



СПРАВОЧНИК  
ЗАВЕДУЮЩЕГО КДЛ

«АКТИОН» МЦФЭР

# Молекулярно-биологические исследования

Практическое пособие



## СОДЕРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| Метод дифференциального определения числа ТА-повторов<br>в промоторе гена UGT1A1<br><b>Комова Е.Г., Прасолова М.А., Иванов М.К., Кокорина О.С., Зимина Н.В.,<br/>Форат О.Н., Аллахвердян А.А.</b>          | 2  |
| Молекулярная диагностика этиологии сепсиса и проблемных<br>госпитальных инфекций у детей<br><b>Черневская Е.А., Белобородова Н.В., Дмитриева И.Б., Павлушкина Л.В.,<br/>Налбандян Р.Т.</b>                 | 15 |
| Молекулярная диагностика этиологии сепсиса и проблемных<br>госпитальных инфекций у детей<br><b>Черневская Е.А., Белобородова Н.В., Дмитриева И.Б., Павлушкина Л.В.,<br/>Налбандян Р.Т.</b>                 | 24 |
| Опыт использования систем генетического анализа<br>на основе технологии пиросеквенирования<br><b>Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А.</b>   | 33 |
| Современные методы молекулярной диагностики урогенитальной<br>хламидийной и гонококковой инфекции<br><b>Чернышева Л.А., Гушин А.Е.</b>   | 43 |
| Применение технологии биочипов в лабораторной диагностике<br>и клинической практике<br><b>Маркелов М.Л., Савинов Г.В.</b>  | 55 |
| Диагностические возможности метода ПЦР в режиме<br>реального времени для оценки биоты и локального<br>воспаления в тканях урогенитального тракта<br><b>Болдырева М.Н., Байрамова Г.Р., Бурменская О.В.</b> | 71 |



---

## ПОВЫШЕНИЕ КВАЛИФИКАЦИИ

---

# Метод дифференциального определения числа ТА-повторов в промоторе гена UGT1A1

**Е.Г. Комова**

канд. биол. наук, науч. сотр.,

**М.А. Прасолова**

ст. науч. сотр.,

**М.К. Иванов**

канд. биол. наук, заведующий лабораторией

Лаборатория ПЦР АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск,

**О.С. Кокорина**

врач – лабораторный генетик,

**Н.В. Зимина**

врач-генетик

ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», г. Москва,

**О.Н. Форт**

врач – лабораторный генетик,

**А.А. Аллахвердян**

врач – лабораторный генетик

Лаборатория молекулярно-генетических исследований человека,  
технологический департамент ООО «ИНВИТРО-Сибирь», г. Новосибирск

---

*Определение числа ТА-повторов в промоторе гена UGT1A1 имеет ключевое значение в диагностике синдрома Жильбера, довольно распространенного (5–7% среди европеоидов) состояния, для которого характерна гипербилирубинемия. Наиболее часто встречающимся дефектным аллелем, характерным для европеоидов и ассоциированным с развитием синдрома Жильбера, является UGT1A1\*28, содержащий 7 ТА-повторов. Аллель UGT1A1\*37, включающий 8 ТА-повторов, встречается реже и тоже приводит к снижению активности фермента в 1,5–2 раза. Другой редкий ал-*

лель, который повышает активность промотора, UGT1A1\*36 содержит 5 ТА-повторов. Дифференциальное определение всех вариантов числа ТА-повторов актуально не только при диагностике синдрома Жильбера, но может использоваться также для оценки эффективности применения и токсичности ряда лекарственных препаратов, метаболизирующихся продуктом гена UGT1A1. В работе описан способ выявления аллелей UGT1A1\*1, UGT1A1\*28, UGT1A1\*36, UGT1A1\*37, соответствующих 5–8 ТА-повторам промотора гена UGT1A1, основанный на анализе кривых плавления продуктов асимметричной ПЦР с аллель-специфичными флуоресцентно мечеными зондами.

---

### **Причины накопления непрямого билирубина при синдроме Жильбера**

Ген UGT1A1 кодирует уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазу – фермент второй фазы метаболизма ксенобиотиков, который осуществляет реакцию конъюгирования различных соединений с глюкуроновой кислотой [1, 6]. Билирубин представляет собой конечный продукт распада гема. Основная часть (80–85%) билирубина образуется из гемоглобина, и лишь небольшая часть – из других гемсодержащих белков, например цитохрома P450 [6]. При конъюгировании билирубина (непрямого, неконъюгированного) образуется его глюкуронид (прямой, конъюгированный). Нарушение процесса конъюгации при гипербилирубинемии приводит к накоплению непрямого билирубина. Непрямой билирубин проникает в митохондрии, где разобщает дыхание и окислительное фосфорилирование, нарушает синтез белка, поток ионов калия через мембрану клетки и органелл. Это отрицательно сказывается на состоянии ЦНС, вызывая у больных ряд характерных неврологических симптомов [6].

Заболевание, позже названное синдромом Жильбера в честь одного из первооткрывателей, впервые было описано в 1901 г. французскими терапевтами Augustine Gilbert и Pierre Lereboullet. При этом синдроме содержание билирубина в плазме крови повышено, но, как правило, не превышает 85 мкмоль/л (верхняя граница референтного предела – 17 мкмоль/л), с преобладанием непрямой фракции. Активность аминотрансфераз и гемоглобина находятся в пределах нормальных значений [6]. Повышение билиру-

бина проявляется периодически, особенно в моменты обострения других заболеваний и физического перенапряжения. Поскольку *UGT1A1* участвует в глюкуронидации ряда лекарственных препаратов, при приеме глюкокортикоидов, анаболических стероидов, ампициллина, стрептомицина, рифампицина, парацетамола и некоторых других препаратов возможно развитие токсических реакций, и зачастую в этот период и происходит манифестация синдрома Жильбера. Также синдром Жильбера может проявиться после длительного голодания или низкокалорийной диеты. Частота встречаемости данного синдрома составляет 5–7% среди европейского населения, значительно выше у афроамериканцев [7].

Одна из причин накопления непрямого билирубина – генетические дефекты гена *UGT1A1*. В промоторе этого гена находится область ТА-повторов, количество которых варьирует от 5 до 8, а увеличение приводит к снижению уровня экспрессии гена и активности белка [8].

Согласно номенклатуре *UGT1A1* [3], нормальным аллелем является *UGT1A1\*1*, который содержит мотив A(TA)<sub>6</sub>TAA, включающий 6 повторов ТА (далее 6 ТА). Наиболее часто встречающийся дефектный аллель у европеоидов – *UGT1A1\*28*, который содержит 7 ТА-повторов.

к сведению

Также описаны аллели *UGT1A1\*36* – 5 ТА и *UGT1A1\*37* – 8 ТА. Активность промотора *in vitro* снижена в 1,5–2 раза при 7 ТА и 8 ТА относительно нормы и в 2 раза выше при 5 ТА [8]. Согласно данным литературы, аллели \*36 и \*37 характерны для афроамериканцев (3,5 и 7–8% соответственно), а среди европеоидов встречаются с частотой менее 1% [8]. Для определения метаболического статуса пациента важно выявление всех аллелей, поскольку их сочетание определяет общую активность фермента *UGT1A1*. Так, у носителей генотипа 6 ТА/8ТА активность фермента снижена относительно активности, обусловленной нормальным генотипом 6 ТА/6 ТА. У носителей же 5 ТА/8 ТА активность *UGT1A1* не будет отличаться от нормальной, несмотря на то, что пациент является носителем одного аллеля 8 ТА со сниженной активностью.

## Определение дефектов гена *UGT1A1*

Для определения всех вариантов числа ТА-повторов в работе были исследованы образцы (кровь и буккальный эпителий) неродственных добровольцев – 496 жителей Новосибирска (женщин – 52%, мужчин – 48%), представляющих популяционную выборку. ДНК выделяли с помощью набора реагентов «РеалБест Экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) из 100 мкл суспензии буккального эпителия либо из 50 мкл цельной крови.

С помощью онлайн-программы OligoAnalyzer (IDT, Inc., <http://eu.idtdna.com>) осуществляли дизайн праймеров, специфичность проверяли в системе BLAST. Для выявления аллелей использовали две реакционные смеси (РС), содержащие все компоненты, необходимые для проведения ПЦР, РС-1 содержала зонды для выявления аллелей *UGT1A1*\*1, \*28, \*36, а РС-2 – праймеры и зонд для выявления *UGT1A1*\*37. ПЦР проводили на амплификаторе с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) при температурном режиме: 50 °С – 2 мин; 95 °С – 1 мин; 94 °С – 10 с (50 циклов), 60 °С – 20 с; плавление продуктов амплификации с 27 до 75 °С с шагом в 1 °С, инкубация 5 с на каждом шаге и регистрация флуоресценции в каналах FAM и HEX.

