенно снижа-

ет ценность такого подхода. Кроме того, всегда остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе пробоподготовки. Таким образом, оба эти метода лишь в некоторой степени позволяют устранить источник контаминации и не гарантируют отсутствия ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Есть третий способ борьбы с результатами контаминации, рассматриваемый скорее как казусный — значительное уменьшение количества циклов реакции (до 25–30 циклов). Но даже при таком подходе риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов велик.

Наиболее радикальным подходом для решения этой проблемы, является использование флуоресцентных методов детекции, которые позволяют регистрировать результаты анализа, *не открывая пробирки*. Тем самым исключается этап электрофореза — основной источник контаминации.

Для уверенности в отсутствии контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать отрицательными контролями. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать воду из комнаты пробоподготовки (после каждого десятого клинического образца желательно обрабатывать вместо биологического образца пробирку с водой).

Все реактивы рекомендуется хранить отдельными порциями (аликвоты).

Если, несмотря на принятые меры, обнаружены следы контаминации, то все используемые порции реактивов следует заменить на новые, а все поверхности помещения, оборудования, пипетки и пр. обработать дезинфицирующими препаратами.

Порядок обеззараживания и утилизации отработанного исследуемого материала и отходов после проведения исследований, а также действия при контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами и ампликонами регламентированы МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Согласно этим указаниям:

- Каждую зону лаборатории обрабатывают сотрудники, работающие в ней.
- Для обработки каждой зоны используют отдельный набор уборочного инвентаря
- Каждую зону лаборатории разбивают на участки уборки
- Обработку проводят от участка к участку последовательно. Каждый участок обрабатывают отдельной ветошью. Перед обработкой готовят моющие и дезинфицирующие растворы.
- Поверхности каждого участка вначале обрабатывают моющим раствором для удаления жировых загрязнений, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой.
- Затем на поверхность наносят на 30 мин 0,2%-ный раствор ДП-2Т или аналогичные ему растворы, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке. Остатки дезинфицирующего средства тщательно удаляют ветошью, смоченной водой.
- После завершения указанной обработки проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 45 мин.
- По завершении деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие нуклеиновых кислот и (или) ампликонов возбудителей инфекционных заболеваний, диагностика которых наиболее часто осуществляется в данной лаборатории, с учетом длины специфических фрагментов амплификации нуклеиновых кислот возбудителей, указанных в инструкциях по применению к набору реагентов.

- В случае получения в образцах смывов положительных результатов амплификации, обработку повторяют.
- Загрязненный расходный материал (пробирки, наконечники, реактивы и т.п.) и контаминированный рабочий исследуемый материал (кроме исходного материала) обеззараживают через автоклавирование. Инактивацию биологического материала проводят в автоклаве в течение 1 часа при 1,5 атм.
- Проведение работ связанных с амплификацией нуклеиновых кислот до завершения деконтаминационных мероприятий в лаборатории не допускается.

Тем не менее, проблема контаминации остается актуальной для большинства учреждений, использующих метод ПЦР в рутинной работе, поэтому наиболее принципиальным моментом является правильная организация лаборатории.

## 5. Устройство ПЦР-лаборатории

На данный момент организация ПЦР-лаборатории регламентирована Методическими указаниями (МУ 1.3. 2569 -09) «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Согласно данным МУ лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений, количество которых определяется используемыми МАНК:

- приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала (Рабочая зона 1);
- выделения нуклеиновых кислот (Рабочая зона 2 или «чистая» зона);
- проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридационно – флуоресцентного метода детекции (Рабочая зона 3);
- учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и (или) гибридационно – ферментным методом детекции (Рабочая зона 4-1);
- учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и (или) на ДНК-чипах (Рабочая зона 4-2)

При детекции методом гибридазации в процессе амплификации возможно совмещение Рабочей зоны 2 и Рабочей зоны 3 в одном помещении при наличии в нем отдельных боксов биологической безопасности II или III класса для каждой из рабочих зон. Детектирующие приборы размещают в смежных с чистой зоной помещениях, и все операции могут быть выполнены одним сотрудником

Рабочие зоны 4-1 и 4-2 располагают изолировано от Рабочих зон 1-3 для предотвращения их контаминации продуктами амплификации через воздушный поток. Выполнение работ в этих зонах должно осуществляться отдельным персоналом, не задействованным на других этапах проведения анализа.

Помещения лаборатории должны быть боксированными (боксы с предбоксами) и оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией (в соответствии с СП 1.3.1285-03 и (или) СП 1.3.2322-08), водопроводом, канализацией, электричеством и отоплением.

В состав лаборатории могут быть включены вспомогательные помещения (комнаты персонала, раздевалки для сотрудников, комната приема пищи, подсобные (складские) помещения), которые должны быть вынесены за пределы рабочей зоны в соответствии с действующими санитарными правилами, регламентирующих обеспечение безопасности работ с микроорганизмами I-IV группы патогенности.

Передачу исследуемого материала в Рабочую зону 1 и проб при смежном расположении помещений Рабочих зон 1, 2, 3 желательно осуществлять через шлюзовые передаточные окна, а в Рабочие зоны 4-1 и 4-2 – через передаточные окна.

Запрещается внесение пробирок с положительными контролями или клиническими образцами в комнату подготовки реакционной смеси («чистую» зону) как до, так и после их обработки.

В помещениях рабочих зон должны быть установлены бактерицидные лампы, режим работы которых регламентирован Р 3.5.1904-04. М.: 2005.

При исследовании материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами I-IV групп патогенности, все манипуляции в Рабочих зонах 1 и 2, включая манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозоля (встряхивание, центрифугирование и т.д.) при обработке материала и выделении нуклеиновых кислот, выполняют в боксах биологической безопасности II или III класса.

Каждая самостоятельная рабочая зона должна быть оснащена минимальным набором соответствующего лабораторного оборудования в зависимости от их функционального назначения и риска контаминации, необходимым комплектом мебели, пластиковой и стеклянной посуды, расходных материалов, защитной одежды и уборочного инвентаря, используемых только в данном помещении.

Таким образом, соблюдение правил организации лаборатории, использующей в рутинной работе молекулярно-генетические методы исследований, а также алгоритма работы с методом ПЦР способствует существенному повышению качества работы и позволяет реализовать современные технологии лабораторной диагностики.

## 6. Перспективы практического использования ПЦР-диагностики

На данный момент метод ПЦР широко используется в следующих отраслях:

### 1. Медицина, система санитарно-эпидемиологического контроля

— диагностика инфекций:

- особо опасные и социально значимые инфекции;
- эпидемические инфекции;
- гемотрансмиссивные инфекции;
- оппортунистические инфекции;
- TORCH-инфекции;
- исследование биоценозов;

— диагностика иммунных патологий

— генетические исследования наследственных заболеваний

— определение ГМИ пищевых продуктов

### 2. Ветеринария и растениеводство

— инфекционные заболевания

— определение видовой принадлежности

### 3. Наука

— геномная инженерия, микробиология, генетика и др.

### 4. Промышленность

— определение биологического загрязнения (санитарный контроль)

### 5. Судебная медицина

— идентификация личности

## 6.1. Диагностика инфекций

### 6.1.1. Социально значимые заболевания

Согласно Постановлению Правительства Российской Федерации от 1 декабря 2004 г. N715 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих», в соответствии со статьей 41 Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан, перечень социально значимых заболеваний включает:

- туберкулез (код по МКБ-10 A 15 – A 19);
- инфекции, передающиеся преимущественно половым путем (A 50 – A 64);
- гепатит В (B 16; B 18.0; B 18.1);

- гепатит С (В 17.1; В 18.2);
- болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) (В 20 – В 24);
- злокачественные новообразования (С 00 – С 97);
- сахарный диабет (Е 10 – Е 14);
- психические расстройства и расстройства поведения (F 00 – F 99);
- болезни, характеризующиеся повышенным кровяным давлением (I 10 – I 13.9).

## Диагностика туберкулеза

На данный момент отмечается значительный рост заболеваемости туберкулезом во всем мире: каждый год регистрируют около 8 млн. новых случаев этого тяжелого заболевания, около 3 млн. человек каждый год умирает от туберкулеза.

ПЦР в настоящее время является одним из наиболее важных диагностических инструментов исследования нуклеиновых кислот. ПЦР, по сравнению с рутинными методами, обладает более высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет проводить прямое определение микроорганизмов непосредственно в клиническом материале без получения чистой культуры возбудителя.

Такой подход является наиболее информативным при диагностике внутриклеточных паразитов и медленно растущих микроорганизмов, требующих сложных условий культивирования, например, *Mycobacterium tuberculosis*.

Важной стороной контроля за распространением инфекции является типирование штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) как внутри стационаров, так и внутри определенных географических регионов.

Рутинная диагностика и типирование микобактерий туберкулеза микробиологическими методами занимают от 3 недель до 3 месяцев, что негативно сказывается на эффективности терапии.

Кроме того, изменился характер течения болезни: с каждым годом наблюдается рост случаев первичного туберкулеза, вызванного штаммами, устойчивыми к одному или нескольким антимикобактериальным препаратам. Лечение таких больных невозможно по обычным схемам антибиотикотерапии, инфекционный процесс часто протекает тяжело и скоротечно.

В связи с этим существует острая необходимость выявления резистентных штаммов.

Исследования лекарственной устойчивости к основным антимикобактериальным препаратам – изониазиду и рифампицину – выявили, что резистентность к изониазиду обусловлена мутацией в гене *katG* фермента каталазы-пероксидазы, способствующей переходу действующего вещества в активную форму.

Развитие лекарственной устойчивости микобактерий к рифампицину в 97% случаев связано с мутацией гена *groV* бета-субъединицы РНК-полимеразы. Известно, что рифампицин связывается ДНК-зависимой РНК-полимеразой, блокируя процесс транскрипции и тормозя жизнедеятельность микобактерий.

При назначении больным с первичной устойчивостью к изониазиду и рифампицину стандартного режима химиотерапии к концу курса лечения у них может возникнуть резистентность и к пиразинамиду, и к этамбутолу.

У 60% штаммов МБТ, резистентных к этамбутолу, наблюдается изменение в аминокислотном составе в положении 306 гена *embB*, который кодирует фермент арабинозилтрансферазу.

Известно о молекулярных основах лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам второй линии – этионамиду и фторхинолонам.

Этионамид и изониазид обладают кросс-резистентностью – состоянием, при котором наблюдается генетически обусловленная лекарственная устойчивость к нескольким препаратам одновременно. Резистентность к этионамиду может встречаться у больных туберкулезом, никогда не получавших этионамид, если МБТ, выделенные у этих больных, устойчивы к изониазиду.

Фторхинолоны угнетают синтез ДНК в результате связывания с бактериальной топоизомеразой II. У штаммов МБТ, устойчивых к фторхинолонам, были выявлены мутации в *gyrA*-гене, кодирующей второй тип ДНК топоизомеразы – ДНК-гиразу.

Представленные данные явились основой для разработки тест-систем для выявления антибиотикорезистентности МБТ методом ПЦР. Данный подход внедряется в рутинную практику лабораторий, что позволяет существенно сократить сроки проведения анализа и своевременно определить тактику терапии.

