

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра медицинской генетики

СУСПИЦЫН ЕВГЕНИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Методические указания для студентов

Темы для обсуждения:

1. Методы молекулярно-генетического анализа в диагностике инфекционных болезней.
2. Методы молекулярно-генетического анализа в диагностике наследственных заболеваний.
3. Молекулярная диагностика в онкологии.
4. Организация работы в лаборатории молекулярной диагностики.

1. Диагностика инфекционных болезней.

Обсуждаемые вопросы: правила забора материала и принципы пробоподготовки, определение бактерий, выявление резистентных штаммов, молекулярная эпидемиология (типирование штаммов), определение вирусов, грибов, паразитов.

Высокая чувствительность и специфичность методов ДНК-диагностики (в первую очередь, ПЦР и её модификаций) с каждым годом делает ее всё более востребованной в различных областях медицины.

Для большинства людей ДНК обычно ассоциируется с наследственностью, и, соответственно, наследственными болезнями. Между тем, наибольшее число всех ДНК-тестов осуществляется с целью диагностики инфекционных болезней. При этом ДНК служит в качестве надёжного биомаркера.

Как известно, все методы диагностики можно разделить на прямые и непрямые. Прямые методы направлены на непосредственное обнаружение возбудителя заболевания или его компонентов в материале, взятом для анализа. Непрямые - ориентируются на изменения, которые происходят в организме человека под действием микроорганизма – например, детектируют выработку специфических антител. ПЦР – яркий представитель первой группы.

Для того чтобы обнаружение микроорганизма в клиническом материале стало возможным, необходимо выбрать участок ДНК, который отличает интересующий нас вид микроба от тысяч других. Геномы многих болезнетворных бактерий и вирусов уже расшифрованы, и данные о структуре генов находятся в свободном доступе в Интернете. Специалисты в области ДНК-диагностики используют эту информацию для создания диагностических наборов, пригодных для рутинного использования в лаборатории.

Среди преимуществ ПЦР в первую очередь следует назвать быстроту получения результатов, чувствительность и специфичность. По всем этим позициям ПЦР даст фору большинству известных методов. Все этапы диагностики (выделение ДНК, постановка реакции и оценка полученных результатов) обычно укладываются в один рабочий день - уже на следующий день после сдачи материала можно получить ответ.

Чувствительность ПЦР уникальна для диагностических методов: даже единичные молекулы ДНК могут быть обнаружены. Однако это великолепное качество одновременно является и «ахиллесовой пятой» ПЦР. Так, если на каком-то этапе анализа произойдет загрязнение реакционной смеси посторонней ДНК, то высочайшая чувствительность может оказаться источником проблем, давая на выходе ложноположительный результат. Вместе с тем, в большинстве ПЦР-лабораторий соблюдаются строгие правила контроля качества, что позволяет избежать получения сомнительных данных.

Специфичность, то есть способность детектировать только интересующие нас организмы (то есть, иными словами, избежать получения ложноположительных результатов), также не вызывает претензий. Вместе с тем, потребность в специфичной диагностике влечет за собой необходимость заказа праймеров для каждой исследуемой позиции. А это означает, что в сравнении, скажем, с методом бактериологического посева,

нам необходимо иметь более ясное представление о возможных кандидатах на роль виновника заболевания. Иными словами, когда врач посылает материал на ПЦР-тест, он должен четко перечислить те позиции (конкретные названия микроорганизмов), обнаружение которых поможет в постановке или подтверждении диагноза.

Какие именно инфекции детектируются с помощью ПЦР? Прежде всего, это вирусы, которые недостаточно хорошо диагностируются другими методами. К тому же, появление такой модификации ПЦР как «ПЦР в реальном времени» дало возможность оценивать количество вирусных частиц. Это, в свою очередь, позволяет предсказать течение заболевания и вовремя начать лечение. ПЦР широко применяется для обнаружения вирусов гепатита (А, В, С и других), ветряной оспы, цитомегаловирусной и ротавирусной инфекции.

Еще одна обширная сфера применения – многочисленные инфекции мочеполового тракта (вызываемые уреплазмами, микоплазмами, хламидиями, трихомонадами, гарднереллами и т.д.), часто протекающие бессимптомно, но способные «аукнуться» проблемами в репродуктивной сфере. Новорожденные могут получить хламидийную инфекцию от матери при прохождении через родовые пути, вследствие чего в ранние сроки после рождения развиваются конъюнктивит, назофарингит или пневмония.