Общий принцип использованного метода описан ранее [5]. Он заключается в амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. В данной работе ввиду необходимости выявления четырех аллельных вариантов схема анализа была модифицирована. Каждый образец исследуют в двух разных РС. В РС-1 присутствуют два флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зонда, конкурирующих друг с другом. Зонд с флуорофором FAM соответствует по нуклеотидной последовательности аллелю с 7 ТА, в случае присутствия аллеля с 7 ТА в данном образце фиксируется самое высокое значение температуры плавления комплекса ампликон-зонд. Последовательность зонда FAM имеет с аллелями 6 ТА и 8 ТА несоответствия на два нуклеотида; в этих случаях фиксируется температура плавления на несколько градусов ниже, чем для аллеля с 7 ТА. Последовательность аллеля с 5 ТА

отличается от зонда FAM на 4 нуклеотида, и образующийся ДНК-дуплекс имеет самое низкое значение температуры плавления. По результатам анализа кривой плавления, регистрируемой в канале FAM в РС-1, можно различить три варианта пиков плавления, соответствующие следующим группам генотипов: 1) есть аллель с 7 ТА в гомо- или гетерозиготе; 2) нет аллеля с 7 ТА, но присутствуют 6 ТА и/или 8 ТА; 3) присутствует аллель с 5 ТА (рис. 1А).

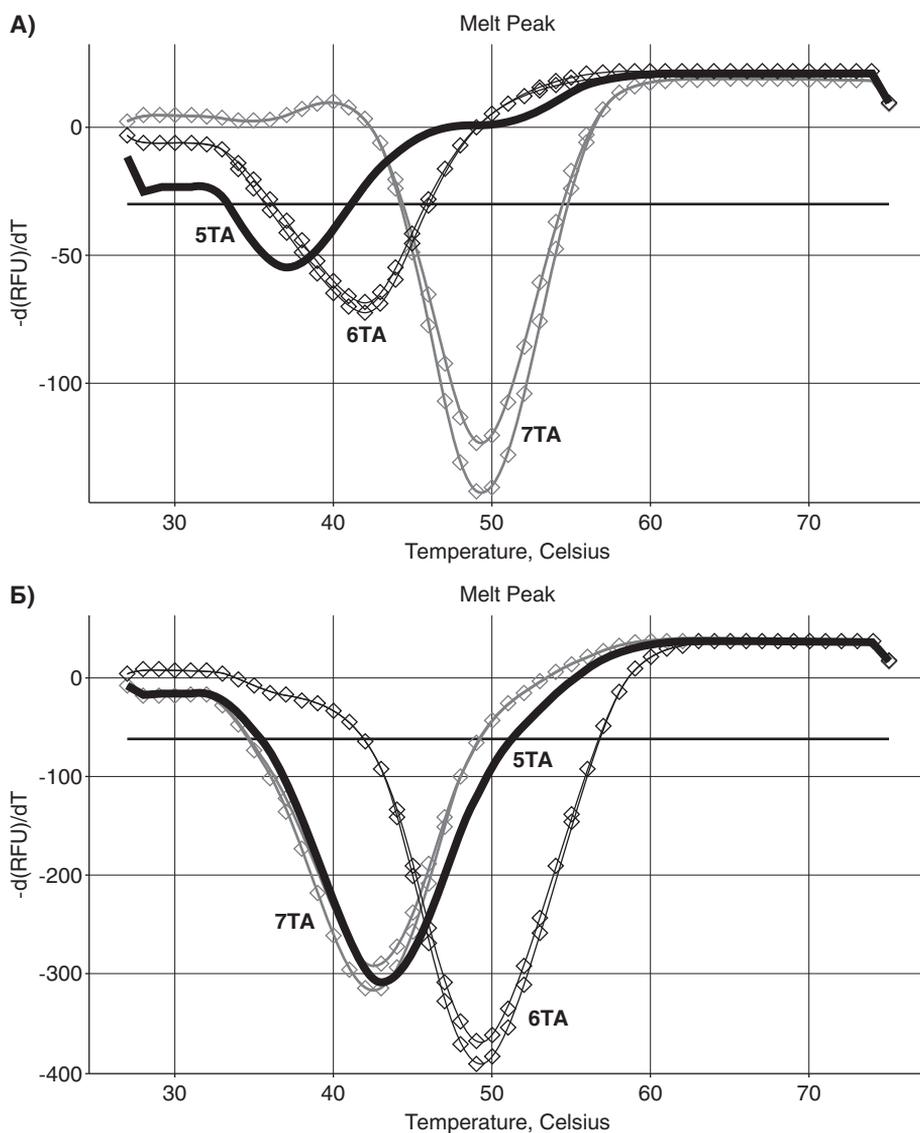
Зонд с флуорофором HEX в РС-1 соответствует по нуклеотидной последовательности аллелю с 6 ТА (норма); в случае присутствия аллеля с 6 ТА в данном образце фиксируется большее значение температуры плавления комплекса ампликон-зонд. Все варианты мутантных аллелей (содержащих 5 ТА, 7 ТА и 8 ТА повторов) отличаются от зонда HEX, и комплекс зонда с ними имеет меньшее значение температуры плавления, чем в случае присутствия аллеля с 6 ТА. По результатам анализа кривой плавления, регистрируемой в канале HEX в РС-1, можно различить два варианта пиков плавления, соответствующие следующим группам генотипов: 1) есть аллель с 6 ТА в гомо- или гетерозиготе; 2) нет аллеля с 6 ТА, присутствуют один или два аллеля с 5 ТА, 7 ТА, 8 ТА (рис. 1Б).

Зонд в РС-2, меченный флуорофором FAM, соответствует по нуклеотидной последовательности аллелю с 8 ТА; в случае присутствия аллеля с 8 ТА в данном образце фиксируется самое высокое значение температуры плавления комплекса ампликон-зонд. Комплекс зонда с аллелем с 7 ТА содержит несоответствие по 2 нуклеотидам и имеет меньшую температуру плавления; комплекс с 6 ТА – несоответствие 4 нуклеотидов, и в этом случае температура плавления еще ниже; комплекс зонда с 5 ТА аллелем имеет несоответствие на 6 нуклеотидов, и его образование не детектируется. По результатам анализа в РС-2 можно различить три варианта пиков плавления, соответствующие следующим группам генотипов: 1) есть аллель с 8 ТА; 2) нет аллеля с 8 ТА, но есть с 7 ТА; 3) нет 7 ТА и 8 ТА, но присутствует аллель с 6 ТА (рис. 1В). Итоговый генотип определяется комбинацией результатов по каналам FAM и HEX в РС-1 и по каналу FAM в РС-2.

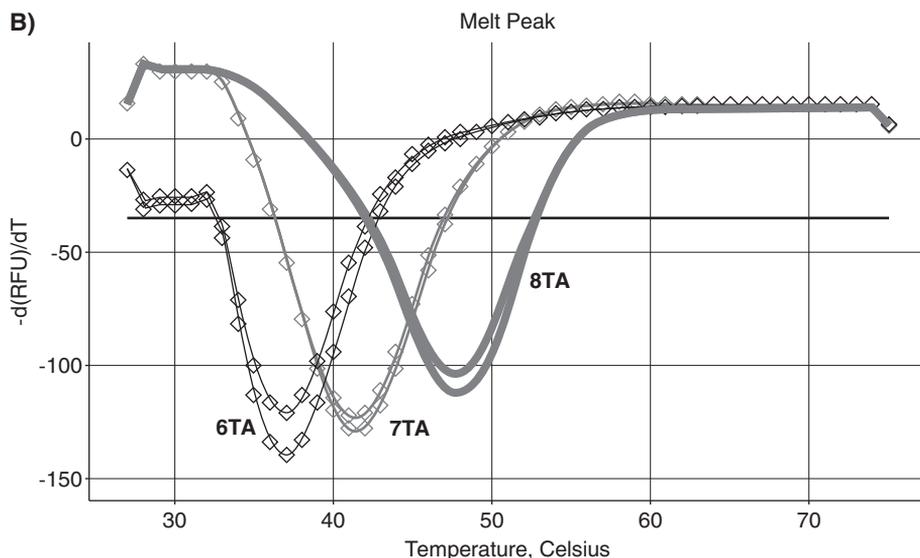
С помощью разработанного метода было проведено исследование образцов популяционной выборки. В ходе апро-

## Повышение квалификации

бации выявлены все варианты числа ТА-повторов гена *UGT1A1* (табл. 1). Частота встречаемости аллеля *UGT1A1\*28* составила 34,5%. Полученное нами распределение генотипов в популяционной выборке соответствовало ожидаемому при соблюдении равновесия Харди – Вайнберга ( $p = 0,273$ ). Число образцов, где были выявлены аллели 5 ТА и 8 ТА, слишком мало, чтобы достоверно посчитать частоту их встречаемости. Кроме того, в доступной нам выборке не удалось обнаружить генотипы 5 ТА / 7 ТА и 6 ТА / 8 ТА (табл. 1).