Подобный подход оправдывает себя и при определении антибиотикорезистентности целого ряда микроорганизмов – *возбудителей нозокомиальных инфекций* (*S.aureus* и коагулазонегативные стафилококки, *Enterococcus* spp., Семейство *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.).

### **Инфекции, передающиеся половым путем (ИППП)**

*ИППП* – инфекции, передаваемые половым путем, включают *T. pallidum*, *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitallium*, *M.hominis*, *U. urealyticum*, *U.parvum*, *HSV2*, *HPV*, *T.vaginalis*, *Candida* и др.

Большинство вышеперечисленных инфекций протекает со схожей симптоматикой, либо (в случае *M. genitallium*) вообще не имеет патогномичных симптомов, возможно затяжное, хроническое течение, что приводит к развитию осложнений (воспалительные заболевания органов малого таза, нарушение репродуктивной функции, осложнения в процессе беременности и др.).

Метод ПЦР позволяет определить этиологию инфекционного процесса, определить количество возбудителя, что актуально для условно-патогенных микроорганизмов, которые вызывают патологию только при определенных условиях (например, при повышении концентрации на фоне снижения количества нормофлоры), осуществить контроль за течением инфекционного процесса и оценить эффективность лечения.

Благодаря своей высокой чувствительности, ПЦР позволяет выявлять возбудителя даже при минимальном его содержании. Особенно это актуально при бессимптомном течении инфекционного процесса, вызванного безусловно-патогенными микроорганизмами (гонорея, трихомониаз, хламидийная инфекция).

### **6.1.2. Особо опасные и эпидемические инфекции**

*Особо опасные инфекции* – согласно Международным медико-санитарным правилам (ММСП) ООИ – это «инфекционные заболевания, которые вошли в перечень событий, что могут являть собой чрезвычайную ситуацию в системе охраны здоровья в международном масштабе».

Приложение № 2 ММСП-2005 определяет перечень таких инфекций, разделенный на две группы. Первая – «болезни, которые являются необычными и могут оказать серьезное влияние на здоровье населения»: оспа, полиомиелит, вызванный диким полиовирусом, челове-

ческий грипп, вызванный новым подтипом, тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) или (SARS).

Вторая группа – это «болезни, любое событие с которыми всегда оценивается как опасное, поскольку эти инфекции обнаружили способность оказывать серьезное влияние на здоровье населения и быстро распространяться в международных масштабах»: холера, легочная форма чумы, желтая лихорадка, геморрагические лихорадки лихорадка Западного Нила.

На данный момент складывается достаточно неблагоприятная эпидемическая ситуация по инфекциям, которые ранее имели эндемический характер. Завезение инфекций извне прибывающими лицами приводит к тому, что потенциальные источники инфекции оказываются неизолированными и в течение длительного времени имеют многочисленные контакты с окружающими их лицами.

В связи с этим для своевременного принятия противоэпидемических мер, наиболее актуальным является использование экспресс-методов, которые должны удовлетворять следующим характеристикам:

- получение результатов анализа в максимально короткие сроки;
- возможность проведения и завершения анализа без выделения искомого микроорганизма в чистой культуре при использовании только нативного материала;
- бесспорно высокие специфичность и высокая чувствительность, как предпосылки надлежащей достоверности анализа;
- высокая производительность, простота, доступность и воспроизводимость анализов.

Метод ПЦР полностью удовлетворяет перечисленным требованиям, в связи с чем, согласно Приказам Роспотребнадзора от 03.07.2006 г. № 14 «Об обеспечении мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации»; от 17.03.2008 г. № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» и Постановлению Главного государственного врача РФ Г.Г. Онищенко от 05.09.2005 г. № 21 «О совершенствовании государственного санитарно-эпидемиологического надзора по противодействию угрозе биотерроризма», он был признан обязательным методом ускоренной диагностики для индикации и лабораторной диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы в клиническом материале и пробах из объектов окружающей среды.

### 6.1.3. Гемотрансмиссивные инфекции

Применительно к диагностике *гемотрансмиссивных инфекций*, метод ПЦР приобрел свою значимость в первую очередь в службах крови.

В 1995 году по инициативе Национального института биологической стандартизации и контроля Великобритании (NIBSC) при Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) была создана рабочая группа SoGAT, целью которой был обмен опытом по внедрению в службе крови и других областях генотестирования наиболее трансфузионно-опасных вирусов – ВИЧ, вирусов гепатитов В, С, А, парвовируса и других.

Опыт применения генотестирования показал его эффективность при выявлении доноров-вирусоносителей, особенно в серонегативном периоде, и с июля 1999 года в странах Европейско-

го союза генотестирование стало обязательным для всей донорской крови и плазмы. На данный момент, метод ПЦР решает следующие задачи службы крови:

- обеспечение инфекционной безопасности в период «серонегативного окна»;
- обеспечение информацией об отсутствии инфекционных агентов в крови или ее компонентах при неопределенных результатах обычных иммуноферментных анализов,
- обеспечение выявления истинных вирусоносителей среди серопозитивных лиц;
- генотипирование — определение на уровне генома антигенов лейкоцитов и тромбоцитов (HLA, HPA).

Рассматривается целесообразность перехода к генетическому определению группы крови и резус-принадлежности. Использование ПЦР с точки зрения определения вирусной нагрузки рассматривалась ранее.

Генотипирование гепатита С приобретает все большую актуальность с точки зрения прогноза развития заболевания и тактики ведения пациента. Это обусловлено тем, что HCV отличается высокой изменчивостью и наличием нескольких вариантов генотипа. Для клинической практики наиболее важно разграничивать 5 субтипов HCV: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a.

Так у пациентов с субтипом 1b хронизация HCV-инфекции происходит в 90% случаев, в то время как с генотипами 2a и 3a — в 33-50%. Инфицирование генотипом 1b сопровождается более тяжелым течением заболевания, развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Пациенты с субтипом 3a имеют более выраженный стеатоз и поражения желчевыводящих путей, а также более высокий уровень АлАТ, чем пациенты с HCV генотипа 1b, при этом уровень фиброза более выражен у пациентов с вирусом субтипа 1b. При монотерапии интерфероном устойчивый ответ наблюдается у 18% пациентов, инфицированных HCV субтипа 1b, и у 55%, инфицированных другими генотипами. При комбинированной схеме лечения (интерферон + рибавирин) стойкий ответ наблюдается у 28% пациентов, инфицированных HCV субтипа 1b, и у 66% пациентов, инфицированных другими генотипами.

### 6.1.4. Оппортунистические инфекции (ОПИ)

Оппортунистические инфекции — заболевания, вызываемые патогенами, которые обычно не приводят к болезни у здоровых людей (с нормальной иммунной системой). Наиболее распространенными возбудителями являются: вирусы (ЦМВ, вирус Эпштейна — Барр), бактерии (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *C. difficile*), грибы (*C. albicans*, *Aspergillus* sp., *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*), простейшие (*T. gondii*, *Cryptosporidium*).

Клинические особенности оппортунистических инфекций:

- протекают с опасной для жизни пациента остротой;
- имеют тенденцию к диссеминации возбудителя с обнаружением его в эктопических очагах;
- слабо поддаются специфической терапии, имеют тенденцию к множественным рецидивам;
- к этим инфекциям развивается слабый специфический иммунный ответ.

Несмотря на то, что в последние годы настороженность к ОПИ повысилась у врачей всех специальностей, их своевременная диагностика составляет не более 30% от реальных показателей заболеваемости.

В этих условиях для выбора тактики ведения пациента принципиально важными стали: ранняя диагностика процесса; определение наличия микстинфекции; смены возбудителя в процессе течения заболевания; выделение ведущего этиологического фактора в формировании патологии на конкретном этапе; назначение адекватной терапии и оценка её эффективности.

На данный момент, метод ПЦР позволяет решить поставленные задачи, главным образом, благодаря высокой чувствительности и специфичности, возможности дифференцировать возбудителей микстинфекций, а также высокой скорости проведения анализа: в течение 3-5 часов с момента получения лабораторией образца до выдачи результатов врачу-клиницисту.

### 6.1.5. TORCH – инфекции

*TORCH – инфекции* – комплекс включает в себя следующие инфекции: токсоплазмоз (*Toxoplasmosis*); другие инфекции, из которых считаются абсолютно доказанными: хламидиоз, сифилис, гепатиты А и В, гонококковая инфекция, листериоз (**O**thers); краснуху (**R**ubella); цитомегаловирусную инфекцию (**C**itomegalia); простой герпес (**H**erpes Symplex). Важной особенностью инфекций этой группы является то, что симптомов может не быть или они могут быть мало выражены. В это время инфекция будет пагубно влиять на состояние плода и на течение беременности.

Для того чтобы оценить насколько благоприятно будет протекать беременность, важно установить не столько наличие или отсутствие инфекции, сколько стадию, на которой она находится. Основным методом является серологическая диагностика (ИФА), где индикаторами первичной инфекции являются специфические антитела IgM, тогда как IgG могут свидетельствовать только об уже произошедшем контакте человека с инфекцией.

Тем не менее, в случае первичного заражения во время беременности оценка риска развития внутриутробной инфекции в перинатальный период возможна только методом ПЦР. Серодиагностика малоэффективна для определения инфекций, поскольку основана на выявлении антител, а в этот период организм ребенка может или вообще не вырабатывать антитела, или «принимать» материнские антитела класса IgG, проникающие к ребенку через плаценту.

## 6.2. Генетические исследования

Одним из наиболее перспективных направлений ПЦР-диагностики являются генетические исследования, а именно:

- мутации, обуславливающие наследственные заболевания;
- полиморфизмы, ассоциированные с предрасположенностью к мультифакторным заболеваниям;
- онкогенетика;
- фармакогенетика;
- HLA-типирование;
- иммуногенетика;
- нарушения метаболизма и т.д.

Согласно классификации, основанной на характере изменения структуры отдельных генов, хромосом и генома в целом различают следующие виды мутаций:

- геномные;
- хромосомные;
- генные.

С точки зрения возможностей ПЦР, наибольший интерес представляют генные мутации, связанные с заменой, делецией или инверсией одного или нескольких нуклеотидов. В том случае, когда под действием мутации изменяется лишь один нуклеотид, говорят о *точечных мутациях*.

*Генетический полиморфизм* — сосуществование в пределах популяции двух или нескольких различных наследственных форм, находящихся в динамическом равновесии в течение нескольких и даже многих поколений.

*Однонуклеотидный полиморфизм* (англ. *Single nucleotide polymorphism, SNP*) — отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, Г или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом индивида.

Последние тенденции развития ПЦР-диагностики связаны с исследованиями SNP.

Особую актуальность данные исследования приобретают в свете возможности использования молекулярно-генетических методов для профилактики и борьбы с неинфекционными заболеваниями (НИЗ), в первую очередь, раком, сердечно-сосудистыми, респираторными заболеваниями, сахарным диабетом. На их долю приходится около 80% всех случаев смерти в группе НИЗ и более чем 60% летальных случаев (36 млн. человек в год) во всем мире.

ВОЗ прогнозирует, что при бездействии уже в 2030 году от НИЗ умрут 52 млн. человек, при этом экономические потери составят в среднем 47 триллионов долларов.