Хеликобактерную инфекцию (причину гастритов и язв), острые кишечные инфекции (шигеллы, патологические типы кишечных палочек), сальмонеллез, грибковые заболевания (кандидоз) также часто детектируют с помощью ПЦР.

ДНК-анализ мазка из носоглотки может помочь в уточнении причин острых респираторных заболеваний (коклюш, различные ОРВИ).

Очень важна своевременная диагностика токсоплазмоза – инфекции, чрезвычайно опасной для беременных, поскольку передача токсоплазм от матери плоду чревата тяжелыми последствиями вплоть до гибели последнего.

Ценные качества ПЦР востребованы и в диагностике микобактерий туберкулеза, учитывая, что традиционная бактериологическая диагностика может длиться от трех недель до трех месяцев. Особенно эффективна ПЦР-диагностика в случаях внелегочного туберкулеза, когда возбудитель редко обнаруживается микробиологическими методами.

Какие материалы пригодны для ПЦР-исследования? В принципе, для анализа пригоден любой материал: кровь, слюна, мокрота, кал, соскобы со слизистых оболочек, мазки и т.д. Однако, принимая решение о том, что именно брать на анализ, врач должен руководствоваться знаниями об особенностях развития конкретного заболевания. Иными словами, нужно ясно представлять, в каких биологических материалах вероятность обнаружить возбудителя велика, а в каких – близка к нулевой. Например, при подозрении на хламидийный конъюнктивит целесообразно взять соскоб с конъюнктивы глаза, а исследование образца крови будет, вероятнее всего, бесполезным.

Важно помнить, что ПЦР не дает информации о жизнеспособности обнаруженных микроорганизмов. Можно лишь с уверенностью утверждать, что та или иная специфическая ДНК есть в забранном материале. Поэтому иногда для получения более полной картины имеет смысл использовать и другие методы (посев, иммуноферментный анализ и т.д.). Зато, поскольку для ПЦР всё равно, живы анализируемые микроорганизмы или мертвы, реакция не очень требовательна к условиям хранения и транспортировки

2. Диагностика наследственных болезней.

Обсуждаемые вопросы: моногенные болезни, типы наследования, молекулярная диагностика моногенных заболеваний (примеры), хромосомные болезни, диагностика аномалий числа и структуры хромосом (примеры), диагностика моногенных болезней с нетрадиционными типами наследования (примеры).

Помимо инфекционной диагностики, у ПЦР еще множество точек приложения во всех областях биологии и медицины. Одна из самых важных – диагностика наследственных болезней. В первую очередь, востребована на практике диагностика моногенных заболеваний, вызванных дефектом в единственном гене, таких как муковисцидоз или фенилкетонурия. Данные о наличии мутаций используются для подтверждения диагноза, а также для определения вероятности рождения больного ребенка. С каждым годом все шире используются возможности пренатальной ДНК-диагностики хромосомных и генных болезней. Для этого с помощью инвазивных процедур (хорионбиопсия, амниоцентез) получают клетки плода. Кроме того, в последние годы появилась возможность неинвазивной пренатальной диагностики, основанной на анализе фетальной ДНК в крови матери. В практике специалистов по вспомогательным репродуктивным технологиям применяется предимплантационная генетическая диагностика, которая проводится на стадии бластоцисты, до переноса эмбриона в полость матки.

Вместе с тем, надо отметить, что многие наследственные заболевания обладают выраженной генетической гетерогенностью, то есть одинаковая (или схожая) клиническая картина может вызываться повреждением различных генов. В частности, причиной несиндромальной детской тугоухости может быть мутация в одном из не менее тридцати генов, а к развитию умственной отсталости могут быть причастны около 1000 генов! Очевидно, что в подобных ситуациях применение «точечных» ДНК-тестов редко приводит к успеху, то есть, установлению причины заболевания. По-видимому, в ближайшем будущем успех диагностики генетически-гетерогенных заболеваний будет связан с развитием различных модификаций высокопроизводительного секвенирования, позволяющих исследовать мутации в масштабах всего генома (около 25000 генов!) или значительной его части.