## Повышение квалификации



**Рис. 1.** Кривые плавления для образцов, соответствующих аллелям с 6 ТА (черные ромбы), 7 ТА (серые ромбы), 5 ТА (черные сплошные линии) и 8 ТА (серые сплошные линии).

А) канал FAM для РС-1;

Б) канал HEX для РС-1;

В) канал FAM для РС-2. Подробные разъяснения в тексте.

Таблица 1

### Распределение генотипов в популяционной выборке жителей Новосибирска и частоты встречаемости аллелей

| Генотип                             | 6ТА/6ТА | 6ТА/7ТА | 7ТА/7ТА | 7ТА/8ТА | 5ТА/8ТА                  |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------------------------|
| Количество случаев                  | 216     | 211     | 64      | 3       | 2                        |
| <b>Частота встречаемости аллеля</b> |         |         |         |         |                          |
| Аллель                              | 5ТА     | 6ТА     | 7ТА     | 8ТА     | Общее количество аллелей |
| Количество случаев                  | 2       | 643     | 342     | 5       | 992                      |
| Частота, %                          | 0,2     | 64,8    | 34,5    | 0,5     |                          |

Для валидации разработанного метода была использована выборка из 7572 образцов с известным генотипом, предоставленная ООО «ИНВИТРО-Сибирь» (Новосибирск), в том числе образцы с редкими генотипами 5 ТА/6 ТА, 5 ТА/7 ТА, 6 ТА/8 ТА и 7 ТА/8 ТА. Для всех образцов результаты определения генотипа с помощью нашего мето-

да совпали с референсными. По данным, предоставленным ООО «ИНВИТРО-Сибирь», среди 7572 образцов от пациентов, направленных в клинико-диагностическую лабораторию для выявления полиморфизма *UGT1A1*, в большей их части генотипы представлены наиболее распространенными вариантами: 6 TA/6 TA, 6 TA/7 TA и 7 TA/7 TA. Из редких генотипов чаще выявляли 7 TA/8 TA, соответствующий высокому риску развития синдрома Жильбера (табл. 2). Обнаружение остальных редких генотипов представлено единичными случаями. Полученные частоты аллелей не соответствуют общепопуляционным, поскольку они выявлены в группе пациентов, которые по тем или иным клиническим показаниям были направлены на обследование для определения числа TA-повторов в промоторе гена *UGT1A1*.

Таблица 2

**Распределение генотипов с редкими аллелями среди образцов из выборки, предоставленной ООО «ИНВИТРО-Сибирь»**

| Генотип                           | 5TA/6TA | 5TA/7TA | 6TA/8TA | 7TA/8TA |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Количество случаев                | 4       | 4       | 2       | 27      |
| Частота встречаемости генотипа, % | 0,05    | 0,05    | 0,03    | 0,36    |

Образцы с аллелями *UGT1A1*\*1, \*28, \*36 и \*37 во всех найденных сочетаниях генотипов были секвенированы. Результаты, полученные с помощью описанного метода, полностью совпали с данными секвенирования. Секвенограмма генотипа 6 TA/7 TA *UGT1A1* представлена на рис. 2.

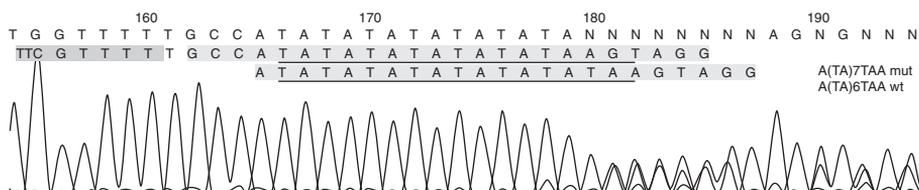


Рис. 2. Секвенограмма образца с генотипом A(TA)6TAA/A(TA)7TAA *UGT1A1*.

Полученные нами данные о популяционном распределении частот аллелей согласуются с официальной статистикой распределения генотипов и частот встречаемости аллелей *UGT1A1*, которая расположена на сайте [pharmgkb.org](http://pharmgkb.org) [4]. Среди европеоидных популяций, включая американцев,

аллель \*36 не выявлен, а аллель \*37 определен только у греческих киприотов с частотой 1,1% [4].

Клиническая значимость генотипирования промоторной области *UGT1A1* заключается не только в подтверждении диагноза: «синдром Жильбера», но и позволяет сделать прогноз об эффективности терапии лекарственными препаратами и развитии нежелательных реакций.

к сведению

Прием таких препаратов, как антиретровирусный атазанавир и противоопухолевый агент иринотекан, зачастую вызывает развитие токсических эффектов, в основе которых лежит нарушение биотрансформации данных препаратов, осуществляемой с участием белка *UGT1A1*. Существуют рекомендации американского Агентства по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA), в которых указано на необходимость снижения дозы атазанавира носителям гомозиготного генотипа *UGT1A1\*28* [9] и других редких аллелей, проявляющихся снижением активности фермента уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы [10]. Соответствие фенотипа пациента выявленному генотипу и его влияние на развитие нежелательных лекарственных реакций (НЛР) при приеме атазанавира представлено в табл. 3.

Таким образом, только медленные метаболизаторы (гомозиготы по аллелям *UGT1A1\*28* и \*37) имеют риск развития гипербилирубинемии при лекарственной терапии. Быстрые метаболизаторы (гомозиготы по аллелю *UGT1A1\*36*) имеют риск развития нежелательных лекарственных реакций или отсутствия терапевтического эффекта, если лекарство метаболизируется ферментом в более активное соединение. Концентрация образующегося метаболита будет выше, чем при нормальной активности фермента, что может вызвать побочные реакции в зависимости от препарата (со стороны ЖКТ, нервной системы и др.). Эффект может усиливаться при сниженной активности белков-транспортеров семейства ABCB (*MDR1*, *MDR2*), обусловленных наличием медленных аллелей, поскольку выведение метаболитов будет замедлено.

**Повышение квалификации**

Таблица 3

**Генотипы *UGT1A1*, соответствующие им фенотипы и риск развития нежелательных лекарственных реакций при приеме атазанавира**

| <b>Генотип</b>       | <b>Фенотип</b>                | <b>Описание</b>   | <b>Риск НЛР при приеме атазанавира</b> |
|----------------------|-------------------------------|---|--|
| *1/*1<br>(6ТА/6ТА)   | Нормальный метаболитизатор    | Генотип соответствует нормальной активности фермента  | Низкий                                 |
| *1/*28<br>(6ТА/7ТА)  | Промежуточный метаболитизатор | Генотип представлен нормальным аллелем и мутантным аллелем, который проявляется снижением активности фермента. Фенотип пациента соответствует промежуточной активности фермента | Низкий                                 |
| *28/*28<br>(7ТА/7ТА) | Медленный метаболитизатор     | Генотип представлен двумя мутантными аллелями, проявляется снижением активности фермента  | Высокий                                |
| *1/*37<br>(6ТА/5ТА)  | Нормальный метаболитизатор    | Генотип представлен нормальным аллелем и аллелем, который проявляется повышением активности фермента. Фенотип пациента соответствует нормальной активности фермента             | Низкий                                 |
| *36/*36<br>(5ТА/5ТА) | Быстрый метаболитизатор [7]   | Генотип представлен двумя аллелями, проявляется повышением активности фермента  | Низкий*                                |
| *1/*37<br>(6ТА/8ТА)  | Промежуточный метаболитизатор | Генотип представлен нормальным аллелем и мутантным аллелем, который проявляется снижением активности фермента. Фенотип пациента соответствует промежуточной активности фермента | Низкий                                 |
| *37/*37<br>(8ТА/8ТА) | Медленный метаболитизатор     | Генотип представлен двумя мутантными аллелями. Фенотип проявляется снижением активности фермента  | Высокий                                |
| *36/*28<br>(5ТА/7ТА) | Нормальный метаболитизатор    | Генотип представлен аллелем, который приводит к повышению, и аллелем, который проявляется снижением активности фермента   | Низкий                                 |
| *36/*37<br>(5ТА/8ТА) | Нормальный метаболитизатор    | Генотип представлен аллелем, который проявляется повышением, и аллелем, который проявляется снижением активности фермента   | Низкий                                 |
| *28/*37<br>(7ТА/8ТА) | Медленный метаболитизатор     | Генотип представлен двумя мутантными аллелями, проявляется снижением активности фермента  | Высокий                                |

**Примечание.** \* – генотип не влияет на эффективность препаратов, которые инактивируются или умеренно ингибируют *UGT1A1* [8].