В связи с этим в 2011 г. Генеральной Ассамблеей ООН принята Политическая декларация по профилактике и борьбе с неинфекционными заболеваниями — единая международная стратегия по борьбе с НИЗ на долгосрочную перспективу, которую поддержали 150 государств, в том числе Россия.

На данный момент активно разрабатываются и вводятся в рутинную практику наборы реагентов, направленные на выявление точечных мутаций и полиморфизмов в генах супрессоров клеточной пролиферации BRCA 1 и 2 и системы апоптоза (FAS, FASLG, TP53, TNF, IL1B, BAT3); факторов клеточного цикла (гены CCND1, CHEK2, PPARG, APC, MDM2, FGFR2, RAD5); генов системы детоксикации (CYP1A1, CYP19A2, CYP1B1, CYP2D6, CYP3A43, ABCB1, GSTP1, NAT2, SULT1A1) и репарации ДНК (ATM, XRCC1, XRCC3, OGG1, MLH1, MSH2, PARP1), инактивация которых приводит к неконтролируемому делению клеток и возникновению злокачественной опухоли.

Подобный анализ позволяет определить группу риска, особенно в случае отягощенного семейного анамнеза, порядок наблюдения носителей указанных полиморфизмов и скорректировать тактику ведения пациента в случае выявленного онкологического процесса.

Применительно к мультифакторным заболеваниям генетическое тестирование уже сегодня позволяет отнести человека к группе риска той или иной хронической патологии (тромбофилии, паркинсонизму, сердечно-сосудистым заболеваниям, остеопорозу, бронхиальной астме, эндометриозу и т.д.)

Например, *анализ полиморфизмов генов системы гемостаза* (факторов свертывающей системы F2, F5, F7, F13A1, FGB, системы фибринолиза SERPINE1, тромбоцитарного звена ITGA2, ITGB3) позволяет определить риск развития тромбофилических состояний при наступлении беременности, массивном хирургическом вмешательстве, на фоне применения гормональной контрацепции или гормональной заместительной терапии у женщин и т.д.

Подобный анализ обоснован в случаях наследственной тромбоэмболии, осложненного акушерского анамнеза, при профилактике тромботических осложнений у больных злокачественными новообразованиями.

Выявление факторов риска позволяет своевременно принять меры по профилактике тромбозов, инфаркта миокарда и ишемического инсульта, позволяет снизить риск репродуктивных потерь.

Не менее интересным направлением является *анализ полиморфизмов, ассоциированных с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний*.

В России повышенный уровень артериального давления встречается среди мужчин в 39,2% случаев, женщин – 41,1%, при этом в 12-15% развивается стойкая артериальная гипертензия (АГ). Она лежит в основе таких грозных заболеваний, как инфаркт миокарда и острое нарушение мозгового кровообращения (в России регистрируется до 400 тыс. инсультов в год). Продолжительность жизни пациентов среднего возраста, страдающих АГ, не превышает 20-30 лет, а при высоком риске – 10 лет. Поэтому для улучшения качества жизни необходимы ранняя диагностика и своевременно начатое лечение.

Гипертоническая болезнь – мультифакторное заболевание, в основе которого лежит генетический полигенный структурный дефект, обуславливающий высокую активность прессорных механизмов длительного действия.

Наибольший интерес представляют гены факторов, участвующих в процессе поддержания сосудистого тонуса, регуляции водно-солевого баланса, в первую очередь, относящихся к ренин-ангиотензиновой системе (ADD1, AGT, ACE, AGTR1, AGTR2, CYP11B2, GNB3, NOS3 и т.д.).

Использование ПЦР-анализа для выявления полиморфизмов указанных генов позволяет предположить риск развития АГ, скорректировать образ жизни пациентов в группе риска и своевременно назначить терапевтические мероприятия.

Следует отметить, что анализ SNP, проводимый последние годы, выявил, что риск развития многих мультифакторных заболеваний возрастает при определенных вариантах генома. Данные таких исследований обобщаются в базе Genome-wide association study (GWAS), которая позволяет выбирать наиболее информативные полиморфизмы, ассоциированные с заболеванием, и формировать панель для конкретной нозологии.

Важным фактором является и то, что риск развития заболевания определяется популяционной вариабельностью, то есть зависит от того, к какой популяции относится обследуемый (возможны противоположные эффекты одного и того же полиморфизма в пределах разных популяций). В связи с этим запущен международный проект человеческого вариома (<http://www.humanvarionproject.org/>).

Особое внимание следует уделить роли ПЦР-анализа в изучении иммунной системы, в первую очередь, *типирование HLA*.

*HLA* (от англ. *Human Leucocyte Antigens*) – система генов тканевой совместимости человека – группа антигенов гистосовместимости, связанных с иммунной системой человека.

*Молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (A, B, C) представляют пептиды из цитоплазмы на поверхности клетки. Молекулы этого класса присутствуют на поверхности всех типов клеток, кроме эритроцитов и клеток трофобласта.*

*Молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (DP, DM, DOA, DOB, DQ, DR). Молекулы этого класса находятся на поверхности антигенпрезентирующих клеток: дендритных клеток, макрофагов, В-лимфоцитов.*

*Молекулы главного комплекса гистосовместимости III класса кодируют компоненты системы комплемента, белков, присутствующих в крови.*

Типирование генов HLA II класса является обязательным исследованием для подбора донора при трансплантации органов. Кроме того, некоторые аллельные варианты генов HLA II класса ассоциированы с повышенным риском ряда заболеваний (сахарный диабет I типа (СД1), ревматоидные заболевания, аутоиммунный тиреоидит, восприимчивость к инфекционным заболеваниям и др.). Типирование генов HLA II класса применяется для диагностики некоторых форм бесплодия и невынашивания беременности, которые могут быть следствием высокой гомологии генов HLA II класса в супружеской паре при полной фертильности партнёров.

Проблема раннего невынашивания беременности при отсутствии аномалий кариотипа чаще всего имеет иммунологическую природу. В настоящее время все больше исследователей приходят к выводу о тесной взаимосвязи и взаиморегуляции между эндокринной и иммунной системами, реализующейся в эндометрии на ранних этапах имплантации.

В частности, сенсибилизация беременных к отцовским HLA-антигенам плода, сходство супругов по HLA, присутствие в HLA-фенотипе родителей определенных антигенов приводит к спонтанным выкидышам, тяжелым гестозам беременности, врожденным порокам развития плода, снижению сопротивляемости потомства к неблагоприятным факторам окружающей среды.

В семьях больных риск развития сахарного диабета составляет: у детей от больных отцов – 4-5%; у детей от больных матерей – 2-3%; у родных братьев/сестёр – около 4%.

Сахарный диабет 1 и 2 типа являются генетически и нозологически самостоятельными заболеваниями, поэтому наличие диабета 2 типа у родственников не влияет на риск развития диабета 1 типа у членов семьи.

Гены предрасположенности к СД 1 типа располагаются на различных хромосомах. В настоящее время известно более 15 таких генетических систем. Из них наиболее изученными, и, как предполагается, наиболее значимыми являются гены HLA II класса.

Риск развития СД у братьев и сестёр может быть также оценен по степени их HLA-идентичности с больным диабетом: в том случае, если они полностью идентичны, риск наиболее высок и составляет около 18%, у наполовину идентичных братьев и сестер риск составляет 3%, а у полностью различных – менее 1%.

Исследование генетических маркёров позволяет выделить группы различного риска развития диабета, что определяет различную тактику по ранней доклинической диагностике заболевания. Кроме того, исследование генетических маркеров существенно повышает прогностическую ценность иммунологических и гормональных исследований.

Типирование HLA I класса обосновано в случае дифференциальной диагностики аутоиммунных болезней. Так HLA B27 выявляют у 90% белых больных анкилозирующим спондилитом и синдромом Рейтера. У здоровых представителей этой расы антиген HLA-B27 встречается всего в 8% случаев.

Определение антигена HLA-B27 проводят в следующих случаях:

- при необходимости исключить анкилозирующий спондилит у больного, родственники которого страдают этим заболеванием;
- для дифференциальной диагностики неполной формы синдрома Рейтера (без уретрита или увеита) с гонококковым артритом;
- для дифференциальной диагностики синдрома Рейтера, сопровождающегося тяжелым артритом, с ревматоидным артритом;
- при обследовании больных ювенильным ревматоидным артритом.

Интересна роль HLA в развитии инфекционных патологий. Так у большинства людей заражение ВИЧ при отсутствии лечения неизбежно приводит к разрушению иммунной системы и развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа). Однако иммунная система очень небольшой группы больных способна самостоятельно бороться с вирусом. СПИД у этих людей не развивается на протяжении многих лет и даже десятилетий после заражения. Показано, что большинство таких пациентов обладают особым вариантом гена из группы HLA B57.

Результаты исследования этого феномена свидетельствуют, что наличие варианта гена HLA B57 приводит к созреванию в вилочковой железе Т-лимфоцитов, способных взаимодействовать с большим числом антигенов ВИЧ. Эта особенность позволяет иммунной системе носителей гена HLA B57 быстро опознавать мутировавшие формы ВИЧ, которые остаются незаметными для иммунной системы других людей.

В настоящий момент в практике инфекционистов активно используются результаты исследований генетических полиморфизмов ряда цитокинов, как одного из ключевых факторов иммунной системы. Например, доказана роль *полиморфизмов гена интерлейкина 28 В* (ИЛ 28В) в чувствительности к терапии HCV и возможности спонтанного разрешения инфекции.

*Интерлейкин 28В* является представителем интерферонов-лямбда, или интерферонов 3 типа, обладающих сильным противовирусным действием и подавляющих репликацию вируса гепатита С. Были изучены полиморфизмы гена ИЛ 28В, связанные с устойчивым вирусологическим ответом.

Благоприятными аллелями являются rs 1297960 CC и rs 8099917 TT, которые ассоциируются с большей воспалительной активностью и стадией фиброза. Все другие генотипы определяют отрицательный прогноз. У больных с благоприятным генотипом и быстрым вирусологическим ответом возможно сокращением сроков лечения до 24 недель.

Не менее стремительно развивается фармакогенетическое направление в ПЦР-диагностике.

*Фармакогенетика* – раздел медицинской генетики и фармакологии, изучающий характер реакций организма на лекарственные средства в зависимости от наследственных факторов.

В настоящее время, активно изучается роль генов, контролирующих синтез и работу ферментов биотрансформации лекарственных средств, в частности, изоферментов цитохрома Р-450 (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) и ферментов II фазы биотрансформации (N-ацетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы, тиопуринометилтрансферазы, глутатион SH-S-трансферазы и т.д.).

На основании этих исследований разработаны и внедрены в практику тест-системы, позволяющие определить полиморфизмы, ассоциированные с индивидуальной чувствительностью к таким препаратам, как Варфарин (антикоагулянт непрямого действия) и Плавикс (антиагрегант).

Например, генетические факторы обуславливают 50-55% вариабельности дозы Варфарина, соответственно, анализ вариантов генотипа, проявляющихся фенотипически в изменении функциональной активности ферментов биотрансформации, позволяет определить начальную дозу препарата и режим его дозирования.

Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (англ. *Food and Drug Administration*, FDA, US FDA) — агентство Министерства здравоохранения и социальных услуг США, в задачи которого входит контроль за соблюдением законодательных норм в области поддержания качества продуктов питания, лекарственных препаратов и косметических средств, представило перечень лекарственных препаратов, для которых применение генетических тестов рассматривается как желательное, а в некоторых случаях и как необходимое (<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>).

В целом, генетические исследования методом ПЦР позволяют реализовать важные принципы развития современной медицины («медицины 4П»), а именно, медицина должна быть:

- Предиктивной
- Персонализированной
- Превентивной
- Подразумевающей активное участие пациента

### 6.3. Определение ГМО в пищевых продуктах

*Генетически модифицированный (или трансгенный) организм (ГМО)* — это организм, в генетический аппарат (геном) которого искусственно вставлен ген/гены другого организма.

За десятилетний период мирового промышленного производства ГМО растительного происхождения в России прошли полный цикл испытаний, зарегистрированы и разрешены для использования в пищевой промышленности и реализации населению 14 видов ГМО растительного происхождения и 5 видов генетически модифицированных микроорганизмов. Среди них 3 сорта сои, 7 сортов кукурузы, 4 сорта картофеля, 1 сорт сахарной свеклы и 1 сорт риса. В Роспотребнадзоре отмечают, что наиболее часто генетически модифицированные источники встречаются в мясных продуктах — 6,6%, в соевых продуктах — 3,9% и в птицеводческих — 3,8%.

В связи с таким широким распространением генетически модифицированной сои получить абсолютно чистый продукт ее переработки невозможно. Именно поэтому в ряде стран введено так называемое *пороговое значение содержания ГМО в продукте*. Величина, не превышающая этот уровень, характеризуется как техническое загрязнение, и продукт не подлежит маркировке на содержание ГМО. В странах Евросоюза этот порог установлен на уровне 0,9%, в России согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 этот уровень составляет 5%. Однако, после вступления в силу Технического регламента, регулирующего оборот ГМО, это значение стало 0,9%.

Нормативная база по контролю за ГМО на территории России включает Федеральный закон «Об охране окружающей среды» от 10.01.2002 N 7-ФЗ, в котором (Статья 50). регламентирована охрана окружающей среды от негативного биологического воздействия, а именно: запрещаются производство, разведение и использование растений, животных и других организмов, не свойственных естественным экологическим системам, а также созданных искусственным путем, без разработки эффективных мер по предотвращению их неконтролируемого размножения, положительного заключения государственной экологической экспертизы, разрешения федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих государственное управление в области охраны окружающей среды, иных федеральных органов исполнительной власти в соответствии с их компетенцией и законодательством РФ.

На основании данного закона 25 декабря 2008 г. утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии ГОСТ Р 53244-2008 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот».

Действующий стандарт описывает количественные методы определения ГМО в пищевых продуктах, а также в кормах и растительных образцах, отобранных из окружающей среды, с использованием полимеразной цепной реакции, и общие требования к специфической амплификации целевых последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для количественного определения содержания ДНК из ГМО, а также для подтверждения идентичности амплифицированной последовательности ДНК.

Система контроля ГМО в России находится в стадии становления. И именно аккредитованные и имеющие необходимое оборудование, а также высококвалифицированных специалистов, лаборатории могут помочь в решении практических вопросов определения ГМО, возникающих как у производителей, так и у обычных потребителей.

## 6.4. ПЦР в ветеринарии

На данный момент можно выделить несколько направлений в разработке аграрных ДНК-технологий:

- Разработка молекулярных методов контроля качества сельскохозяйственного сырья и продуктов питания.
- Тотальное генотипирование организмов, создание генетических паспортов ородгенет таксономических групп.
- Выявление генетических заболеваний на ранних стадиях развития.
- Исследование генома сельскохозяйственных животных на наличие продуктивных качеств для решения селекционных задач.
- Диагностика инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и проведение эпизоотологического мониторинга.

Инфекционная патология в ветеринарии охватывает широкий круг болезней, различных как по характеру течения (острые, хронические, латентные), степени распространения (от спорадических случаев до эпизоотии), так и по сложности их диагностики. Важное, а при некоторых болезнях решаю-

щее значение имеют серологические исследования, направленные на выявление антител, которые вырабатывает организм животного в ответ на внедрение инфекционного агента или вакцины. Несмотря на ряд достоинств, методы, основанные на этом принципе, обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью. Существенный прорыв был сделан в последние годы, когда для диагностических целей привлекли методы генной инженерии и биотехнологии.

С появлением ПЦР как диагностического инструмента ситуация существенно улучшилась, поскольку появилась возможность точной диагностики инфекционных процессов, определения их этиологии, корректировки проводимого лечения.

К настоящему времени ветеринарными специалистами уже разработаны тест-системы для диагностики методом ПЦР таких заболеваний, как: туберкулёз, сибирская язва, лейкоз, чума крупного рогатого скота, бешенство, ящур, бруцеллез, кампилобактериоз, листериоз, хламидиоз животных, классическая чума свиней, респираторно-репродуктивный синдром свиней, парвовирусная инфекция свиней, энцефаломиокардит свиней, сальмонеллёз, стафилококкоз, микоплазмоз, болезнь Марекка, реовирусная инфекция, болезнь Гамборо, инфекционный бронхит птиц, ньюкаслская болезнь, чума плотоядных, вирусный энтерит норок, вирусный гепатит утят и др.

Например, основным массовым и доступным в ветеринарной практике методом прижизненной диагностики туберкулёза является внутрикожная туберкулиновая проба с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Однако данный тест имеет существенный недостаток: длительный срок выявления заболевания (колонии микобактерий туберкулёза бычьего вида появляются только через 20-60 дней, а птичьего – через 15-30 дней посева).

При диагностике туберкулёза метод ПЦР применяют в случае получения положительных результатов при проведении плановых аллергических исследований в благополучных по туберкулёзу хозяйствах. Кровь всех животных анализируют при введении туберкулина. Также полимеразную цепную реакцию целесообразно применять при изучении патматериала от убитых животных для диагностики и идентификации культур *M. bovis* и *M. tuberculosis* с другими видами микобактерий.

Аналогичная ситуация складывается при диагностике хламидийной инфекции, которая широко распространена практически среди всех видов млекопитающих и наносит существенный экономический ущерб различным отраслям животноводства, вызывая гибель животных, патологию их воспроизводительных органов, аборт, рождение мёртвого или нежизнеспособного приплода.

Больные животные часто становятся источником инфекции работников хозяйств, что приводит к возникновению эпидемических вспышек. Распространённость возбудителей хламидиозов в природе среди диких животных и особенно птиц представляет постоянную угрозу sporadических заболеваний для людей, профессионально не занятых в сельском хозяйстве.

Возбудители у кошек – *C. felis*, у собак – *C. abortus*, *Ch. pecorum*, у птиц – *C. psittaci*.

Длительное время общепризнанным эталоном для прямых методов выявления хламидий считалось выделение возбудителя в культуре клеток. Однако метод имеет недостатки, существенно затрудняющие его широкое использование в практической ветеринарии, а именно, высокий риск инфицирования персонала, поэтому необходимо проводить работу по выделению возбудителя в специальной режимной лаборатории.

Кроме того, культуральный метод трудоёмок и занимает много времени. Несмотря на то, что для высева патогена подходит практически любой материал от инфицированного животного, успех ис-

следования во многом зависит от скорости транспортировки проб в лабораторию и соблюдения условий доставки образцов. С учётом этих недостатков были разработаны альтернативные тесты, такие, как определение антигена методом ИФА и экспресс-методами.

Вместе с тем, для ИФА-детекции антигенов так же, как и для культурального метода, характерны низкая чувствительность и специфичность. Учитывая, что при проведении метода иммунофлуоресценции для достоверного выявления хламидий необходимо обнаружить определённое число элементарных телец во всём исследуемом образце, чувствительность анализа зависит от опыта лаборанта.

В настоящее время одним из наиболее перспективных следует считать метод ПЦР, поскольку он позволяет осуществлять дифференциальную диагностику, но и проводить эпидемиологический контроль и предотвращать распространение опасных штаммов хламидий.

Эффективно метод ПЦР используется и при диагностике вирусных заболеваний. Например, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ КРС) — контактно-заразное заболевание, вызываемое герпесвирусом КРС 1-го типа, проявляется в виде поражений респираторного тракта, вульвовагинитов, маститов и абортос у коров, баланопоститов у быков, конъюнктивитов, менингоэнцефалитов, а также, в отдельных случаях, артритов, диарей и генерализованной инфекции у телят.

Среди вирусных болезней крупного рогатого скота ИРТ КРС занял ведущее место. Он способен размножаться в организме латентно инфицированных животных даже на фоне высоких титров Аг и контаминировать сперму быков-производителей.

Учитывая масштабы искусственного осеменения, заболевание распространилось в товарных и племенных хозяйствах. Распространению болезни способствовала также слабая эффективность, а порой и отсутствие диагностических и профилактических мероприятий в этот период.

Применение метода ПЦР дало возможность выявлять ДНК вируса в пробах, не пригодных для вирусологической диагностики вследствие контаминации микрофлорой, токсичности для культур клеток (вагинальные выделения, абортплоды, сперма), и определять возбудителя на любой стадии заболевания, включая латентную. Это позволило значительно сократить время на постановку диагноза.

Кроме того, исследование на предмет контаминации банка спермы вирусом ИРТ КРС на племенных предприятиях позволило контролировать качество спермы на наличие в ней ДНК вируса ИРТ КРС и решать вопрос о ее пригодности к ее использованию.

Инфекции собак и кошек составляют несколько групп: системные, кровопаразитарные, офтальмологические, респираторные, дерматофитозные, половые, желудочно-кишечные и другие. В клинической практике ПЦР получила наибольшее распространение при диагностике системных заболеваний и заболеваний, вызванных инфекциями с выраженным тропизмом к клеткам цилиндрического эпителия (респираторные, глазные и половые инфекции).

Достаточно давно ПЦР-диагностика введена в практику ветеринарных врачей с точки зрения выявления зооантропонозных инфекций.

*Зооантропонозы* — антропозонозы, группа инфекционных и инвазионных болезней, общих животным и человеку. К зооантропонозам относятся такие заболевания, как: сибирская язва, сальмонеллез, бруцеллёз, туберкулёз, бешенство, ящур, лептоспироз, трипаносомоз, эхинококкоз, дифиллоботриоз и др.

При зооантропонозах складываются довольно сложные взаимоотношения между эпидемическим и эпизоотическим процессами. Источником возбудителей зооантропонозов для человека являются животные, с которыми человек часто соприкасается в процессе хозяйственной деятельности и в

быту: сельскохозяйственные и комнатные животные, грызуны, а также дикие животные — объекты охоты. Многие зооантропонозы характеризуются природной очаговостью.

Например, для осуществления эффективного надзора за активностью эпизоотических и эпидемических факторов в эндемичных по бруцеллезу регионах используются стандартные лабораторные методы исследования, в первую очередь, выделение культуры с целью идентификации бруцелл на основании морфологических, культуральных, метаболических и серологических свойств возбудителя, а также определения генетического родства с тестерными штаммами (показатель соотношения Г+Ц состава в ДНК равный 56-58 моль% и гомологии ДНК в реакции ДНК-ДНК гибридизации до 90%).

