

© А.Т. Третьяк, Л.П. Востокова,
А.Б. Чухловин

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный педиатрический
медицинский университет»
Минздрава России

Резюме. Обзорная статья
адресована врачам-педиатрам
и посвящена рассмотрению
общих подходов, методических
принципов и практических
возможностей применения методов
полимеразной цепной реакции
(ПЦР ДНК) в области клинической
лабораторной диагностики.
Обсуждается сравнительная
значимость иммунологической
(антигенной) диагностики
и ПЦР ДНК при выявлении
различных вирусных, протозойных
и бактериальных инфекций.
Приводятся отдельные примеры
использования ПЦР-диагностики
при разнообразных инфекционных
заболеваниях, в том числе —
вирусных гепатитах, заболеваниях,
передающихся половым путем,
некоторых зоонозах.

Ключевые слова: ДНК-диагностика;
иммунодиагностика; инфекционные
агенты; вирусные гепатиты;
заболевания; передающиеся
половым путем; зоонозы.

УДК: 616.9:577.21

РОЛЬ И МЕСТО ДНК-ДИАГНОСТИКИ В ИНФЕКЦИОННОЙ КЛИНИКЕ

ВВЕДЕНИЕ

Бурный прогресс в области молекулярной микробиологии в конце XX века сопровождался возникновением принципиально новых методов исследования, в особенности — полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК. Цель метода — выявление специфических последовательностей ДНК, размножение *in vitro* небольшого участка искомого гена и его регистрация различными способами [1, 7]. При этом изучаемый ген может принадлежать любым организмам, в том числе — микробам вирусам, грибам и т. д. Единственное условие точной диагностики — специфичность определяемого гена для искомого патогена. Поэтому метод ПЦР очень скоро нашел универсальное применение в медицине для ДНК-диагностики различных заболеваний. Методы молекулярной диагностики сегодня вошли в практику работы клинико-диагностических лабораторий самых различных лечебно-профилактических учреждений, в том числе и детских инфекционных больниц. Существует индустрия генных технологий и множество фирм, выпускающих диагностические наборы для генодиагностики, главным образом — вирусных патогенов. Имеются и широкие возможности для самостоятельного подбора праймеров и создания собственных систем для ПЦР-диагностики [11].

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) относится к гибридизационным методам анализа ДНК, основанным на комплементарном взаимодействии специфических полинуклеотидных зондов с искомой матрицей — цепями ДНК в реакционной смеси. Принцип ПЦР был разработан в начале 80-х годов прошлого столетия в США Кэри Маллисом в сотрудничестве с фирмой «Cetus». Практически осуществимые варианты ПЦР были разработаны фирмой «Рош» и начали широко применяться с 1987–89 гг. [4]. Гибридизация ДНК с ДНК-зондами является очень специфичным и универсальным методом молекулярной биологии.

В основе любой ПЦР лежит синтез *in vitro* фрагмента гена, согласно последовательности изучаемой ДНК, осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы (репликация ДНК). По своей сути — это искусственная репликация ДНК, которая представляет собой циклический процесс (до 40 циклов), который осуществляется в программируемом термостате («амплификаторе») и обычно занимает от 2 до 3 часов.

Каждый цикл ПЦР обычно включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах:

1-й этап: денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК) протекает при 99–95 °С в течение 30–40 сек.

2-й этап: гибридизация (отжиг) специфических ДНК-зондов, или праймеров, которая происходит комплементарно к нуклеотидным последовательностям на противоположных цепях ДНК в пределах границ конкретных участков гена. Для каждой пары праймеров характерна своя температура гибридизации в интервале 50–65 °С. Время отжига 20–60 сек.

3-й этап: копирование цепей ДНК по имеющимся участкам генов, начиная с точек присоединения праймеров. Данный этап идет с участием фермента ДНК-полимеразы при температуре 70–72 °С (20–40 с).

При этом образуются новые участки ДНК путем последовательного присоединения нуклеотидтрифосфатов (из смеси четырех основных ДНТФ).

Образовавшиеся в первом цикле копии участков ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В следующих циклах амплификации продукты ПЦР с предыдущих циклов служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, за 30–40 циклов происходит накопление этих одинаковых фрагментов генов (ампликонов), и в растворе накапливается до 10^6 таких молекул. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле или их выявление посредством флуоресцентной детекции [5].