Один из важных препаратов противоопухолевой терапии рака прямой кишки – иринотекан. Препарат является пролекарством и метаболизируется посредством карбоксиэстераз до терапевтически активного метаболита SN-38, который метаболизируется в неактивный глюкуронид SN-38G в большей степени посредством UGT1A1 (в меньшей степени – других глюкуронидаз: UGT1A9 и UGT1A10) в печени и кишечнике. Таким образом, при сниженной активности UGT1A1 происходит повышение уровня активного метаболита, которое вызывает расстройства ЖКТ и гематологическую токсичность [9, 12]. Наличие гомозиготы по аллелю *UGT1A1\*28* строго связано с развитием нейтропении при приеме иринотекана, ОШ = 9,3 [12]. В инструкции к препарату Camptosar (иринотекан гидрохлорид в инъекциях, Pfizer) отмечено, что у носителей аллеля *UGT1A1\*28* повышен риск развития нежелательных реакций на прием, но рекомендации по снижению дозы не прописаны. При этом в работе Innocenti и соавт. говорится о необходимости снижения дозы препарата на 20% или замены его на оксалиплатин [12].

Выявление аллелей со сниженной активностью в промоторе гена *UGT1A1* может не только помочь в постановке диагноза «синдром Жильбера», но и прогнозировать развитие нежелательных лекарственных реакций при приеме таких препаратов, как атазанавир и иринотекан, и возможно предупредить их. Анализ может объяснить проблемы, связанные с развитием гипербилирубинемии при приеме и других препаратов. Кроме того, нередко при синдроме Жильбера выявляют заболевания пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки и желчевыводящих путей (гастродуоденит, эзофагит, сфинктерные нарушения). Синдром, возможно, является фактором риска развития заболеваний желчного пузыря, в том числе билиарного сладжа, желчнокаменной болезни [2]. Так, у носителей полиморфизма 7 TA повышается риск холелитиаза, особенно среди мужчин, ОШ = 2,225,  $p = 0,001$  [13]. Синдром Жильбера, по-видимому, – наиболее частая причина желтухи при сопутствующих патологиях верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Так, генотип 7 TA/7 TA встречается среди детей с гипертрофическим пилоростенозом с желтухой в 43,8% случаев, тогда как без желтухи – только в 10,4% [11].

Нами предложен и апробирован высокопроизводительный и специфичный подход к выявлению всех комбинаций четырех аллелей *UGT1A1*\*1, \*28, \*36 и \*37, определяющих риск развития синдрома Жильбера. Анализ не требует дополнительных манипуляций с образцом после проведения ПЦР, что уменьшает риск возникновения ошибок и контаминации. Использование нескольких флуоресцентных зондов увеличивает надежность определения распространенных аллелей *UGT1A1*\*1 и \*28, а также позволяет выявлять редкие аллели *UGT1A1*\*36 и \*37. На основе данного метода создан удобный в применении набор реагентов, который сделает доступным для использования в рутинной клинической практике выявление всех четырех актуальных аллелей гена *UGT1A1* с высокой специфичностью. Набор проходит государственную регистрацию.

## Список использованной литературы

1. Биологические эффекты токсических соединений / Под ред. Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф. Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск. 2003. 208 с.
2. Дубровина Г.М., Ботвиньев О.К., Колотилина А.И. Сочетание синдрома Жильбера с заболеваниями желудочно-кишечного тракта // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2014. № 3. С. 13–21.
3. Номенклатура аллелей *UGT1A1*: [pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/UGT1A1-allele-nomenclature.html](http://pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/UGT1A1-allele-nomenclature.html)
4. Популяционные частоты аллелей *UGT1A1*: [api.pharmgkb.org/v1/site/redirect?p=https%3A%2F%2Fgithub.com%2FPharmGKB%2Fpic-guidelines%2Fraw%2Fmaster%2Fatazanavir%2F2015%2F26417955-UGT1A1\\_allele\\_frequency.xlsx](http://api.pharmgkb.org/v1/site/redirect?p=https%3A%2F%2Fgithub.com%2FPharmGKB%2Fpic-guidelines%2Fraw%2Fmaster%2Fatazanavir%2F2015%2F26417955-UGT1A1_allele_frequency.xlsx)
5. Прасолова М.А., Щепотина Е.Г., Дымишиц Г.М. Разработка высокопроизводительного флуоресцентного метода определения полиморфизмов в генах гемостаза и фолатного цикла для клинического использования // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013. № 1. С. 23–29.
6. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. М.: ГЭОТАР, 1999. 864 с.
7. Aono S., Adachi Y., Uyama E. et al. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome // The Lancet. 1998. Vol. 345. P. 958–959.

8. *Beutler E., Gelbart T., Demina A.* Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 8170–8174.
9. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline information for atazanavir and UGT1A1. <https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166128738>.
10. *D'Owyer P.J., Catalano R.B.* Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and Irinotecan: Practical Pharmacogenomics Arrives in Cancer Therapy // *J. Clin. Oncol.* Vol. 24. 2006. P. 4534–4538.
11. *Gammal R.S., Court M.H., Haidar C.E. et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing // *Clin. Pharmacol Ther.* 2016. Vol. 99. P. 363–369.
12. *Hua L., Shi D., Bishop P.R. et al.* The Role of UGT1A1\*28 Mutation in Jaundiced Infants with Hypertrophic Pyloric Stenosis // *Pediatric research.* 2005. Vol. 58. P. 881–884.
13. *Innocenti F., Undevia S.D., Iyer L. et al.* Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan // *J. Clin. Oncol.* 2004. Vol. 22. P. 1382–1388.
14. *Tsezou A., Tzetis M., Giannatou E. et al.* Gilbert Syndrome as a Predisposing Factor for Cholelithiasis Risk in the Greek Adult Population // *Gen. Test. Mol. Biomark.* 2009. Vol. 13. P. 143–146.



# Молекулярная диагностика этиологии сепсиса и проблемных госпитальных инфекций у детей

### **Е.А. Черневская**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,

### **Н.В. Белобородова**

д-р мед. наук, проф., руководитель лаборатории,

### **И.Б. Дмитриева**

канд. мед. наук, ст. науч. сотр., клинический фармаколог Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы,

ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского», Москва,

### **Л.В. Павлушкина**

заведующая лабораторией Детской городской клинической больницы

№ 13 им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы,

### **Р.Т. Налбандян**

науч. сотр., детский хирург НИИ неотложной детской хирургии

и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы

---

*Представлен клинический опыт диагностики бактериальных и грибковых инфекций методом ПЦР в двух детских многопрофильных стационарах. Исследовано более 3 тыс. образцов крови, аспирата дыхательных путей, мочи, раневого отделяемого и др. Количественное определение микробных ДНК осуществляли методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, использовали наборы реагентов «АмплиСенс» (Россия). Показано, что метод ПЦР позволяет выявить ДНК возбудителей уже в день госпитализации больного, а в динамике уровень микробных ДНК может служить объективным критерием адекватности антимикробной терапии. Ряд важных преимуществ перед культуральными микробиологическими методами, доступность оборудования и отечественных реагентов свидетельствуют о перспективности широкого внедрения молекулярной диагностики в клиническую практику.*

---

Уже многие десятилетия для диагностики этиологии гнойно-септических заболеваний используют микробиологические культуральные методы, предполагающие посев исследуемого биологического материала на универсальные и селективные питательные среды с целью получения чистых культур и идентификации возбудителя. Классическое микробиологическое исследование по праву называют «золотым стандартом» лабораторной диагностики многих инфекционных заболеваний, несмотря на его трудоемкость и ряд серьезных недостатков. В последние годы оснащение клинично-диагностических лабораторий микробиологическими анализаторами позволило сократить время получения результатов с 3–5 до 2–3 дней, однако технология анализа по-прежнему основана на культивировании микроорганизмов.

Для выявления бактериемии по-прежнему требуется забор нескольких проб крови и достаточно большой объем образцов, что практически невозможно выполнить при обследовании новорожденных и недоношенных детей.

*внимание!*

При автоматизации микробиологических исследований остается зависимость результатов от условий культивирования (в разных средах и при разных температурах возможно конкурентное взаимодействие между микроорганизмами, подавление основного возбудителя и, наоборот, рост сопутствующей флоры), влияние предшествующего лечения антибиотиками (присутствие антимикробных препаратов в образце может повлиять на рост бактерий и привести к ложноотрицательному результату) и др.