Все вышеперечисленные методы весьма трудоемки, требуют значительного количества средств и времени, кроме того, некоторые из них недостаточно специфичны, что требует проведения комплексных исследований.

В настоящее время для детекции, идентификации бруцелл и лабораторного подтверждения диагноза «бруцеллез» рекомендован метод ПЦР, согласно МУК 4.2.301012 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» от 29 марта 2010 года.

ПЦР позволяет в короткие сроки определить наличие специфической последовательности ДНК патогена в пробах клинического и полевого материала, продовольственного сырья, продуктов животного происхождения, особенно при обнаружении L-формы. При этом высокая специфичность и чувствительность метода позволяют делать лабораторное заключение в случае как острого, так и хронического бруцеллеза у людей и крупного рогатого скота.

### 6.5. ПЦР в растениеводстве

Вирусные инфекции культурных растений вызывают ощутимые потери урожая, заметно ухудшают качество сельскохозяйственной продукции и все чаще рассматриваются как серьезная угроза продовольственной безопасности. Эта проблема касается всех продовольственных, кормовых и технических культур, возделываемых в любом регионе мира, и особенно актуальна для вегетативно размножаемых растений, поскольку прогрессирующее накопление вирусов в ряду поколений приводит к полному заражению и вырождению сорта.

В настоящее время производство безвирусного семенного и посадочного материала основано, главным образом, на выбраковке зараженных и отборе здоровых растений для их последующего размножения.

При тотальном заражении сорта, когда отбор неэффективен, растения оздоравливают от вирусов с помощью термотерапии и культуры меристем. Однако, существующие методы оздоровления не гарантируют полного избавления от патогена.

Важнейшую роль в предупреждении распространения вирусных инфекций играет карантинный контроль продукции растениеводства, особенно импортируемого семенного и посадочного материала. Поэтому все этапы получения безвирусных растений должны сопровождаться анализами на присутствие вирусов.

Очевидно, что для осуществления такого отбора необходимо располагать чувствительными методами массовой диагностики вирусов.

Единственным методом массовой лабораторной диагностики фитопатогенных вирусов долгое время был серологический метод, известный в России как «капельный метод диагностики». В его основе лежит преципитация вирусных частиц антителами иммунной сыворотки в жидкой среде. Метод использовали для выявления четырех вирусов картофеля в листьях сильно зараженных растений.

Однако чувствительность капельного метода оказалась недостаточна для выявления вирусов в пробирочных растениях, которые получали при оздоровлении сорта методом культуры меристем. Поэтому его применение на ранних стадиях оздоровления и вегетативного размножения оздоровленного материала было неэффективным. Кроме того, ассортимент имеющихся антисывороток совершенно не отвечал реальным потребностям безвирусного растениеводства.

На данный момент разработаны диагностические наборы для ПЦР анализа ряда наиболее распространенных патогенных микроорганизмов защищенного грунта, особенно важных при выращивании овощных культур, в первую очередь огурцов и томатов.

Применение таких диагностических наборов позволяет получить в течение нескольких часов быстрые и достоверные (со специфичностью анализа более 95%) результаты, позволяющие сделать своевременную выбраковку семенного материала, а также при необходимости подобрать оптимальные состав и дозы реагентов для химической обработки растений, уменьшая тем самым потери урожая.

## 6.6. ПЦР в судебно-медицинской экспертизе

Первый опыт использования полимеразной цепной реакции для исследования судебно-медицинских объектов описан в 1987–1988 годах в работах по типированию локуса HLA-DQA1. Эти исследования имели весьма ограниченное практическое применение, поскольку перспективы для развития ПЦР-анализа могли обеспечить только разработки в области и исследования гипервариабельных локусов.

Разработки ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздравсоцразвития России в области использования ПЦР в судебной медицине позволили выделить основные направления судебно-медицинской методики анализа ДНК методом ПЦР:

- исследование малого количества ДНК и ее деградации, актуальные для экспертной практики;
- исследование биологических объектов разного происхождения (установление половой принадлежности объекта);
- работа с образцами спермы со сниженным содержанием сперматозоидов (олигозооспермия);
- исследование образцов, содержащих смесь женской и мужской ДНК;
- исследование следов разной давности образования;
- исследование следов, расположенных на различных предметах-носителях;
- исследование образцов с микробным загрязнением.

Было установлено, что к преимуществам ПЦР-анализа ДНК применительно к установлению половой принадлежности относятся:

- Положительный результат цитологического исследования возможен только при условии относительно хорошего состояния объекта, сохранности клеточной структуры. Для достоверного вывода требуется значительное число неизмененных клеток в препарате, что обуславливает необходи-

мость довольно большого количества материала. Требования к состоянию объекта и количеству материала при ДНК-анализе меньше.

- При ДНК-анализе интерпретация результатов проста и объективна. Учет результатов цитологического исследования трудоемок, субъективен, правильность оценки данных во многом зависит от квалификации эксперта.
- Результаты цитологического исследования документировать сложно, поэтому после его проведения, как правило, остаются только записи в рабочем журнале.
- При выполнении экспертизы с использованием ДНК-анализа установление пола по ДНК целесообразно и в методическом отношении:
  - а) этот метод имеет ту же пробоподготовку, что и методы исследования полиморфных локусов. Поэтому в случае, когда объект исследуется (или планируется его исследование) по полиморфным локусам, проводить определение пола также по ДНК и технически удобно, целесообразно с точки зрения экономного использования экспертного материала;
  - б) маркер пола может исследоваться в едином комплексе с STR-локусами, причем такое исследование возможно в течение одной ПЦР. Это позволяет непосредственно сопоставлять результаты исследования пола и полиморфных локусов, что особенно важно при исследовании «смешанных» следов.
- Особые преимущества ДНК-анализ имеет при определении женского пола, поскольку позволяет непосредственно выявить маркерный участок X-хромосомы; его обнаружение, при отсутствии фрагмента Y-хромосомы, достоверно и однозначно свидетельствует о присутствии в объекте ДНК женщины. При использовании цитологического метода вывод о половой принадлежности объекта в случае женского пола делается лишь на основании статистической оценки данных выявления определенных клеточных структур с заданной степенью надежности.

В целом было определено, что методы исследования ДНК имеют целый ряд очевидных преимуществ перед традиционными методами исследования идентификационных генетических маркеров:

- более высокая информативность;
- возможность проводить в едином комплексе исследование значительного числа генетических маркеров, в том числе, различных по их экспертной функции (например, маркеров полиморфных локусов и маркеров генетического пола), что методически удобно и обеспечивает экономное расходование экспертного материала и максимальную сопоставимость результатов исследования;
- применение праймеров, специфичных для ДНК человека, позволяет избежать актуальной для иммунологических методов проблемы ложноположительных результатов вследствие микробного загрязнения;
- вещества, содержащиеся в предмете-носителе, в ряде случаев могут приводить к отрицательному результату типирования за счет ингибирования ПЦР. Однако в иммунологических методах влияние предмета-носителя может создавать риск получения ложноположительного результата, что более опасно;
- результаты ДНК-анализа наглядны; легко документируются, что позволяет сохранить первичные материалы и представить их в суд. Это обеспечивает высокую достоверность данных, а, следовательно, повышает ценность экспертного заключения как судебного доказательства;

- метод ПЦР хорошо поддается автоматизации, тем самым обеспечивается высокая пропускная способность метода, стандартность выполнения процедуры, сведение к минимуму риска ошибок за счет субъективного фактора.

В совокупности, проведенные исследования легли в основу определения порядка проведения генетических исследований методом ПЦР, представленного в Приказе Минздравсоцразвития России от 12 мая 2010 г. N 346н г. Москва «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации»

В настоящее время всё большее внимание уделяется генотипированию SNP в судебной медицине. Причём подобное типирование используется не только для Y-хромосомы или митохондриальной ДНК, но и для аутосомных SNP. Интерес судебных экспертов к аутосомным SNP вызван рядом потенциальных преимуществ, таких как низкий уровень мутационных изменений и облегчение анализа деградированных образцов с помощью коротких ампликонов.

Картирование генома человека сделало возможным создать карту гаплотипов человека, чтобы лучше исследовать вариабельность SNP. Карта гаплотипов или «HapMap» (<http://www.hapmap.org>) стала инструментом, который позволяет находить гены и полиморфизмы, которые влияют на здоровье и могут приводить к болезням. Проект «HapMap» представляет большую ценность, так как уменьшает число SNP, необходимых при исследовании ассоциации в полноразмерном геноме.

В судебной практике интерес к SNP постоянно растёт. Причина такого внимания заключена в том, что они имеют ряд характеристик, которые очень важны для судебной медицины. Во-первых, SNP имеют очень маленький процент мутаций, и это играет существенную роль при установлении отцовства. Во-вторых, они очень подходят для анализа с использованием высокопроизводительных технологий, а это актуально для формирования баз данных и автоматизации процесса.

Кроме того, SNP поддаются анализу в коротких ампликонах. Это представляет интерес, так как следует учитывать, что размер продукта амплификации влияет на точность анализа при определении результатов в деградировавших образцах. Предварительные материалы по идентификации жертв теракта 11 сентября 2001 года во Всемирном торговом центре наглядно показывают потенциал данного типа маркёров, так как стандартные методики, основанные на использовании CODIS-панели (STR- и VNTR-маркеры), не позволили провести идентификацию останков, подвергшихся сильному воздействию разрушающих факторов.

Подводя итог, следует отметить, что метод ПЦР является одной из наиболее стремительно развивающихся отраслей в области молекулярно-генетических исследований. Широкое применение данного метода позволило существенно повысить качество лабораторных исследований, сократить время на проведения анализа и автоматизировать систему обработки, хранения и выдачи результатов

Наиболее перспективным направлением развития ПЦР на данном этапе является полная автоматизация процесса.

## 7. Современные тенденции развития ПЦР

Анализ мирового рынка молекулярной диагностики свидетельствует о том, что это одно из наиболее быстрорастущих направлений биотехнологии.

По данным РАН, на анализы в мире тратится менее 2% государственных расходов на здравоохранение, но на результатах этих анализов основано 60-70% диагнозов.

Исследования, проведенные Cambridge Healthtech Institute и журналом GEN, выявили, что за последние 15 лет наблюдается стремительный рост мирового рынка молекулярной диагностики: если в 1995 г. затраты на молекулярные исследования в практической медицине составили 360 млн долларов (2% рынка мед. исследований), то в 2010 г. в сегмент рынка молекулярных исследований было вложено 4,76 млрд долларов, что 13,2 раза больше аналогичного показателя в 1995 г.

Согласно прогнозам ведущей мировой компании «Kalamita Information», которая занимается аналитическими исследованиями в сфере здравоохранения, рост рынка в ближайшие 5 лет составит 11% и будет соответствовать 8,085 млрд долларов. При этом ежегодные темпы роста рынка для США и стран ЕС ожидаются на уровне 6-10%, тогда как в развивающихся странах данный показатель составит 15-25%.