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

1. Качественная оценка

Во многих случаях при ПЦР-диагностике достаточно получить ответ «да» или «нет», как, например, при первичном выявлении инфекционных возбудителей, судебно-медицинских исследованиях, определении генных мутаций, специфических онкогенов и др. Обычным способом разделения продуктов ПЦР и идентификации специфического гена является электрофорез в агарозном или (реже) — в полиакриламидном геле [1]. Специфический продукт ПЦР при этом виден как четкая полоска, находящаяся на уровне положительного контроля. Методики электрофоретического разделения достаточно стандартизированы и дают вполне воспроизводимые результаты.

Для учета результатов качественной ПЦР может быть использован и метод флуоресцентной детекции конечных продуктов реакции при ее положительном результате (так называемый «flash-метод»). Поскольку здесь нет необходимости и в электрофоретическом оборудовании, то очевидна существенная экономия рабочих зон и реагентов для лаборатории.

2. Качественная оценка результатов ПЦР

Методики количественной ПЦР были разработаны, прежде всего, для оценки динамики вирусных инфекций и эффективности проводимой терапии. Наиболее актуальны эти методы при обследовании пациентов с хроническими инфекциями (гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека и др.). При этом исходят из того, что накопление продуктов ПЦР (амплионов) пропорционально содержанию копий искомого гена в исследуемой пробе (например, в плазме крови или пораженных вирусом клетках).

Важным достижением в проведении количественной ПЦР стала разработка флуоресцентных ДНК-зондов, которые добавляются в реакционную смесь вместе с «обычными» праймерами и дают возможность отслеживания хода ПЦР во времени (так называемая real-time PCR), которая была в 1993–1994 гг. внедрена в соответствующих приборах и диагностических системах (принцип TaqMan). Существует несколько методов конструирования ДНК-зондов для количественной ПЦР. В настоящее время поиск специфических праймеров и флуоресцентных ДНК-зондов проводят с помощью специальных программных продуктов (например Bio-Premier или Primer Express).

Методология TaqMan предусматривает синтез флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеют по концам две метки. Одна из них — флуоресцентная молекула, другая — молекула-гаситель этой флуоресценции. Taq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивает нуклеотидную цепочку, но и разрушает связанный флуоресцентный зонд. При этом интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР растет пропорционально числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции в каждой пробирке (принцип “real-time”-ПЦР). В результате после 20–40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые. По калибровочным кривым с контрольными образцами (они есть в наборах такого рода) возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце [4].

ОБЩИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ДНК-ДИАГНОСТИКИ В ИНФЕКТОЛОГИИ

Во многих, особенно развивающихся, странах инфекционные заболевания являются причиной 63 % смертей в раннем возрасте [14]. Что касается развитых стран, то наибольший интерес и поддержку исследований там вызывают «новые», редкие или ранее забытые болезни, такие, как ВИЧ/СПИД, болезнь Лайма и туберкулез. Возможность выявлять и контролировать такие инфекции во многом зависит от эффективности детекции этих патогенов в лабораторных условиях. Медицинская бактериология базируется на двух основных подходах, а именно — идентификации и типировании конкретных инфекционных патогенов.

Общеизвестно, что многие инфекционные заболевания можно диагностировать с помощью методов классической микробиологии (культура микробных клеток, рост на селективных средах, морфологи-

ческие характеристики микроорганизмов). Однако в последние годы выяснилось, что более половины всех микробов не способны к росту в обычных культуральных средах. Особенно это касается бактерий, растущих в составе биоценозов (биопленок) полости рта, кишечника, мочевого тракта. Это резко снижает шансы на выявление многих микроорганизмов. Для обнаружения плохо культивируемых бактерий приходится искать в биоматериале специфические микробные антигены с помощью иммунотестов) или выявлять фрагменты их генов (ДНК-диагностика).

Поэтому ДНК-диагностика и иммунологическая диагностика являются взаимно дополняющими методами микробиологических исследований в тех ситуациях, когда классическая микробиологическая диагностика невозможна или затруднена.

До начала 1990-х гг. классическая иммунологическая диагностика была основным методом обнаружения множества вирусных, грибковых и бактериальных агентов. Наиболее популярно в клинике определение специфических антител в сыворотке крови (особенно IgM — показатель ранней фазы инфекции). Кроме того, при наличии высокоспецифичных антител проводится детекция искомого антигена (конкретного вирусного, грибкового или бактериального белка) в изучаемом биоматериале.

Однако за 20 лет, прошедших после внедрения методик ДНК-диагностики, генетическое тестирование стало широко применяться во всех областях клинической микробиологии. Теперь зачастую важен выбор оптимального типа тестирования данного патогена: классический, иммунологический метод — выявление специфического инфекционного антигена, или применение ПЦР- и/или ДНК-гибридизации — определение специфического участка гена данного микроорганизма.