3. Молекулярная диагностика в онкологии

Обсуждаемые вопросы: механизм канцерогенеза, онкогены, антионкогены, признаки опухолевого роста, методы анализа молекулярных нарушений в опухолях, соматические мутации в опухолях, микросателлитная нестабильность, двухударная гипотеза Knudson, «потеря гетерозиготности».

Методическая база молекулярной биологии характеризуется исключительной сложностью и разнообразием. Мы кратко остановимся лишь на тех лабораторных подходах, которые имеют прямое или косвенное отношение к клиническим аспектам онкологической диагностики.

Основным методом молекулярной биологии по праву считается полимеразная цепная реакция (ПЦР; polymerase chain reaction, PCR), изобретённая Kary Mullis (род. 1944) в 1983 г. Принцип ПЦР основан на праймер-зависимой энзиматической амплификации фрагментов ДНК, позволяющей накапливать любую генетическую последовательность в неограниченных количествах. ПЦР не имеет предела чувствительности и специфичности, при этом данный метод является относительно доступным для рутинного применения. ПЦР используется для стандартного анализа генетических фрагментов на предмет обнаружения изменений нуклеотидной последовательности. Одна из разновидностей ПЦР – т.н. RT-PCR (reverse-transcriptase PCR) – применяется для анализа экспрессии генов; в данном случае на матрице клеточной РНК при помощи фермента обратной транскриптазы синтезируется копия комплементарной ДНК (кДНК), которая, в свою очередь, служит непосредственным материалом для ПЦР-анализа.

Помимо молекулярно-биологических методик, в лабораторной онкологии используются различные усовершенствования морфологических и цитогенетических

методов. Наибольшую популярность получил метод иммуногистохимии (ИГХ), позволяющий визуализировать белки при помощи специфичных меченых антител. К его преимуществам следует отнести относительную простоту и возможность анализировать локализацию белков-мишеней, к недостаткам – полуколичественный характер получаемых результатов. Активно внедряется в практику метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH: fluorescent *in situ* hybridization), основанный на комплементарном взаимодействии меченых генов-зондов с соответствующими участками хромосом. Этот подход применяется для выявления транслокаций и амплификаций генетического материала.

Большой резонанс получили разработки, направленные на системный анализ геномных изменений. Наибольшего прогресса достигла т.н. «транскриптомика», т.е. исследования изменений экспрессии в опухолях. Принцип соответствующих методик подразумевает гибридизацию тотальной клеточной РНК (кДНК) с полным набором генов человека, зафиксированном на крошечной пластинке – микрочипе. Интенсивность комплементарного связывания генов-зондов с генами-мишенями оценивается при помощи ультратонких сканеров; затем полученные результаты подвергаются сложнейшей компьютерной обработке, позволяющей выявить гипер- и гипозэкспрессируемые гены. Подобный подход позволяет идентификацию принципиально важных компонентов опухолевой прогрессии, однако его внедрение в клиническую практику на сегодняшний день остаётся затруднительным.

4. Организация работы в лаборатории молекулярной диагностики

Обсуждаемые вопросы: устройство лаборатории, контроль качества, ошибки при проведении молекулярно-генетического анализа

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:

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

При детекции методом гибридизации 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.

Передачу исследуемого материала в Рабочую зону 1 и проб при смежном расположении помещений Рабочих зон 1, 2, 3 желательнее 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.

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:

- 1) *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.
- 2) *Контаминация продуктами амплификации (ампликонами)*, имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются продуктами для реамплификации.
- 3) *Контаминация следовыми количествами ампликонов* лабораторной посуды, микродозаторов 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:

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

Необходимо подчеркнуть, что при правильной организации лабораторной деятельности возможность возникновения ПЦР-контаминации (а, следовательно, вероятность получения ложно-положительных результатов) сведена к минимуму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тищенко Л.И., Никитина Т.В. Методы амплификации нуклеиновых кислот: принципы и возможности. Учебно-методическое пособие. - СПб, 2008. – 92 с.
2. Горбунова В.Н., Пчелина С.Н., Шварцман А.Л. Введение в молекулярную медицину. Лекции в Политехническом. Изд-во Политехнического Университета, 2010 – 350 с.
3. ПЦР «в реальном времени» / Под ред. Д.В. Ребрикова. М.: Бинум Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.: ил.