С точки зрения технологий на рынке молекулярной диагностики наиболее эффективным направлением, уже получившим широкое распространение в сфере лабораторных исследований *in vitro*, являются методы, основанные на проведении ПЦР. Так в странах Евросоюза на их долю приходится до 80%. В России ежегодно проводится более 40 млн исследований, а объем рынка составляет около 1,5 млрд. рублей.

На сегодняшний день доля исследований с использованием ПЦР с детекцией результатов в формате гель-электрофорез составляет не более 10%, тогда как аналогичный показатель для формата FLASH соответствует 35%, а реал-тайм – 55%.

Следует отметить, что помимо ПЦР в лабораторную практику активно внедряются и другие молекулярно-генетические методы и технологии, в первую очередь, секвенирование, его вариант – пиросеквенирование и микрочиповые технологии.

### 7.1. Секвенирование

*Секвенирование* (от англ. sequence – последовательность) – определение нуклеотидной последовательности генома или его фрагмента организма.

Для проведения секвенирования необходимы: секвенирующий праймер (искусственно синтезированная олигонуклеотидная последовательность, комплементарная определенному участку исходной молекулы ДНК), четыре пробирки с набором из четырех дезоксирибонуклеотидов, каждый из которых мечен изотопом в соответствии одному из четырех добавляемых дидезоксирибонуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддЦТФ и ддТТФ), и ДНК-полимераза.

Метод включает следующие этапы:

- гибридизацию изучаемого фрагмента ДНК с праймером
- ферментативный синтез ДНК

- денатурацию полученных продуктов формамидом (в результате образуются уникальные олигонуклеотидные последовательности, содержащие праймер, которые различаются по длине).
- электрофорез в геле на четырех дорожках (по числу типов нуклеотидов) (рис. 10) или автоматический анализ результатов (рис. 11)

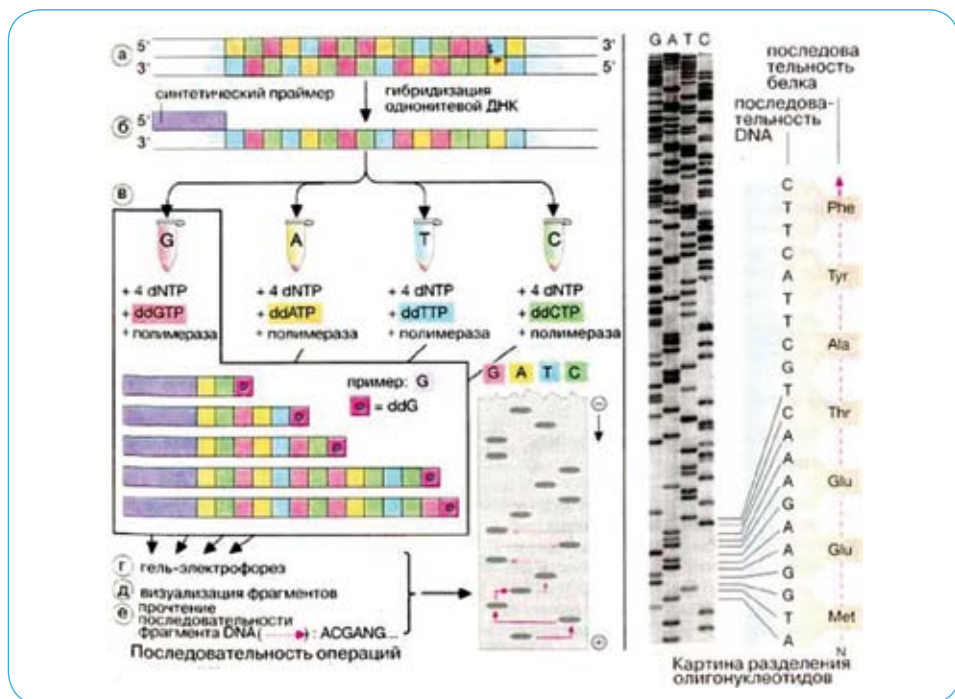


Рис. 10. Этапы секвенирования ДНК с детекцией результатов методом электрофореза

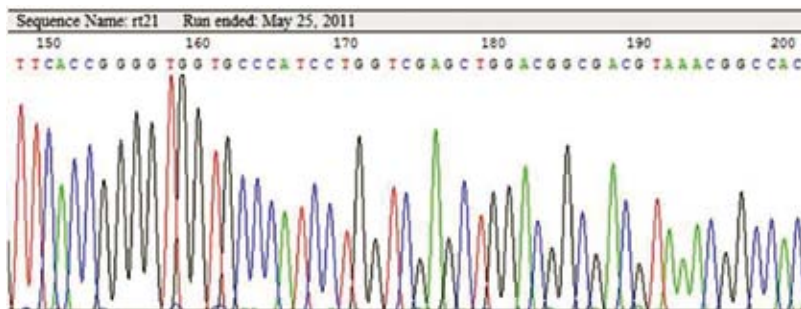


Рис. 11. Автоматическая обработка результатов секвенирования.

Наиболее значимыми направлениями применения секвенирования являются изучение геномов и метабеномика.

Методы метабеномики применяются для проведения анализа генома микробных популяций. На сегодняшний день можно выделить две области:

- метабеномика окружающей среды;
- метабеномика человеческого организма.

*Метабеномика окружающей среды* – изучение метабеномов биогеоценозов – озер, морей, болот, почвы и т.д. с точки зрения синергии действия множества микроорганизмов для получения конкретных результатов, например, очистка воды или утилизация отходов.

*Метабеномика человеческого организма* – сравнение бактериальных сообществ организмов людей разного возраста, происхождения и состояния здоровья позволит установить, каким образом микроорганизмы предотвращают или повышают риск развития определенных заболеваний, а также возможные методы управления этими механизмами.

В 1990 году был запущен Проект по расшифровке генома человека (The Human Genome Project, HGP), главной задачей которого стало идентифицировать 20-25 тыс. генов в человеческом геноме, в 2001м году было заявлено об окончании работы.

В судебно-медицинской экспертизе секвенирование широко применяется для определения гипер-вариабельных сегментов митохондриальной ДНК человека и создания коллекции высокоэффективных полиморфных маркеров ДНК.

С точки зрения практической медицины секвенирование приобрело значительную актуальность в исследовании онкологических процессов. Ученые из Университета Вашингтона в Сент-Луисе провели секвенирование генома раковых клеток, которое позволило по-новому классифицировать опухоли, принимая во внимание организацию их генетического материала, а не локализацию. Например, у пациентов с раком груди были найдены многочисленные мутации в генах, которые ранее не связывались с опухолями этой локализации. Картирование генетического развития лейкемии выявило, что с течением времени опухоль приобретает новые мутации, но всегда остаётся группа мутаций, которая первоначально повлияла на трансформацию клеток.

В клиническом исследовании женщин в постменопаузальный период с раком молочной железы III степени учёные показали, что секвенирование может помочь предсказать, какие пациентки поддаются лечению ингибиторами ароматазы. Препараты, понижающие уровень эстрогена, часто прописываются, чтобы сократить опухоль груди перед хирургическим вмешательством. Но только около половины женщин с эстроген-зависимым раком молочной железы чувствительны к этим препаратам.

На основании этих данных появляется возможность таргетной терапии опухолевых процессов, особенно эффективной при генетических изменениях, произошедших на ранних стадиях болезни.

Секвенирование всего генома раковых клеток необходимо как раз для того, чтобы сложить целостную картину развития опухоли. Это позволит определить не только эффективность стандартной терапии, но и сформулировать направления генной терапии.

*Генная терапия* – область современной биомедицины, основанная на введении в организм пациента рекомбинантных генетических конструкций с лечебной целью. Одним из вариантов такой терапии является рецептор-опосредованное внедрение фрагмента здоровой ДНК человека в транс-

формированную клетку, что приводит к гомологичному рекомбинантному замещению мутантной последовательности ДНК; либо введение мутантной версии структурной или регуляторной области гена, блокирующей транскрипцию.

На данный момент разработан спектр гентерапевтических агентов: антисмысловые ДНК/РНК (антисенс ДНК/РНК), рибозимы, РНК-ловушки, дуплексы «нуклеиновая кислота-пептид», трансдоминантные негативные белки, одноцепочечные антитела и суицидные гены.

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*). Клеточная генная терапия предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток пациента *in vitro*, введение в них чужеродных генов (например, усиливающих иммунный ответ организма), отбор трансфецированных клонов клеток и реинфузию (введение) их тому же пациенту (табл. 1).

**Табл. 1.** Наследственные заболевания, генокоррекция которых находится на стадии клинических испытаний

| Болезнь                      | Дефектный ген                           | Клетки-мишени               |
|------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
| Иммунодефицит                | Аденозиндезаминаза                      | Лимфоциты                   |
| Семейная гиперхолестеринемия | Рецептор липопротеинов низкой плотности | Гепатоциты                  |
| Гемофилия В                  | Фактор IX                               | Фибробласты                 |
| Болезнь Гоше (сфинголипидоз) | p-Глюкоцереброзидаза                    | Макрофаги, стволовые клетки |
| Муковисцидоз                 | СГ-трансмембранный регулятор            | Эпителий бронхов            |

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного. Особенно перспективным для лечения генных болезней *in vivo* представляется введение генов с помощью аэрозольных или инъектируемых вакцин. Аэрозольная гентерапия разрабатывается, как правило, для лечения пульмонологических заболеваний (муковисцидоз, рак легких).

Таким образом, перспективы секвенирования в клинической медицине и науке достаточно широкие.

Сегодня на рынке существует системы нового поколения для секвенирования ДНК: Roche (454) GS FLX Genome Analyzer, секвенатор Illumina Solexa 1G, SOLiD от Applied Biosystems.

Существенным недостатком приборов для секвенирования этого поколения является необходимость абсолютной калибровки числа молекул. Это требование имеет два последствия:

- Для подготовки библиотеки необходимо большое количество пробы (до нескольких микрограмм), что ограничивает область применимости прибора. Например, при секвенировании древних, судебно-медицинских и клинических образцов количество исходных ДНК ограничено.
- Каждая библиотека требует титрования в процессе секвенирования, тем самым увеличивая расходы и снижая производительность секвенирования

Другие системы для расшифровки ДНК, появление которых на рынке ожидается в течение 1-2 лет, относятся уже к «третьему поколению» и основываются на анализе одиночных молекул. Они разрабатываются компаниями VisiGen и Helicos.

Секвенаторы Ion PGM, разработанные специалистами компании Ion Torrent (США), – первые секвенаторы нового поколения, считывающие последовательность ДНК с использованием полупроводниковой технологии. Новая технология поможет сделать секвенирование ДНК более доступным для лабораторий.

Использование автоматических секвенаторов позволило существенно снизить стоимость секвенирования одного звена с 1 \$ до 0,1 \$. Тем не менее, развернутые системы исследования с использованием секвенаторов сохраняют достаточно высокий ценовой уровень, равно как и стоимость самого оборудования и расходных материалов не позволяет на данный момент широко внедрить эту технологию.

Интересным направлением является вариант метода секвенирования – пиросеквенирование.