Выявление специфического участка ДНК методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции. В то же время классические методы иммунодиагностики, например иммуноферментный анализ, также успешно выявляют белки-маркеры тех же инфекционных агентов.

Специфичность ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность ПЦР задается уникальной нуклеотидной последовательностью ДНК-зондов (ПЦР-праймеров), что исключает возможность получения ложнопозитивных результатов, в отличие от метода иммуноферментного анализа, где возможны ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

Метод ПЦР отличается также высокой чувствительностью, что позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сложно сделать. Чувствительность ПЦР-анализа составляет менее 10 генокопий в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов — 10^3 – 10^5 микробных клеток или вирусных частиц).

Как говорилось выше, метод ПЦР основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК с помощью специфичных ДНК-зондов (праймеров). Это дает возможность одновременно диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. Сейчас все чаще применяются мультиплексный анализ (детекция нескольких генов в одной реакционной смеси). В качестве источника нуклеиновых кислот может использоваться различный клинический материал (кровь, плазма, спинномозговая жидкость, моча, мокрота, соксыбы эпителиальных клеток и др.), а также биологические образцы из внешней среды (вода, почва и т. д.).

Весь процесс выделения ДНК/РНК, постановка и проведение ПЦР с детекцией продуктов реакции можно провести за 4–4,5 часа.

Очень важно, что ПЦР позволяет осуществить определение патогенного или дефектного гена в организме еще до развития заболевания. Например, при инфекциях в инкубационном периоде, т. е. серонегативной фазе или при латентном характере заболевания, что особенно актуально при диагностике гепатитов В и С, а также ВИЧ-инфекции. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых и некультивируемых форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при хронических инфекциях. Кроме того, возможно проведение ПЦР ДНК из архивного (фиксированного) материала (например, ДНК из парафиновых блоков).

Возможность сравнений и экспертизы

Полученные результаты ПЦР возможно вносить в компьютерные информационные носители или фотографии для объективной оценки при клинической экспертизе или сравнительных научных исследованиях [3].

В настоящее время отечественные фирмы-производители предлагают широкий выбор реагентов для ПЦР-диагностики более чем 50 различных инфекционных агентов. Однако многие молекулярно-биологические лаборатории имеют свою специализацию, методы и особенности работы, в зависимости от запросов тех клиник, с которыми они сотрудничают. Поэтому в дальнейшем пред-

Таблица 1

Наличие функциональных нарушений в структуре опорно-двигательной системы

Клинические группы	Определяемые возбудители	Материал
Гематология, онкология	Вирус герпеса простой, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, адено-вирус, парвовирус B19, <i>Toxoplasma gondii</i>	Кровь, костный мозг
Нервные болезни	Вирус герпеса простой, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус варicелла зостер, вирус клещевого энцефалита, энтеровирус, вирус JC, <i>Borrelia spp.</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Chlamidia trachom</i>	Кровь, цереброспинальная жидкость
Гастроэнтерология	H. <i>Pylori</i> , энтеровирус, ротавирус, вирусы гепатитов B и C	Соскоб слизистых, (стул)
Пульмонология и фтизиатрия	Герпесвирусы, респираторные вирусы <ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlamidia pneumoniae</i> • <i>Chlamidia trachomatis</i> • <i>Mycoplasma pneumoniae</i> • <i>M. tuberculosis</i> 	Мокрота, бронхальвеолярные смывы
ЛОР	Вирус папилломы, <i>B. pertussis</i>	Соскобы и биоптаты слизистых
Офтальмология	Вирус простого герпеса, хламидия трахоматис, адено-вирус	Соскобы слизистых
Гинекология,	<i>Chl. trachomatis</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalia</i> , <i>G. vaginalis</i> , <i>Trichom. vaginalis</i> , <i>Ur. urealytica</i> и др., папилломавирус, герпесвирусы <i>Toxoplasma gondii</i>	Соскобы эпителия, биоптаты
Дерматология	Патогенные грибы: <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Соскобы кожных покровов, ногтевые пластиинки
Стоматология	Бактерии пародонта (<i>P. gingivalis</i> и др.), <i>Str. mutans</i>	Зубной налет, материал из зубных каналов, ротовая жидкость
Нефрология	Цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирусы ВК, JC, <i>Proteus mirabilis</i>	Моча, биоптаты почек

ставляется уместным показать несколько типовых схем ПЦР-обследования для разных групп заболеваний (табл. 1).

ВИРУСНЫЕ ГЕПАТИТЫ В И С

Эти вирусы представляют собой большую опасность для реципиентов крови и гемокомпонентов. Поэтому в службе заготовки крови требуется как можно более ранняя диагностика этих инфекционных агентов у доноров крови.