В настоящее время не прекращается поиск других методов, т. н. некультуральных, более адаптированных к требованиям современной ургентной медицины, способных быстро и точно ответить на вопрос, какой микроорганизм является возбудителем инфекционного процесса у данного больного. На помощь пришла молекулярная диагностика, а именно исследование биологического материала для обнаружения ДНК микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

## Состояние проблемы

Принципиальными выгодными отличиями метода ПЦР от классической бактериологии являются:

- ~ детекция ДНК микроорганизма без предшествующего культивирования микроорганизмов на питательных средах;
- ~ исследование любого нативного биоматериала больного;
- ~ быстрое получение результата о наличии/отсутствии ДНК микроорганизма (в день поступления образца в лабораторию);
- ~ оценка количества копий ДНК, что особенно ценно – в динамике, на фоне лечения;
- ~ возможность выявить «микроба-лидера» при микст-инфекциях;
- ~ регистрация смены лидирующего микроорганизма при волнообразном течении инфекции для целенаправленной коррекции антибиотикотерапии и др.

Для выделения ДНК из любых биологических материалов организма достаточно получить минимальный объем исследуемого образца (биоматериала).

*к сведению*

Перечень микроорганизмов, ДНК которых можно определить методом ПЦР, постоянно расширяется, о чем более подробно будет сказано ниже.

Клиницистов всегда интересует чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам. Классическое культуральное исследование дает ответ на этот вопрос в виде антибиотикограммы, которая характеризует способность бактерий расти на питательной среде в присутствии 10–20 и более антибиотиков. Метод ПЦР позволяет выявлять т. н. проблемную резистентность, например метициллинрезистентность у стафилококков (MRS) или наличие карбапенемаз у грамотрицательных микроорганизмов, т. е. их способность разрушать антибиотики группы карбапенемов (имипенем, меропенем) [2]. Тем самым современные молекулярные методы максимально адаптированы к требованиям клиницистов и позволяют не только диагностировать этиологию инфекции, но и проводить адекватную антимикробную терапию.

Число научных публикаций о применении ПЦР в клинике, в т. ч. для идентификации ДНК возбудителей внутрибольничной инфекции, прогрессивно растет, что свидетельствует о востребованности и актуальности метода. Целенаправлен-

но для выявления возбудителей нозокомиальных инфекций разработан ряд зарубежных мультиплексных наборов реагентов: Septifast (Roche, Швейцария), Unyvero (Curetis, Германия), GeneXpert Dx (Cepheid, США), Septitest (Molzym, Германия) и др. [10, 12, 15, 16]. Septifast, ряд наборов GeneXpert и Unyvero зарегистрированы в России. К сожалению, они практически недоступны для применения в российских стационарах, преимущественно из-за высокой стоимости.

Одна из первых мультиплексных ПЦР-систем – LightCycler SeptiFast была разработана для идентификации 25 патогенов. В многоцентровом ретроспективном метаисследовании, обобщающем 34 работы и данные более 6 тыс. обследованных больных ( $n = 6012$ ), проведено сравнение результатов, полученных с использованием SeptiFast и классических методов выявления бактериемии у больных при подозрении на сепсис. Чувствительность и специфичность набора SeptiFast для выявления бактериемии или кандидемии составили 0,75 (95% ДИ: 0, 65–0,83) и 0,92 (95% ДИ: 0,90–0,95) соответственно [8]. Наш опыт работы с применением SeptiFast в лаборатории клинической микробиологии и антимикробной терапии ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им А.Н. Бакулева» также показал, что применение мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет сократить время идентификации патогена и «отсечь» случаи контаминации, а в отдельных случаях – установить этиологию инфекционного процесса, когда классическими методами бактериемия не была выявлена [3].

Набор реагентов The Magicplex™ Sepsis Real-Time (MP) (Seegene, Seoul, Korea) создан для скрининга 90 патогенов в крови, что охватывает более 90% потенциальных возбудителей сепсиса у человека, в т. ч. 73 грамположительных (*Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*), 12 грамотрицательных и 6 видов грибов. Система позволяет идентифицировать также 3 гена лекарственной устойчивости: ген метициллинрезистентности у стафилококков (*mecA*) и гены резистентности к ванкомицину (*vanA*, *vanB*). Набор реагентов был апробирован у 89 детей разного возраста (2,6–12,1 года) с клинической картиной системной инфекции. В 5 случаях результаты классического посева крови на бактериемию оказались положительными (положительная гемокультура),

а при использовании теста Magicplex – отрицательными. В то же время тест Magicplex в 32 случаях дал положительный результат при отрицательном результате микробиологических исследований (отрицательная гемокультура). Авторы отмечают, что использование Magicplex позволило увеличить диагностическую значимость гемокультуры на 143% [13].

Для диагностики этиологии инфекционного процесса клиницисту часто нужно иметь информацию о возбудителе, присутствующем непосредственно в гнойно-воспалительном очаге. Для этих целей была создана платформа Curetis Unyvero, которая в материале дыхательных путей позволяет обнаружить 22 маркера устойчивости к антибиотикам, а также идентифицировать 16 видов бактерий и 1 вид грибов, участвующих в развитии до 80% тяжелых пневмоний. В исследовании у 62 больных с внутрибольничной пневмонией проведено сравнение диагностической значимости этой системы с традиционным микробиологическим исследованием. Применение набора реагентов Curetis Unyvero выгодно отличалось от культуральных методов, т. к. позволило быстрее получить результат, в среднем за 6,5 ч (4,7–18,3 ч) по сравнению с традиционным методом – 71 ч (37,2–217,8 ч). Результаты двух методов полностью совпали лишь в 45% случаев, что можно объяснить более высокой способностью набора Curetis Unyvero выявлять ассоциации микроорганизмов по наличию нескольких микробных ДНК в исследуемом материале. В 10% случаев этиологию пневмонии не удалось установить, т. к. результаты исследования обоими методами оказались отрицательными. Важным результатом исследования явился тот факт, что мультиплексная ПЦР помогала чаще выявлять маркеры устойчивости к антибиотикам по сравнению с микробиологическим исследованием. В работе обсуждаются перспективы доработки набора Curetis Unyvero, целесообразность расширения микробной панели и др. [11].

Система GeneXpert Dx снабжена одноразовыми картриджами, в которых происходят соответствующие реакции непосредственно в нативном материале пациента. Для быстрого обнаружения в мазках из носа метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) используют картридж «Xpert MRSA», в образцах вагинальных/ректальных мазков выявляют ДНК стрептококка группы В (картридж «GBS»),

в образцах спинномозговой жидкости у больных с симптомами менингита картридж «EV» позволяет выявить РНК энтеровируса. Существуют также картриджи для выявления генов ванкомицинрезистентности («vanA/vanB») в образцах ректальных и перианальных мазков у пациентов с риском колонизации кишечника ванкомицин-устойчивыми штаммами бактерий (энтерококков). Картриджи являются автономными, поэтому перекрестная контаминация образцов исключена.

В масштабном исследовании 27 647 назальных проб проведено сравнение трех наборов реагентов: LightCycler MRSA (Roche Molecular Diagnostics), BD MAX MRSA (Becton Dickinson) и Xpert MRSA (Cepheid) – для выявления метициллинрезистентного золотистого стафилококка. Показана высокая диагностическая значимость тест-систем и сопоставимость полученных результатов. Так, чувствительность и специфичность составили 98,3 и 98,9% для LightCycler MRSA, 95,7 и 98,8% – для Xpert MRSA, различия статистически незначимы. Положительная прогностическая ценность составила 86,7% для LightCycler MRSA, 82,7% – для Xpert MRSA ( $p > 0,1$ ), 72,2% – для теста BD MAX MRSA ( $p < 0,001$  по сравнению с LightCycler MRSA). При этом экономическая эффективность была равнозначна у всех трех систем [14].

Можно продолжить описание различных мультиплексных ПЦР-систем, которые сегодня применяются не только в научно-исследовательских лабораториях, но и в рутинной клинической практике.

Опыт практического использования молекулярных методов показал, что стремление к расширению спектра определяемых микроорганизмов не всегда оправданно, поскольку это неизменно влечет усложнение и удорожание исследования. В клинике значительно чаще необходим быстрый скрининг для получения ответа «да» или «нет», например в решении следующих вопросов при лечении конкретного больного:

- ~ инфекция бактериальная или грибковая;
- ~ лидирует возбудитель грамположительный или грамотрицательный;
- ~ стафилококк обычный или метициллинрезистентный (MRS);
- ~ продуцирует ли грамотрицательный возбудитель карбапенемазы;
- ~ динамика состояния пациента на фоне лечения положительная или отрицательная?