### 7.2. Пиросеквенирование

*Пиросеквенирование* – это метод секвенирования ДНК (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), основанный на принципе «секвенирование путем синтеза». Секвенирование одной цепочки нуклеотидов ДНК происходит путем синтеза комплементарной цепочки, при этом регистрируется присоединение каждого нуклеотида. Матрица ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов А, С, G и Т добавляются и отмываются последовательно после реакции. Световой сигнал образуется в тот момент, когда раствор нуклеотидов соответствует первому неспаренному основанию матрицы. Последовательность растворов, которые дают хемилюминесцентный сигнал, позволяет определить последовательность матрицы.

Этапы пиросеквенирования (рис. 12):

1. ДНК фрагментируются на участки по 300-500 пар оснований. Комплементарные цепи фрагмента разделяются и образуют одноцепочечную матрицу. К каждой цепи фрагментов пришивается одинаковый для всех олигонуклеотид – «адаптер», последовательность которого позволяет позднее в процессе секвенирования распознавать ДНК-матрицу. Основной задачей олигонуклеотида является опосредованное связывание цепи ДНК с сефарозной микросферой (бусиной).

2. Образовавшийся комплекс «одноцепочечная ДНК-бусина» окружается эмульсионной сферой (капля масла), в которую заключены компоненты реакционной смеси для ПЦР (Taq-полимераза, праймеры, буфер для ПЦР) – так называемая *эмульсионная ПЦР* (эПЦР).

3. Внутри этой сферы в процессе амплификации (так называемая клональная амплификация) на каждой бусине накапливаются копии исходного, прикрепленного к ней, фрагмента ДНК.

4. По завершении процесса амплификации эмульсия разрушается, и освободившиеся бусины с накопленными на них ампликонами переносятся в специальные шестигранные камеры слайда: по одной в каждую камеру.

Слайд представляет собой срез блока, полученного путём нескольких раундов вытягивания и сплавления оптических волокон. В результате каждой итерации, диаметр индивидуальных волокон уменьшается, волокна формируют пучки шестигранной упаковки.

Каждое волокно имеет сердечник диаметром 44 мкм, окружённый 2–3 мкм слоем плакировки (оболочки). Затем сердечники вытравливаются, и в результате получаются камеры около 55 мкм глубиной и с расстоянием между центрами соседних камер около 50 мкм. Объём таких «реакторов» – 75 пиколитров; плотность размещения на поверхности слайда – 480 камер на квадратный миллиметр. Каждый слайд несёт их около 1,6 миллионов. Слайд помещается в проточную камеру таким образом, что над отверстиями камер создаётся канал высотой 300 мкм, по которому в них поступают необходимые реактивы.

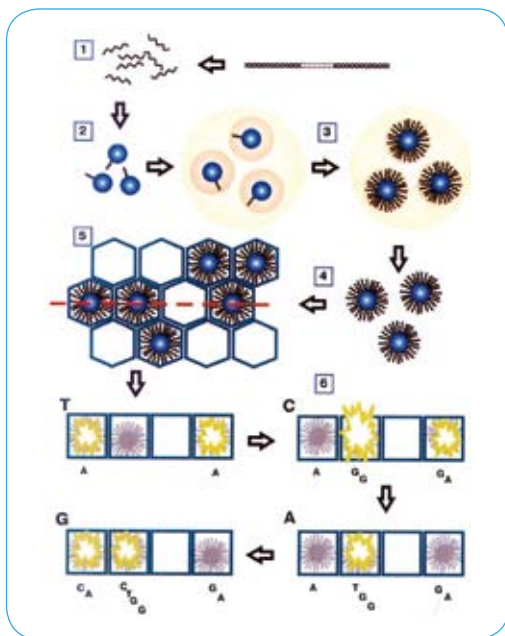
5. Доставляемые в проточную камеру реактивы текут в слое, перпендикулярном оси лунок. Такая конфигурация позволяет одновременно осуществлять реакции на бусинках, несущих ДНК-матрицы, внутри отдельных камер. Добавление и удаление реагентов и продуктов реакции происходит за счёт конвекционного и диффузионного переноса.

6. Помимо бусинок с ДНК-матрицей, в каждую камеру вносят бусины еще меньшего размера, каждая из которых несет на своей поверхности иммобилизованные ферменты, необходимые для пирофосфатного секвенирования (ДНК-полимераза, АТФ-сульфурилаза, люцифераза и апираза), а также субстрат аденозин-5'-фосфосульфата (APS) и люциферин.

Нуклеотиды (одного вида за один раунд) и другие реактивы, необходимые для реакции секвенирования, подаются последовательно в проточную камеру, куда помещается слайд. Дно слайда находится в оптическом контакте с оптико-волоконным световодом, подключённым к прибору с зарядовой связью (CCD-сенсор, *charge coupled device*). Это позволяет регистрировать излучаемые фотоны со дна каждой индивидуальной камеры, в которой произошло встраивание известного нуклеотида.

Каждый раз, когда определённый нуклеотид встраивается в растущую цепь ДНК в какой-нибудь из камер, в ней высвобождается молекула пирофосфата, которая, в свою очередь, является необходимым предшественником компонента другой ферментативной реакции (рис. 13).

Фермент АТФ-сульфурилаза количественно превращает РРi в аденозинтрифосфат (АТФ) в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата. АТФ выступает источником энергии для фермента люциферазы, которая превращает люциферин в оксилуциферин, при этом высвобождается видимый свет, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшегося АТФ. Свет образуется в ре-



**Рис. 12.** Этапы пиросеквенирования

акции, катализируемой люциферазой, регистрируется камерой и далее анализируется специальной компьютерной программой.

Невключенные нуклеотиды и АТФ подвергаются деградации ферментом апиразой, и реакция начинается с новым нуклеотидом.

В 2005 году учёные из 454 Life Sciences, используя свою технологию пиросеквенирования, сумели расшифровать 600 000-нуклеотидный геном бактерии *Mycoplasma genitalium* с точностью до 99,4%, а также 2 100 000-нуклеотидный геном *Streptococcus pneumoniae*.

На данный момент пиросеквенирование используется для количественной оценки в следующих направлениях:

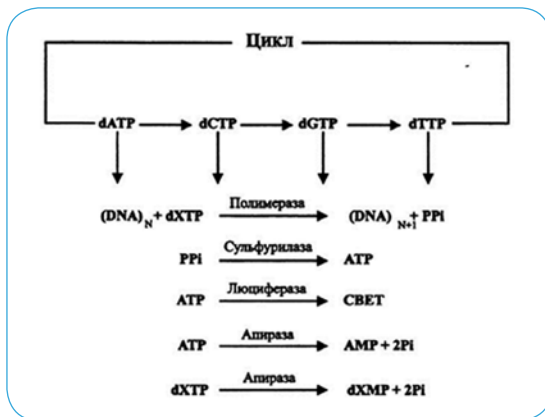
- анализ мутаций, приводящих к развитию опухолей;
- полиплоидия – обнаружение SNP в полиплоидном организме;
- гетероплазмия – анализ количества мутированных и диких типов митохондриальной ДНК;
- SNP, ассоциированные с риском развития мультифакторных заболеваний.

Таким образом, пиросеквенирование позволяет решить ряд важных задач практической медицины, тем не менее, существует ряд недостатков, снижающих производительность анализа, но увеличивающих его цену:

- не различаются гомогенные повторы >5N;
- необходимы дНТФ высшей очистки;
- вместо дАТФ используется более дорогой дАТФаS;
- термоллабильность люциферазы;
- утечка PPi и АТФ из лунок проточной ячейки;
- низкая эффективность регистрации фотонов;
- высокая стоимость расходных реагентов;
- невозможность проводить мультиплексный анализ.

Следует отметить и тот факт, что полногеномные исследования, равно как и поиск SNP, для которых только предполагается роль в развитии патологических состояний, представляют интерес в рамках масштабных научных проектов.

Напротив, в практике клиницистов наибольшую значимость приобретают полиморфизмы, для которых доказана роль в развитии тех или иных заболеваний, и полученная в ходе анализа информация может быть однозначно истолкована, позволит назначить терапию, скорректировать образ жизни или рекомендовать дополнительные исследования.



**Рис. 13.** Последовательность ферментативных реакций приосеквенирования

Кроме того, несмотря на то, что стоимость одного исследования с использованием секвенаторов, представляется доступной для рутинной работы лаборатории, тем не менее, один запуск такого прибора на сегодняшний день составляет порядка \$10 000.

С этой точки зрения, наиболее эффективным и практичным подходом на данный момент является анализ SNP методом ПЦР. Однако в реализации данного подхода существует ряд технических особенностей, способных повлиять на качество полученного результата. В первую очередь, это касается способов детекции. Одни из первых коммерческих наборов, направленных на анализ полиморфизмов, представляли собой системы с аллель-специфичными праймерами и последующей детекцией результатов в формате электрофореза. Объективным недостатком такого решения является высокая степень субъективности при интерпретации результатов, а также риск контаминации.

Следующим шагом в данном направлении было использование интеркалирующих красителей, типа SYBR-GREEN. С точки зрения качества полученных результатов стоит отметить, что использование красителей этой группы значительно чаще приводит к детекции не только специфической последовательности, но и неспецифических продуктов амплификации (например, димеров), по сравнению с аналогичными показателями при использовании флуоресцентных зондов.

Кроме того, тест-системы с интеркалирующими красителями подразумевают использование двух пробирок для определения одного SNP, что сокращает пропускную способность лаборатории. Напротив, использование флуоресцентных зондов для ПЦР в режиме «реального времени» позволяет реализовать подход: «один SNP – одна пробирка».

Еще одним существенным недостатком является сложность в интерпретации результатов, полученных с использованием интеркалирующих красителей, с точки зрения автоматизации данного процесса.

Принимая во внимание значимость анализа полиморфизмов в клинической практике, основными направлениями усовершенствования метода ПЦР были: автоматизация процесса обработки полученных данных и выдачи результата; повышение точности и стабильности работы системы. Здесь следует отметить вариант ПЦР с функцией HRM (High Resolution Melting).

В основе данного подхода лежит гетеродуплексный анализ с использованием интеркалирующих красителей и последующим плавлением ампликонов в одной пробирке. Генотипирование производится автоматически, на основе анализа форм кривых, с применением специализированного программного обеспечения. Недостатком такого подхода является сложность в интерпретации форм кривых для разных генотипов, для чего возникает необходимость вводить математические методы анализа полученных результатов.

Кроме того, разница температур плавления для различных генотипов (в тех случаях когда она должна быть) должна составлять более 0,1°C, что делает систему устойчивой, позволяя проводить надежное автоматическое генотипирование и оставляя возможность для визуальной интерпретации результатов. Минимизировать ошибку интерпретации позволяет разница температур для аллельных вариантов не менее 4-5 °C, что обеспечивает максимальную стабильность и воспроизводимость результатов.

Заслуживающим внимания приложением метода HRM является возможность поиска новых SNP в пределах амплифицированного участка, что актуально для решения научных задач.

Таким образом, использование метода ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» и наборов реагентов с флуоресцентными зондами позволяет решить актуальные задачи диагностических лабораторий, проводящих исследования SNP.