Диагноз гепатита В ставится, как правило, по иммунологическим маркерам с помощью эффективных тест-систем на вирусные антигены (австралийский антиген и др.) и специфические антитела. Скрининговые исследования на гепатит С также начинаются с определения специфических антител, метод отличается достаточной чувствительностью и специфичностью. Однако вирусные гепатиты могут иметь длительный инкубационный период с серонегативным «окном», что делает малоэффективной раннюю иммунодиагностику гепатитов и ВИЧ-инфекции. Поэтому для службы заготовки крови разработаны тест-системы для ПЦР-диагностики данных инфекционных агентов, которые позволяют устанавливать факт виремии в течение первых недель после заражения

и своевременно отсеивать инфицированных доноров. В настоящее время в донорской службе началось применение роботизированных комплексов ряда фирм (Roche, Chiron), позволяющих в течение 5–6 часов выявлять образцы крови, содержащие вирусы гепатитов В, С и ВИЧ-1.

Общеизвестны опасности, связанные с ВИЧ-инфекцией. Основным направлением борьбы со СПИДом является его ранняя комплексная диагностика, что позволяет своевременно предотвратить передачу инфекции другим лицам и уменьшает риск развития симптомов иммунодефицита у ВИЧ-инфицированных больных. Как известно, первичный диагноз ВИЧ-инфекции основан на определении специфических антител в сыворотке крови, а также на выявлении антител и антигенов в мультиплексных тест-системах (метод иммуноблота). ПЦР-диагностика ВИЧ становится актуальной тогда, когда диагноз ВИЧ-инфекции уже подтвержден иммунологическими тестами. В ходе наблюдения за больными ВИЧ-инфекцией, а также гепатитами В и С необходимо регулярно оценивать уровни вирусной нагрузки (концентрации вирусных частиц в мл плазмы или на 1 млн лейкоцитов) с помощью количественной ПЦР.

ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ МОЧЕПОЛОВОЙ СФЕРЫ

Высокая заболеваемость населения инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), привлекает внимание различных специалистов всех стран. ВОЗ определила задачу борьбы с этими заболеваниями как наиболее приоритетную [2].

Как известно, к классическим венерическим заболеваниям относится сифилис. Лабораторная диагностика сифилиса обычно осуществляется иммунологическими методами, наиболее часто сейчас применяется RPR (Rapid Plasma Reagin Test) с сывороткой пациента. Другим частым заболеванием является гонорейная инфекция, которой, по экспертной оценке ВОЗ, в мире ежегодно заболевают свыше 200 млн человек. ДНК-диагностика сифилиса и гонореи применяется как дополнительный метод. О惬意ным материалом для диагностики мочеполовых инфекций являются соскобы эпителия из локально пораженных участков.

Широко распространенной инфекцией, передающейся половым путем, является трихомониаз, которым в мире ежегодно заболевают до 170 млн человек. Выявление трихомониаза осуществляется с помощью микроскопии, но ПЦР-диагностика также используется достаточно часто.

Особого внимания заслуживает хламидийная инфекция, частота которой в США и странах Скандинавии составляет 5% среди всех инфекций, передаваемых половым путем. Особое значение проблема хламидийных урогенитальных заболеваний приобретает в отношении охраны здоровья матери и ребенка. Передача возбудителя ребенку возможна в 40–60% случаев как при наличии, так и при отсутствии явных клинических проявлений инфекции у матери.

В последние десятилетия среди возбудителей неспецифических урогенитальных инфекций вопрос удельный вес микоплазм, которые играют особую роль в развитии урогенитальных заболеваний. Так, инфицирование уреаплазмами во время беременности повышает риск преждевременных родов, аномалий родовой деятельности и т. д., а также воспалительные процессы у новорожденных и детей раннего возраста.

Хламидийную и микоплазменную инфекции можно диагностировать классическими микробиологическими методами (микроскопия, культивирование), а также путем серологической диагностики (например — поиск антител класса IgM в сыворотке крови пациентов). Однако по ряду практических причин, основным методом диагностики всех перечисленных инфекций является полимеразная цепная реакция ДНК как скрининговый метод для

выявления уреа- и микоплазм. Обычно в панель для диагностики ЗППП входит *M. genitalium*, *M. Hominis* и *U. urealyticum*. Следует отметить, что наиболее патогенными считаются *Ureaplasma parvo* и T960. Поэтому их диагностику следует запросить отдельно в случаях множественного инфицирования различными инфекционными агентами. Наряду с этим следует применять методы иммунологической (антигенной и антителной) диагностики, а также культурального исследования с целью подтверждения диагноза, определения количества возбудителей в исследуемом материале, оценки чувствительности к антибиотикам.