Заслуживает внимания тот факт, что из 25 патогенов, выявляемых в системе Septitest, наиболее часто детектировались следующие: *Staphylococcus aureus* (11,6%), *coagulase-negative Staphylococcus* (CoNS) (29,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (16,5%), *Klebsiella spp.* (10,1%) [12]. Обнаружение ДНК этих и ряда других микроорганизмов методом ПЦР в режиме реального времени в настоящее время возможно с применением российских наборов реагентов [4, 5]. Авторы располагают собственным клиническим опытом использования отечественных наборов АмплиСенс, разработанных в ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, и хотят им поделиться в данной статье.

Исследование планировалось как открытое, проспективное, сравнительное и на первом этапе носило характер апробации метода в стационаре. В дальнейшем работа приобрела характер клинического внедрения ввиду широкой востребованности со стороны клиницистов и быстрого накопления большого объема данных.

Исследования выполнялись по инициативе ФГБНУ «НИИОР им В.А. Неговского» на двух клинических базах: в Детской городской клинической больнице № 13 им. Н.Ф. Филатова и в НИИ неотложной детской хирургии и травматологии. В течение 5 лет методом ПЦР было исследовано более 3 тыс. образцов для обнаружения бактериальной и грибковой ДНК. Методы классической (культуральной) микробиологии применялись для обследования больных по показаниям, в обычном режиме. Исследователи (научные сотрудники), врачи клинической лабораторной диагностики и лечащие врачи имели возможность сравнивать результаты обоих методов, в каждом конкретном случае сопоставляя с клинической картиной и эффективностью лечения.

Для детекции ДНК микроорганизмов исследовались различные образцы биологического материала: аспират из трахеи, кровь, моча, раневое отделяемое, мазки со слизистых оболочек и др. Объем материала для исследования минимален – 0,1–0,2 мл образца. Выбор локусов для исследования определялся лечащим врачом индивидуально для каждого ребенка в зависимости от диагноза, клинической картины, данных анамнеза.

В ходе исследования метод ПЦР апробирован нами для **скрининга микробных ДНК у новорожденных и недоношенных детей, поступающих в отделение реанимации с подозрением на сепсис**. На этапе апробации использовали образцы крови,

присланные в лабораторию при обследовании детей для выявления возбудителей внутриутробных инфекций. По мере внедрения метода врачи отделения реаниматологии уже целенаправленно направляли материал для исследования с использованием ПЦР. Параллельно в динамике контролировали активность инфекционно-воспалительного процесса по уровню биомаркеров: прокальцитонина, С-реактивного белка (СРБ), белка S 100b.

Возможности метода ПЦР **для оценки микробной обсеменности ран** оценивали у детей более старшего возраста, которые поступали в НИИ неотложной детской хирургии и травматологии с обширными ранами различной этиологии и локализации. Все дети нуждались в пластическом закрытии дефектов кожными лоскутами после комплексного лечения и санации ран.

Забор раневого отделяемого осуществляли стерильной одноразовой палочкой с ватным тампоном, погружали в одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды «ТСМ» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) и плотно закрывающейся крышкой. При комнатной температуре образцы оставляли не более 2 ч, при необходимости более длительного хранения – в холодильнике при 2–8 °С не более 1 сут.

Для анализа использовали современные отечественные наборы реагентов, разработанные ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, для выявления возбудителей нозокомиальных инфекций.

Выделение ДНК проводили с использованием набора «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно прилагаемой инструкции. Реакцию амплификации проводили на многоканальных приборах «iQ5» («Bio-Rad», США) или «Rotor-Gene» 6000 («CorbettResearch», Австралия) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

- Количественное определение микробных ДНК осуществляли методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, используя следующие наборы реагентов «АмплиСенс» (Россия):
- ~ «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL» для амплификации ДНК метициллинчувствительного/резистентного золотистого стафилококка (*MSSA/MRSA*), метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков «MRCoNS»;
  - ~ «АмплиСенс *Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-FL» для амплификации ДНК грамотрицательных бактерий – *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* и др.;

~ «АмплиСенс ФлороЦеноз/ Кандиды-FL» для амплификации ДНК грибов – *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*.

Ниже приведены результаты ретроспективного анализа идентификации микроорганизмов из 1 тыс. образцов биологического материала, присланных в лабораторию. Число идентифицированных микроорганизмов составило 1072 (встречались микст-культуры). Сравнение результативности разных методов – ПЦР и классического микробиологического исследования (микробиологического посева, МП) приведено в табл. 1.

Таблица 1

**Результаты идентификации микроорганизмов при использовании молекулярного (ПЦР) и микробиологического исследования (МП) 1000 образцов биологического материала больных детей**

| Названия микроорганизмов        | Число идентифицированных микроорганизмов |              |                 | Общее число микроорганизмов |
|---------------------------------|--|--------------|-----------------|-----------------------------|
|                                 | только ПЦР(+)                            | только МП(+) | ПЦР(+)<br>МП(+) |                             |
| <i>MSSA</i>                     | 12                                       | -            | 10              | 22                          |
| <i>MRSA</i>                     | 6  | -            | 6               | 12                          |
| <i>MRCoNS</i>                   | 264                                      | -            | 132             | 396                         |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>  | 22                                       | -            | 22              | 44                          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 80                                       | 10           | 40              | 130                         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | 24                                       | 8            | 32              | 64                          |
| <i>Candida spp.</i>             | 112                                      | 7            | 83              | 202                         |
| в том числе: <i>C. albicans</i> | 71                                       | 3            | 68              | 142                         |
| <i>C. glabrata</i>              | 12                                       | 4            | 4               | 20                          |
| <i>C. krusei</i>                | 29                                       | -            | 11              | 40                          |
| Всего                           | 632                                      | 32           | 408             | 1072                        |

При сравнении результатов исследования **аспирата дыхательных путей** у больных, находящихся на ИВЛ, оказалось, что молекулярными методами значительно чаще обнаруживались резистентные штаммы стафилококков – *MRCoNS*, в то время как в половине этих образцов результаты МП были отрицательными.

(Продолжение следует)

# Молекулярная диагностика этиологии сепсиса и проблемных госпитальных инфекций у детей\*

### **Е.А. Черневская**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,

### **Н.В. Белобородова**

д-р мед. наук, проф., руководитель лаборатории,

### **И.Б. Дмитриева**

канд. мед. наук, ст. науч. сотр., клинический фармаколог Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы,

ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского», г. Москвы,

### **Л.В. Павлушкина**

заведующая лабораторией Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы,

### **Р.Т. Налбандян**

науч. сотр., детский хирург НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы

---

*Представлен клинический опыт диагностики бактериальных и грибковых инфекций методом ПЦР в двух детских многопрофильных стационарах. Исследовано более 3 тыс. образцов крови, аспирата дыхательных путей, мочи, раневого отделяемого и др. Количественное определение микробных ДНК осуществляли методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, использовали наборы реагентов «АмплиСенс» (Россия). Показано, что метод ПЦР позволяет выявить ДНК возбудителей уже в день госпитализации больного, а в динамике уровень микробных ДНК может служить объективным критерием адек-*

---

\* Окончание. Начало «Справочник заведующего КДЛ» 2016. № 11. С. 70–78. Статья подготовлена при поддержке гранта РФ № 15-15-00110.

ватности антимикробной терапии. Ряд важных преимуществ перед культуральными микробиологическими методами, доступность оборудования и отечественных реагентов свидетельствуют о перспективности широкого внедрения молекулярной диагностики в клиническую практику.

### Метициллинрезистентные стафилококки (MRS)

При сравнении двух групп больных, в одной из которых результаты исследования были положительными при применении и ПЦР, и МП (группа ПЦР+/МП+), а в другой роста бактерий не было (группа ПЦР+/МП-), оказалось, что количество копий ДНК микроорганизмов во второй группе в 5 раз ниже и различия статистически значимы. Так, в группе ПЦР+/МП+ медиана копий ДНК/мл составила 4650 по сравнению с 888 в группе ПЦР+/МП- ( $p < 0,05$ ). Важно отметить, что ни в одном случае, где результаты ПЦР были отрицательными, культуральный метод не выявил MRS.

Дальнейший анализ клинической картины и уровня биомаркеров микробной нагрузки и воспаления позволил оценить клинически значимую концентрацию метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков в биоматериале (табл. 2).

Таблица 2

#### **Концентрация ДНК MRCoNS в образцах биологического материала больных детей (n = 91) в сопоставлении с другими клинико-лабораторными показателями**

| Копий ДНК/мл           | Число наблюдений | Частота повышения уровня маркеров воспаления (PCT и/или СРБ), % | Частота обнаружения MRCoNS культуральным методом |
|------------------------|------------------|---|--|
| Менее 100              | 13               | 58  | 8  |
| 100–800                | 46               | 60  | 32   |
| 800–10 <sup>4</sup>    | 20               | 70  | 39   |
| 10 <sup>4</sup> и выше | 12               | 83  | 50   |

Как видно из табл. 2, при концентрации ДНК более 100 копий/мл частота подтверждения культуральным методом составляет 32–50%, т. е. превышает 30%. По нашим данным,

эти концентрации MRCoNS могут считаться клинически значимыми.