### 7.3. Микрофлюидные технологии

Развивающимся направлением ДНК-диагностики является использование технологии с применением микрофлюидных чипов. Это отражает одну из основных тенденций развития современной аналитической техники – миниатюризацию (рис. 14).

Наиболее яркое воплощение этой тенденции явилось в системах: «лаборатория на чипе» (Lab-on-a-Chip), или микроаналитических системах полного анализа (micro Total Analysis System). Основой таких систем является аналитический микрочип, на котором реализуются основные стадии определения искомой ДНК.

В основе использования биочипов лежит метод гибридационного анализа – комплементарное связывание нуклеотидов. Это метод прямого обнаружения специфической последовательности нуклеотидов (ДНК или РНК) при помощи коротких олигонуклеотидных одноцепочечных фрагментов (рис. 15).

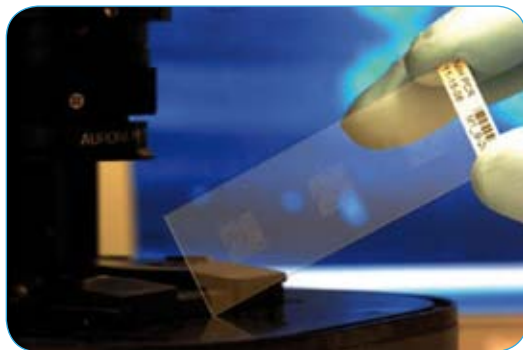


Рис. 14. Биочип

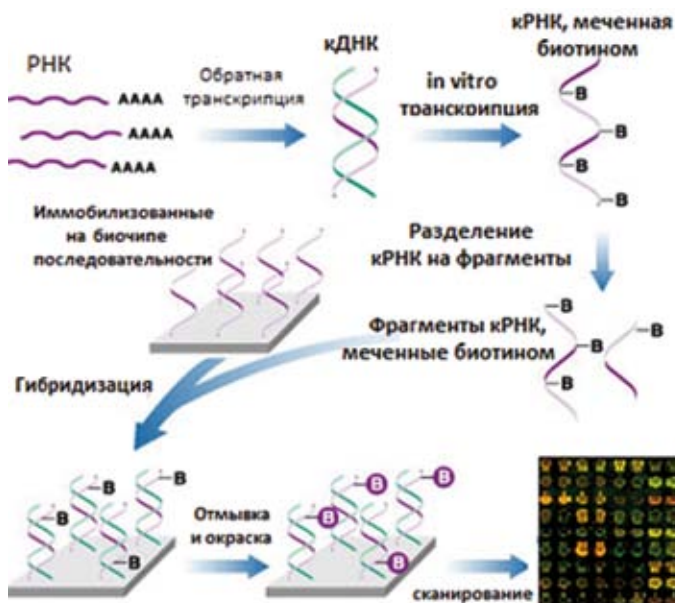


Рис. 15. Этапы гибридизации на биочипе.

В зависимости от варианта анализа или в анализируемый образец, или в олигонуклеотид вводят репортерную группу (*зонд*). Наиболее распространенной репортерной группой, включаемой в состав олиго- и полинуклеотидных зондов, является витамин *биотин* (природный кофактор группы ферментов – карбоксилаз).

При анализе последовательностей РНК гибридационную пробу – исследуемый фрагмент генома – готовят методом ОТ-ПЦР с последующей *in vitro* транскрипцией (получают комплементарную РНК – кРНК) и включением биотинового зонда. Размер амплифицированного фрагмента находится в пределах 100–1000 пар нуклеотидов.

Главным элементом биочипов является матрица микрочаек, каждая из которых содержит олигонуклеотиды, специфичные одному из множества исследуемых фрагментов кРНК. После нанесения их на биочип молекулы исследуемого образца соединяются со своей «комплементарной парой».

Следующий шаг – промывка, чтобы удалить лишние не связавшиеся ни с чем биологические молекулы.

Для проведения пероксидазной реакции используется конъюгат, состоящий из фермента, связанного со стрептавидином. Этот конъюгат образует очень прочный комплекс биотин-стрептавидин, который используется как связующий мостик между образовавшимся в ходе гибридизации дуплексом кРНК и ферментной меткой.

Наибольшее распространение в качестве ферментной метки получила пероксидаза хрена, которую впервые применили Накане и Пирс. Под действием пероксидазы, субстрат  $H_2O_2$  образует с красителем диаминобензидином (ДАБ) нерастворимый в воде и спирте комплекс коричневого цвета, который накапливается вокруг фиксированного дуплекса.

Полученную на экране компьютера гибридационную картину для анализируемой пробы сравнивают с гибридационной картиной для положительного контроля и гибридационной картиной для отрицательного контроля.

В настоящее время анализ с использованием биочипов находит широкое применение на практике. Он отличается высокой чувствительностью, простотой процедуры выполнения, возможностью одновременного анализа множества параметров, специфичностью и воспроизводимостью.

Применение биологических микрочипов может быть очень эффективно в таких сферах деятельности, как:

- обнаружение контаминации в продуктах питания и окружающей среде;
- диагностика и прогнозирование развития онкопатологий;
- оценка лекарственной эффективности;
- анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов;
- диагностика инфекционных заболеваний.

Развитие микрофлюидики привело к появлению приборов, в которых осуществляется воспроизводимое управление нано- и пиколитровыми объемами жидкости.

Это позволяет:

- значительно уменьшить объем требуемых реагентов;
- существенно увеличить скорость нагрева (охлаждения) реакционной камеры и сократить время анализа;

- реализовать возможность проведения амплификации во множестве реакционных камер одновременно, тем самым увеличив производительность определений.

Тем не менее, микрочиповые технологии для ПЦР не позволяют избавиться от общего недостатка метода – необходимости градуировки для точных измерений.

Технологии секвенирования ДНК с использованием биологических микрочипов пока еще достаточно дороги в использовании и имеют ряд ограничений:

- требуют больших количеств анализируемой ДНК;
- требуют высокой степени полимерности ДНК;
- требуют высокой чувствительности ДНК к гомополимерным последовательностям.

Поэтому применение биочипов для анализа микроследов или объектов, содержащих деградированную ДНК, пока затруднено.

### 7.4. Развитие ПЦР в режиме «реального времени»

Основными перспективами развития классического метода ПЦР, в первую очередь, ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» являются:

#### Технологические аспекты

- Автоматизация
- «Пакетные» исследования
- Мультиплексность
- Создание комплексного лабораторного пространства
- Интеграция в информационные системы
- Высокая производительность и снижение себестоимости единичных параметров при пакетных исследованиях

#### Прикладные аспекты

- Расширение спектра исследований
- Максимум информации из одного образца
- Комплексные тест-системы

#### 384/192 формат термоблока

- Высокая пропускная способность
- Снижение затрат на персонал
- Расширение возможностей по внедрению многопараметрических исследований
- Снижение себестоимости одного параметра

Повышение продуктивности является ключевой целью клинических лабораторий. Это возможно при наличии систем, которые позволяют уменьшить количество действий, занимающих много времени, таких как маркировка образцов, пробоподготовка, выделение. Полная автоматизация подразумевает освобождение оператора для выполнения других этапов лабораторной работы. Кроме того, ручной труд при обработке пробы составляет приблизительно 70% стоимости тестирования.

Автоматизированная система с использованием маркировочных систем позволяет проводить контроль за образцами на всех этапах: от регистрации до утилизации. Это существенно снижает ошибки на этапе идентификации образцов и загрузки их в блок пробоподготовки, равно как и на всех последующих этапах, включая этап формирования протокола исследования.

Принципиальным является внедрение системы рутинного дозирования жидкостей, стандартизацию их объема во всех образцах, переноса из пробирки в пробирку и перемешивания. Это важно и с точки зрения нормализации концентрации ДНК с использованием наборов для проведения ПЦР, что значительно повышает качество работы на всех ее этапах.

Этап выделения нуклеиновых кислот требует выполнения трудоемких операций, чреват существенными потерями, негативно сказывающимися на результативности проводимого анализа. Автоматическая экстракция нуклеиновых кислот удовлетворяет потребности лаборатории в высокопроизводительной пробоподготовке, обеспечивает точность экстракции и технологическую безопасность.

Кроме того, автоматизация процесса позволяет минимизировать количества реагентов, необходимых для качественного выделения ДНК/РНК. Таким образом, существенно снижается стоимость и возрастает скорость данного этапа.

Переведение исследований в планшетный формат позволяет не только оптимизировать этап загрузки образцов, но и способствует увеличению производительности лаборатории в целом. Использование технологии горячего запаивания планшетов обеспечивает максимальную герметизацию, направленную на снижение риска выпаривания образцов, разрушения пробирки из-за ошибки пользователя, и обеспечивает максимальную защиту от контаминации внешней среды и кросс-контаминации образцов.

Преимущество «пакетного» исследования — экономия за счет готовой технологии изучения. Набор необходимых исследований определяется в зависимости от поставленных задач, например, развернутый анализ проблем репродукции, семейного бесплодия, привычного невынашивания беременности, использования вспомогательных репродуктивных технологий.

В результате в сжатые сроки клиницист получает развернутую лабораторную информацию о заявленной проблеме, что позволяет определить тактику ведения пациентов и сформировать наиболее эффективную схему лечения.

Кроме того, данный формат чрезвычайно важен с точки зрения реализации скрининговых и многопараметрических исследований. При этом принципиальным является снижение себестоимости одного параметра, по сравнению с аналогичными показателями в рамках анализа с использованием отдельных тест-систем.

Таким образом, современное развитие ПЦР в направлении полной автоматизации процесса позволяет максимально оптимизировать условия работы лаборатории, увеличить ее пропускную способность и повысить качество проводимых исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день метод ПЦР имеет огромное научное и прикладное значение, с его помощью были реализованы масштабные исследования в области медицины и биологии. Был совершен прорыв в диагностике широкого спектра инфекционных и генетических заболеваний, онкопатологий.

Накопленная за этот период времени информация позволила сформировать принципиально новый персонифицированный подход к комплексному обследованию пациентов и определить альтернативные варианты терапии с учетом их особенностей генотипа и популяционной принадлежности.

Итак, с момента возникновения идеи многократного увеличения числа копий искомой молекулы ДНК прошло сравнительно немного времени, тем не менее, технология ПЦР совершила гигантский рывок и стала неотъемлемой частью рутинной лабораторной практики, продолжая при этом совершенствоваться и развиваться.



### **Составитель:**

ведущий специалист ООО «ДНК-Технология», к.б.н. Зорина Виктория Владимировна

***Коллектив Компании «ДНК-Технология» благодарит Вас  
за сотрудничество и желает приятной работы!***

### **Адрес ООО «ДНК-Технология»**

г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125Ж, корп. 6

Тел./факс: (495) 980-45-55

E-mail: mail@dna-technology.ru





**ДНК-Технология**

Адрес офиса: 117587, г. Москва,  
Варшавское шоссе, д.125Ж, корп. 6,  
Бизнес центр «Меридио»

Адрес для писем: 117587, г. Москва, а/я 181  
телефон/факс: +7(495)980-45-55  
internet: [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)  
e-mail: [mail@dna-technology.ru](mailto:mail@dna-technology.ru)