Весьма серьезную медико-социальную проблему представляет герпетическая инфекция, которая является одной из самых распространенных вирусных инфекций человека. Существуют два основных типа простого герпеса: «оральный» (ВПГ1) и «генитальный» (ВПГ2). В мире ежегодно регистрируется до 20 млн случаев генитального герпеса, который представляет наибольшую опасность для развивающегося плода. Обладая нейродермопропизом, вирус простого герпеса поражает не только кожу и слизистые оболочки, но и центральную нервную систему, вызывая менингиты и энцефалиты, особенно у детей младших возрастных групп и при иммунокомпромиссных состояниях. Кроме того, при активной герпетической инфекции развиваются заболевания мочеполовой сферы у мужчин и женщин.

ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМЫ И ПОЛИОМЫ: РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ ДЕТСКОГО И ЖЕНСКОГО ОРГАНИЗМА

Особую значимость в последние годы приобрела проблема заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека, что обусловлено его высокой контагиозностью, широкой распространностью и онкогенным потенциалом. Максимальная заболеваемость папилломавирусной инфекцией наблюдается в возрасте от 18 до 28 лет. В настоящее время насчитывается свыше 60 типов вирусов папилломы человека, в том числе высокого онкогенного риска [6]. Так как прогрессирование ВПЧ-ассоциированных предраковых состояний в инвазивный рак шейки матки происходит в течение ряда лет, программы ранней лабораторной диагностики рака шейки матки основаны на данных цитоморфологических методов исследования, ДНК-диагностики ВПЧ, с выявлением типов вирусов высокого онкогенного риска (типы 16, 18 и др.).

Вирусы полиомы (главным образом — ВК) также относятся к длительно персистирующем вирусам и играют определенную роль в развитии цисти-

тов и поражении почечной паренхимы [9]. Вирус ВК был впервые обнаружен в моче больного, у которого после трансплантации почки развился стеноз мочеточника, и он получил свое название по инициалам больного (В.К.). Чаще всего этот полиомавирус в течение жизни находится в латентном состоянии с момента первичной инфекции, возникающей в детском возрасте при заражении через дыхательные пути.

Больные после трансплантации почек (ТП) находятся в группе риска по реактивации различных вирусов, в частности полиомавирусов, которые обладают повышенной тропностью к почечным клеткам. Так, вирус ВК, размножаясь в клетках почечных канальцев, приводит к нефропатии и утрате функции почечного трансплантата у значительной части (1–10%) больных.

Нарушения антивирусного иммунного надзора при иммunoсупрессивном лечении приводят к активации вируса, прежде всего в почках, почечных канальцах и уротелии. ВК-ассоциированная нефропатия наблюдается обычно в течение 1-го года при иммunoсупрессивной терапии, например после трансплантации почек и приводит к потере функции трансплантата у значительной части пациентов.

Вирус JC также относят к полиомавирусам, и он поражает главным образом нервные ткани. Поэтому его активацию часто связывают с развитием прогрессивной мультифокальной энцефалопатии, в связи с чем неврологи иногда предпринимают поиск вируса JC в спинномозговой жидкости. Цитологический анализ мочи позволяет заподозрить вирусную инфекцию клеток уротелия по наличию специфических включений (decoy cells). Однако главным методом диагностики вирусов ВК и JC является ПЦР со геноспецифическими праймерами, позволяющий проводить как качественную, так и количественную диагностику вирурии.

КОМПЛЕКС ИНФЕКЦИЙ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ДЛЯ ПЛОДА

За последние 50 лет сложилось представление о нескольких инфекциях у беременных женщин, опасных для эмбриона и развивающегося плода. С учетом данных мировой статистики, по старой традиции к ним отнесены: токсоплазма, вирусы краснухи, цитомегаловирус и простого герпеса (чаще всего — ВПГ типа 2), сокращенно именуемые TORCH-комплексом. Кроме того, потенциально опасными для плода патогенами являются некоторые хламидии, микоплазмы, а также, безусловно, ВИЧ-1, возбудитель сифилиса и вирусы гепатитов В и С. Все эти микробные и вирусные патогены можно обнаруживать как иммунологическими ме-

тодами, так и с помощью ДНК-диагностики. Более традиционной и отработанной является иммунологическая диагностика, прежде всего по наличию специфических сывороточных антител в диагностических титрах. Этот подход применяется, в первую очередь, для диагностики краснухи, вирусных гепатитов, ВИЧ-1, сифилиса. ПЦР-диагностика этих вирусов применяется в качестве дополнительного метода на последующих этапах обследования. Что касается хламидийных и микоплазменных инфекций, то в их поиске применимы и культуральные методы, и детекция специфических антигенов (методом иммunoфлуоресценции), и ДНК-диагностика (выявление специфических участков генов). Сочетание иммунологических и молекулярно-биологических методов используется и для диагностики герпесвирусных инфекций. Грамотный врач будет стремиться использовать, по меньшей мере, два независимых метода для подтверждения диагноза TORCH-инфекций.

РОТАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Желудочно-кишечные заболевания являются ведущей причиной детской смертности в мире. Среди них особое место занимают вирусные кишечные инфекции, в особенности ротавирусные заболевания [12]. Обычно при нарастании числа больных в очаге инфекции быстро появляются данные эпидемиологов о родовой принадлежности данного вируса. Поэтому одним из наиболее достоверных и быстрых методов диагностики является ПЦР, которая выявляет типичные для данного региона вирусы (например ротавирус группы А). Вирусную РНК выделяют чаще всего из стула пациентов с помощью специальных методик, которые позволяют устранить примеси, подавляющие процесс ПЦР. Молекулярно-биологическая диагностика ротавирусной инфекции применяется наряду с хорошо известными серологическими методиками.

ЭНТЕРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Энтеровирусные инфекции — наиболее частая причина асептического менингита у младенцев. Во всем мире отмечаются вспышки этих инфекций, особенно в летнее время. Основной путь передачи — фекально-оральный или воздушно-капельный. Из них наиболее частыми возбудителями являются вирусы Коксаки В и ЕCHO. Так, одно из ранних исследований подобного рода касалось анализа вспышки энтеровирусной инфекции асептического менингита в регионе Рейн-Майн в 1997 г. [13]. Авторы исследовали несколько случаев энтеровирусной инфекции у 16 детей младшего возраста (от 3 до 11 лет). Клиническое течение заболевания

было благоприятным, с хорошими исходами. Болезнь проявлялась в неврологической симптоматике и поражении ЦНС (головные боли, тошнота, рвота, менингеальные симптомы и судороги). Лабораторные диагнозы проводились с образцами стула и ЦСЖ, причем вирусологический метод (выделение возбудителя) и ПЦР-диагностика оказались более эффективными, чем серологические методы.

ПАРВОВИРУСНАЯ ПАТОЛОГИЯ

В 1975 г. Ивонна Коссарт обнаружила патогенный вирус B19, который оказался причиной целого ряда заболеваний человека. Этот вирус является этиологическим агентом инфекционной эритемы («пятой болезни») — заболевания детского возраста, протекающего с лихорадкой и сыпью. У взрослых парвовирусная инфекция может сопровождаться признаками эритроидной аплазии и другими признаками поражения костного мозга [15]. В связи с этим важной задачей является выбор стандартного метода диагностики на основе серологических или молекулярно-биологических тестов. В большинстве случаев наиболее пригодны для такой диагностики ИФА-тесты, которые в большинстве случаев вполне эффективны в случаях предполагаемой парвовирусной инфекции. Однако иммунологическая диагностика во многих случаях подлежит уточнению с помощью ПЦР.

ТОКСОПЛАЗМОЗ

Данное заболевание, вызываемое микроорганизмом *Toxoplasma gondii* и является одним из наиболее частых зоонозов. Этот паразит может инфицировать практически всех млекопитающих, однако только у кошек токсоплазмы могут проходить полный цикл полового и бесполого размножения [8]. Частота выявления *T. gondii* среди людей различна в отдельных странах и местностях. Кроме того, токсоплазмоз может передаваться внутриутробно и поэтому опасен для младенцев. Человек заражается при попадании в организм ооцист, чаще всего — при контакте с выделениями кошек. В дальнейшем из ооцист образуются тахизоиты, которые проникают в различные ткани и органы, а у беременных — в плаценту, что приводит к внутриутробному заражению. Наибольшая опасность заражения токсоплазмозом связана с выделениями кошек, особенно молодых животных (например, при уборке мест содержания котят, садовые работы в загрязненной почве). Токсоплазмоз у взрослых в 90 % случаев протекает бессимптомно, но у больных может развиться преходящая лимфаденопатия или мононуклеозоподобное заболевание. Диагностика токсоплазмоза чаще всего осуществляется по наличию специфических антитоксоплазменных антител класса IgM. Соответствующие наборы

для ИФА производятся, рядом отечественных и зарубежных фирм. При анализе биоптатов могут применяться методы выявления токсоплазменных антигенов (метод иммунофлуоресценции и др.). Кроме того, разработана и широко применяется в клинике высокочувствительная методика выявления специфической ДНК *T. gondii* методом полимеразной цепной реакции. Как показывает наш опыт совместной работы с НИИ детской гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, частота выявления ДНК токсоплазмы в крови детей существенно возрастает после интенсивной цитостатической терапии по поводу онкогематологических заболеваний.