### *Pseudomonas aeruginosa*

Наиболее распространенным способом лабораторной диагностики *Pseudomonas aeruginosa* является культуральный метод, т. к. синегнойная палочка хорошо растет на плотных и жидких питательных средах. Преимуществом ПЦР по сравнению с культуральной диагностикой является возможность ускорить время получения результата. Ранее при исследовании различных биологических образцов (кровь, аспират из трахеи, моча) нами сообщалось, что ДНК *Pseudomonas aeruginosa* не была обнаружена в 75% случаев (в 78 из 104 образцов), и это совпадало с отрицательными значениями микробиологических исследований [6]. В то же время, как показано в табл. 1, нами зарегистрированы 10 случаев, когда рост *Pseudomonas aeruginosa* выявлен при МП, но методом ПЦР в нативном материале наличие ДНК *Pseudomonas aeruginosa* не подтверждено.

Известно, что *Pseudomonas aeruginosa* часто обнаруживается на слизистых у интубированных больных, но при низком уровне контаминации/колонизации дыхательных путей не всегда является истинным возбудителем инфекционного процесса (в частности пневмонии). В то же время на чашках с питательной средой этот строгий аэроб обладает выраженными конкурентными преимуществами по отношению к другим бактериям. Рост даже единичных колоний *Pseudomonas aeruginosa* в лаборатории регистрируется как положительный результат. Врачи-реаниматологи знают, что далеко не всегда назначенные на этом основании антибиотики дают положительный эффект.

На этапе внедрения набора для обнаружения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* мы сопоставили положительные результаты с данными культурального метода и анализом биомаркеров (табл. 3).

На основании полученных данных значения ДНК менее 800 копий/мл были «отсечены», что совпадает с линейным диапазоном, рекомендуемым производителем для этого набора реагентов. Ранее (n = 288) установлены чувствительность и специфичность метода при пороге отсечения 800 копий/мл по отношению к культуральному методу, которые составили 83,3 и 84,0% соответственно [7].

**Концентрации ДНК *P. aeruginosa* в образцах биологического материала больных (n = 58) в сопоставлении с другими клинико-лабораторными показателями**

| ДНК <i>P. aeruginosa</i> (копий/мл) | Число наблюдений | Частота повышения уровня маркеров воспаления (PCT и/или CRP), % | Количество положительных результатов идентификации <i>P. aeruginosa</i> культуральным методом |
|-------------------------------------|------------------|---|---|
| Менее 100                           | 21               | 35  | 5   |
| 100–800                             | 28               | 30  | 0   |
| 800–10 <sup>4</sup>                 | 3                | 33  | 33  |
| 10 <sup>4</sup> и выше              | 6                | 50  | 35  |

Таким образом, в отношении синегнойной палочки клинически значимыми следует считать концентрации ДНК *P. aeruginosa* выше 800 копий ДНК/мл (табл. 3).

В отношении других грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*) наше исследование продемонстрировало высокую диагностическую значимость метода ПЦР: совпадение с данными МП достигало 100%.

### Грибы рода *Candida*

Дрожжевые грибы *Candida spp.* выявлены в 11% исследованного материала, при этом «проблемные» в плане терапии *Candida non-albicans* выявлялись преимущественно с использованием молекулярных методов. Особую клиническую значимость имеет быстрая идентификация ДНК грибов *C. krusei*, которые природно устойчивы к флюконазолу, т. к. результаты ПЦР в этих случаях определяют выбор адекватного антимикотика. В 3 случаях экстренно обнаружена ДНК *C. albicans* в ликворе, причем в дальнейшем этиологическая значимость грибов в развитии менингита у этих детей подтверждена микробиологическими данными и повышенными уровнями метаболитов грибов (Д-арабинитол и манноза) в ликворе.

### Анализ ДНК микроорганизмов в моче

Результаты исследования показывают, что у больных в септическом состоянии дополнительную информацию о ли-

дирующем возбудителе можно получить *при выявлении ДНК* микроорганизмов в моче, даже при отсутствии роста микробов из образцов мочи. В качестве примера приводим 18 случаев, когда в день поступления в отделение реаниматологии результаты посева мочи были отрицательными, а методом ПЦР в моче выделены ДНК MRCoNS в концентрации  $10^3$ – $10^6$  копий/мл. Дальнейший клинико-лабораторный анализ показал, что у 12 из 18 больных, т. е. в 66% случаев, была обнаружена массивная колонизация коагулазонегативными стафилококками слизистых дыхательных путей и кишечника, а в 4 случаях (22%) документирована бактериемия: при посеве крови был выделен метициллинрезистентный эпидермальный стафилококк. Таким образом, у этих детей применение метода ПЦР для выявления ДНК микроорганизмов в моче уже в день поступления дал важную информацию о лидирующем возбудителе септического состояния, а данные микробиологического исследования в последующем лишь подтвердили справедливость такой интерпретации результатов. Объяснить, почему в моче была обнаружена ДНК MRCoNS, но не было роста колоний на среде, легко. Известно, что, в отличие от культурального метода, с помощью ПЦР можно обнаружить не только живые, но и разрушенные микробные клетки, например в результате фагоцитоза, а фрагменты бактерий, содержащие ДНК, выводятся с мочой.

## **Скрининг и мониторинг инфекций у новорожденных и недоношенных детей**

Как отмечалось выше, преимуществом российских наборов реагентов с использованием ПЦР является количественный формат определения ДНК микроорганизмов, что позволяет «отсекать» фоновую контаминацию от диагностически значимой для «проблемных» бактерий. В динамике это дает возможность мониторировать эффективность проводимой терапии.

Применение количественного определения ДНК микроорганизмов в ходе скрининга новорожденных, поступающих в критическом состоянии в отделение интенсивной терапии, показало, что методом ПЦР можно обнаружить бактериальную и грибковую ДНК намного

быстрее и с более высокой чувствительностью. В результате проведенной работы, при динамическом наблюдении больных ( $n = 214$ ) был разработан алгоритм выбора антимикробной терапии с учетом биомаркеров PCT, S100b и микробных ДНК (рис. 1) [1].

## Анализ микробных ДНК в раневом содержимом

Исследование раневого отделяемого проведено с целью объективной оценки готовности раневой поверхности к пластическому закрытию. Классическое микробиологическое исследование раневого экссудата в таких случаях предусматривает посевы на различные среды, выделение, идентификацию микроорганизмов и их количественное определение в расчете на 1 см<sup>2</sup> поверхности или на 1 г биоптата раны. При этом предварительные данные микробиологического исследования можно получить не ранее чем на 2-е сут, а окончательные – на 4–5-е сут после доставки материала в лабораторию. Интерпретация таких данных также неоднозначна, т. к. санация раны (отсутствие роста бактерий) регистрируется всего в 40% случаев, а в остальных случаях в динамике наблюдается хаотичная смена видов микроорганизмов. Все это может неблагоприятно отразиться на результатах кожной пластики. Метод ПЦР с возможностью быстрого (1–6 ч с момента взятия биоматериала) количественного измерения ДНК микроорганизмов привлек внимание детских хирургов. Исследования проведены в динамике у детей с гнойно-некротическими ранами после тяжелых травм, при несостоятельности сформированных культей конечностей после травматических ампутаций, с ранами после вскрытия флегмон, с пролежнями. В результате работы установлено, что снижение уровня ДНК микроорганизмов ниже 500 копий/мл является оптимальным для успешного пластического закрытия кожных дефектов. По результатам лечения 30 детей соблюдение выработанного критерия позволило уменьшить сроки предоперационной подготовки, и главное, осуществить пластическое закрытие обширных кожных дефектов без осложнений.

Таким образом, метод ПЦР для определения уровня ДНК микроорганизмов хорошо зарекомендовал себя в клинической практике и может служить перспективной аль-

тернативой культуральным методам диагностики инфекций у больных в стационаре.

Определение ДНК микроорганизмов наиболее клинически значимо в количественном формате, что позволяет отслеживать изменения в динамике. Отечественные наборы реагентов, использованные нами, предусматривают возможность мониторинга возбудителей инфекций по определению количества копий ДНК бактерий и грибов.

Когда клинически и инструментально верифицировать очаг инфекционного процесса не удается, целесообразно одновременно с забором крови для посева на стерильность исследовать кровь и/или аспират из дыхательных путей (у больных, находящихся на ИВЛ) методом ПЦР. Результаты исследования показали, что количественное определение ДНК микроорганизмов практически в любом биологическом материале, особенно в динамике, несет важную информацию для врача и больного, разумеется, при правильной интерпретации результатов.