МИКОПЛАЗМОЗ И ЗАБОЛЕВАНИЯ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Как показывают исследования последних лет, *M. pneumoniae* является существенным этиологическим фактором развития пневмоний (возможно, и энцефалитов) в детском возрасте. *M. pneumoniae* в тропических странах, по-видимому, является причиной тяжелых респираторных заболеваний у детей младших возрастов, судя по данным литературы [16]. По оценкам авторов, данная инфекция может составлять 20–40 % всех нозокомиальных случаев пневмонии в тропических странах. Успешное лечение проводится с помощью антибиотиков-макролидов. В связи с этим необходимо обратить внимание клиницистов и микробиологов на необходимость применения адекватной диагностики пневмоний, вызываемых микоплазмами. Среди этих методов полимеразная цепная реакция ДНК *M. pneumoniae* является наиболее удобным методом ее выявления в мокроте и бронхиальных смыках. Наиболее часто этот инфекционный агент определяется в пульмонологической практике. Для одновременной ПЦР-диагностики *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* отечественные фирмы выпускают соответствующие тест-системы. Детекцию специфических генов проводят в образцах ДНК, экстрагированных из мокроты или бронхоальвеолярного лаважа.

ЛЯМБЛИОЗ

К потенциально опасным паразитарным кишечным инфекциям относится также лямблиоз (возбудитель — *Giardia lamblia*), встречающиеся у кошек, собак, грызунов и других домашних животных. Описаны случаи передачи их человеку, хотя частота такого переноса остается неизвестной. Лабораторная диагностика криптоспоридиоза и лямблиоза, основана на выявлении микроорганизмов в образцах из желудочно-кишечного тракта. Выявление активной лямблиозной инфекции

может проводиться по наличию специфических иммуноглобулинов (например, с помощью системы «Лямблия-IgM-стрип», фирма «Вектор-Бест»). Недавно разработаны и внедряются в клинике методы ПЦР-диагностики лямблей в образцах стула и соскобах слизистой кишечника.

ЛЕПТОСПИРОЗ

Это заболевание вызывается патогенными лептоспиралами (*Leptospira interrogans*) и является одним из самых частых зоонозных заболеваний в мире. Микроорганизмы рода Лептоспира переносятся большим числом диких и домашних животных [8]. Кошки инфицируются лептоспиралами чаще, чем собаки. Человек может заразиться при купании или питье некипяченой загрязненной воды. Инфекция человека часто протекает бессимптомно, но в некоторых случаях патоген может появиться в крови, вызвать разрушение эритроцитов (гемолиз), высокую лихорадку, сильные головные боли, гепатит, желтуху, поносы, в тяжелых случаях — поражение почек или сердечную недостаточность. Диагностика лептоспироза обычно проводится по накоплению антител к лептоспире (серологические методы). В ветеринарии применяются наборы для серологической диагностики методом латекс-агглютинации (производство фирмы НАРВАК, Москва). Возможно также применение ПЦР-тест-систем для выявления патогенных типов лептоспир (фирмы НАРВАК, Интерлабсервис, БиоКом).

ТУБЕРКУЛЕЗ

Бактерии туберкулеза выявляют методами ПЦР ДНК, полученной из локально взятого биоматериала (например, спинномозговой жидкости, смывов из бронхов). Туберкулезный менингит встречается главным образом в детском возрасте, тогда как легочный и костный туберкулез более характерны для взрослых [10]. Лабораторная диагностика ТБК менингита включает в себя анализ клеточности СМЖ (лимфоцитарный, снижение уровней глюкозы до <50%). Существует признанный ныне метод иммунотестирования, основанный на продукции гамма-интерферона *in vitro* при инкубации лейкоцитов со специфическим антигеном. Однако наиболее специфичная диагностика бактерий туберкулезного комплекса проводится посредством ПЦР ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекционные заболевания периода новорожденности и младшего возраста создают предпосылки для ослабления организма и возникновения коморбидных состояний. В этом плане важнейшей задачей становится своевременная диагностика ин-

фекций перинатального периода и у детей старших возрастных групп. Соответствующая лабораторная диагностика должна, наряду с классическими микробиологическими методами, включать в себя иммунологическую диагностику и методы ДНК-диагностики (в основном — полимеразную цепную реакцию ДНК). Особенную важную роль играет генотипирование патогенных микробов и вирусов для решения эпидемиологических задач в эпидемических очагах, с целью поиска источника заболевания и оценки его биологических характеристик [6]. Порядок применения этих видов исследований зависит от возможности культивирования данного патогена, стадии инфекционного процесса, задач мониторинга его течения и ответа на специфическую терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир. — 2002. — С. 589.
2. Кулаков В.И. Инфекции, передаваемые половым путем — проблема настоящего и будущего // Акушерство и гинекология. — 2003. — № 3. — С. 3–6.
3. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы (т. 1 и 2). — М.: Наука, 2005. — С. 530.
4. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени». — М: БИНОМ. Лаборатория Знаний, 2009. — С. 223.
5. Телков М.В. Кари Маллис, изобретатель ПЦР // Химия и жизнь. — 2006. — № 8. — С. 6–9.
6. Тотолян А.А., Чухловин А.Б. Генодиагностика возбудителей инфекционных заболеваний и поиск специфических «генов риска» // Клин. лабор. диагн. — 2005. — № 7. — С. 21–36.
7. Чухловин А.Б. Клиническая значимость молекулярно-биологической диагностики // Ученые записки СПбГМУ. — 2010. — Т. 17, № 1. — С. 62–68.
8. Чухловин А.Б. Общие инфекции человека и домашних кошек // Terra Medica Nova. — 2008. — № 3. — С. 41–47.
9. Чухловин А.Б., Эмануэль В.Л. Молекулярно-генетическая диагностика при нефрологических и урологических заболеваниях. (Пособие для врачей). СПб: изд. СПбГМУ им.И. Павлова, 2012. — С. 36.
10. Galimi R. Extrapulmonary tuberculosis: tuberculous meningitis new developments // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. — 2011. — Vol. 15. — P. 365–386.
11. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // Genomics. — 2011. — Vol. 98. — P. 137–144.
12. Khan M.A., Bass D.M. Viral infections new and emerging // Curr Opin Gastroenterol. — 2010. — Vol.26. — P. 26–30.

13. Kieslich M., Acconci D., Berger A., Jarisch A., Böhles H. et al. Diagnosis and outcome of neurotropic enterovirus infections in childhood // *Klin. Paediatr.* – 2002. – Vol. 214. – P. 327–331.
14. Millar B.C., Xu J., Moore J.E. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 21–39.
15. Peterlana D., Puccetti A., Corrocher R., Lunardi C. Serologic and molecular detection of human parvovirus B19 infections // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 372. – P. 14–23.
16. Vervloet L.A., Marguet C., Camargos P.A. Infections by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias // *Braz. J. Infect. Dis.* 2007. – Vol. 11. – P. 507–514.

ROLE AND PLACE OF DNA DIAGNOSTICS IN INFECTION CLINICS

Tretjak A. T., Vostokova L. P., Chukhlovin A. B.

◆ **Resume.** The review article is addressed to general pediatricians. It considers common approaches, technical principles and applications of DNA polymerase chain reaction (PCR) usage in clinical microbiology. Comparative significance of immunological (antigen-based) and PCR/nucleic acid based diagnostics for detection of various viral, protozoan and bacterial infections is discussed. PCR applications are considered for diagnostics of different infectious diseases, e.g., viral hepatitis, sexually transmitted diseases, some zoonotic infections.

◆ **Key words:** DNA diagnostics; immune diagnostics; infectious agents; viral hepatitis; sexually transmitted diseases; zoonoses.

◆ Информация об авторах

Третьяк Анна Тимофеевна – научный сотрудник, лаборатория молекулярной диагностики с расширенной группой по экогенетике НИЦ. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: a.t.tretiak@gmail.com.

Востокова Любовь Павловна – научный сотрудник, лаборатория молекулярной диагностики с расширенной группой по экогенетике НИЦ. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: vostokova50@mail.ru.

Чухловин Алексей Борисович – д.р. мед. наук, профессор, зав. лабораторией молекулярной диагностики с расширенной группой по экогенетике НИЦ. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: alexei.chukh@mail.ru.

Tretjak Anna Timofeevna – Senior Research, Laboratory of Molecular Diagnostics with a group for Ecogenetics, Research Center. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya st., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: a.t.tretiak@gmail.com.

Vostokova Lubov Pavlovna – Senior Research, Laboratory of Molecular Diagnostics with a group for Ecogenetics, Research Center. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya st., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: vostokova50@mail.ru.

Chukhlovin Aleksey Borisovich – PhD, MD, Dr Med Sci, Professor, Head, Laboratory of Molecular Diagnostics. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya st., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: alexei.chukh@mail.ru.