Немаловажен вопрос экономической целесообразности применения в стационаре метода ПЦР. Практика применения данного метода с использованием наборов отечественного производства однозначно свидетельствует об экономической выгоде их широкого внедрения. Стоимость такого исследования многократно ниже, чем выполненного культуральными методами.

Несомненно, как и при внедрении любого нового метода, перед исследователями и врачами возникает ряд вопросов, касающихся клинической значимости обнаружения микробной ДНК в том или ином материале, интерпретации полученных результатов и т. д. Дальнейшие клинические исследования и накопление опыта позволят ответить на эти вопросы. Но уже сейчас можно уверенно говорить о диагностической значимости метода в клинике, высокой вероятности снижения затрат при использовании ПЦР-диагностики. Одним из главных преимуществ ПЦР-диагностики в сравнении с традиционными методами микробиологического исследования является возможность получения результатов в течение нескольких часов, в день забора материала, а быстрая идентификация возбудителя играет решающую роль в назначении адекватной антибиотикотерапии.

## Список использованной литературы

1. Мороз В.В., Белобородова Н.В., Дмитриева И.Б., Черневская Е.А. Обоснование выбора антимикробной терапии при критических состояниях новорожденных: методические рекомендации. ФГБУ «НИИОР им В.А. Неговского» РАМН, 2013. 31 с.
2. Полухина О.В., Суборова Т.Н., Якубович Е.И. и др. Алгоритм быстрой диагностики грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы // Проблемы медицинской микологии. 2016. Т. 18. № 2. С. 104 (тезисы).
3. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Первый опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для диагностики бактериемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных // Клиническая лабораторная диагностика. 2011. № 8. С. 49–52.
4. Скачкова Т.С., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б. и др. Разработка и апробация методики выявления и количественного определения метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации // Сборник статей VII Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика – 2010». Т. 2. С. 259–261.
5. Скачкова Т.С., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б. и др. Разработка методики количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации // Сборник статей VII Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика – 2010». Т. 2. С. 256–259.
6. Черневская Е.А., Дмитриева И.Б., Скачкова Т.С. Новые технологии в диагностике проблемных бактериальных инфекций в ОРИТ // Сборник статей Седьмой ежегодной Московской конференции «Гнойно-септические заболевания у детей», 2–3 июня 2011 г., Москва. С. 151–154.
7. Черневская Е.А., Дмитриева И.Б. Диагностическая значимость молекулярной диагностики нозокомиальных инфекций // Сборник статей XI Всероссийской конференции с международным участием «Проблема инфекции при критических состояниях», Москва, 2015. ISBN 978-5-9906781-9-4 С. 30–38.
8. Chang S.S., Hsieh W.H., Liu T.S. et al. Multiplex PCR System for Rapid Detection of Pathogens in Patients with Presumed Sepsis –

- A Systemic Review and Meta-Analysis PLoS One. 2013. Vol. 8. № 5. e62323.
9. *Heininger A., Binder M., Schmidt S. et al.* PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats // *J Clin Microbiol.* 1999. Vol. 37. № 8. P. 2479–2482.
10. *Jamal W.A., Roomi E., Abdul Aziz L.R., Rotimi V.O.* Evaluation of Curetis Unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia // *J Clin Microbiol.* 2014. Vol. 52. № 7. P. 2487–2492.
11. *Kunze N., Moerer O., Steinmetz N., et al.* Point-of-care multiplex PCR promises short turnaround times for microbial testing in hospital-acquired pneumonia – an observational pilot study in critical ill patients // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015. Vol. 13. № 4. P. 33.
12. *Lucignano B., Ranno S., Liesenfeld O., et al.* Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis // *J Clin Microbiol.* 2011. Vol. 49. № 6. P. 2252–2258.
13. *Marco D., Carlo S., Sara C., et al.* Regina Margherita Children's Hospital Bloodstream Infections Study Group participants, Pier-Angelo T. Magicplex(TM) Sepsis Real-Time test to improve bloodstream infection diagnostics in children // *Eur J Pediatr.* 2016 Vol. 175. № 8. P. 1107–1111.
14. *Patel P.A., Robicsek A., Grayes A., et al.* Evaluation of multiple real-time PCR tests on nasal samples in a large MRSA surveillance program // *Am J Clin Pathol.* 2015. Vol. 143. № 5. P. 652–658.
15. *Reinhart K., Bauer M., Riedemann N.C., Hartog C.S.* New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers // *Clin Microbiol Rev.* 2012. Vol. 25. № 4. P. 609–634.
16. *Venkatesh M., Flores A., Luna R.A., Versalovic J.* Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis // *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010. Vol. 8. № 9. P. 1037–1048.



---

## ОБМЕН ОПЫТОМ

---

### **Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования**

**К.О. Миронов**

*канд. мед. наук, ст. науч. сотр.,*

**Е.А. Дунаева**

*мл. науч. сотр.,*

**О.П. Дрибноходова**

*канд. биол. наук, науч. сотр.,*

**Г.А. Шипулин**

*канд. мед. наук, заведующий отделом  
молекулярной диагностики и эпидемиологии*

*ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора*

*Пиросеквенирование – удобная технология для прямого определения нуклеотидных последовательностей. Технология доступна для использования в рутинной лабораторной практике как диагностических, так и научных учреждений для решения различных задач, связанных с секвенированием. В публикации отражен собственный опыт использования технологии пиросеквенирования для исследований, направленных на определение наследуемых генетических полиморфизмов и анализ смесей ДНК. Исследования генетических полиморфизмов, связанных или ассоциированных с частыми мультифакторными заболеваниями, могут быть использованы в клинической практике, и в первую очередь в профилактической медицине. Анализ смесей ДНК может быть использован для определения и количественной оценки отношения интактной и мутантной ДНК при детекции соматических мутаций, а также в популяционных исследованиях. Обсуждены возможности и перспективы технологии.*

Большинство заболеваний, связанных с поражением сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной и других систем организма, являются мультифакторными. Риск возникновения мультифакторного заболевания обусловлен полиморфизмами в нескольких генах в сочетании с неблагоприятными внешними, часто модифицируемыми факторами. Накоплено значительное количество данных, полученных как в локальных исследованиях типа «случай – контроль», так и при проведении исследований по полногеномному скринингу ассоциаций (Genome Wide Associations Studies), проливающих свет на вклад генетических полиморфизмов в риск развития различных мультифакторных заболеваний [2, 4, 5]. Определение генетических полиморфизмов, связанных или ассоциированных с риском мультифакторного заболевания, позволяет выявлять предрасположенных лиц до клинического проявления симптомов болезни, прогнозировать риск развития осложнений и определять тактику проведения диагностических и лечебных мероприятий, включая использование той или иной схемы фармакотерапии [5, 14, 26]. В связи с этим создание методик и наборов реагентов для определения клинически значимых генетических полиморфизмов является актуальной задачей профилактической и персонализированной медицины.

### **Использование технологии пиросеквенирования для определения генетических полиморфизмов**

Для определения генетических полиморфизмов в геноме человека, большая часть которых представлена однонуклеотидными заменами, используются различные молекулярно-биологические методы. Методы могут быть подразделены на две категории в зависимости от способа детекции получаемого результата: прямые и непрямые. При использовании прямых методов определяется нуклеотидная последовательность изучаемых генетических локусов. Эта группа представлена различными методами секвенирования ДНК, из которых в настоящее время широко используются различные варианты секвенирования по методу, предложенному Ф. Сэнгером (также известному как метод обрыва цепи), массовое параллельное секвенирование и пиросеквенирование [2, 18, 24, 30, 31]. В отличие от прямых методов определения однонуклеотидных полиморфизмов многочисленные непрямые методы, такие как анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическая ПЦР, различные способы определения аллелей полиморфных локусов с помощью ПЦР в режиме реального времени, методы, основанные на ДНК-гибридизации, мини-секвенирование с последующим масс-спектрометрическим анализом и др. [2], не предназначены для получения нуклеотидной последовательности анализируемых фраг-

---

ментов ДНК. Результатом применения непрямых методов определения однонуклеотидных полиморфизмов является детектируемый сигнал, который может быть интерпретирован как соответствующий аллель (генотип). Использование в лабораторной практике непрямых методов требует включения в исследование положительных контрольных образцов – проб, содержащих ДНК с известным генотипом, а специфичность используемых методик обязательно должна подтверждаться с помощью методов секвенирования.

Выбор метода детекции генетического полиморфизма может зависеть как от задач, поставленных перед лабораторией, и в т. ч. от планируемого количества исследований, так и от первичной последовательности анализируемой области. Поскольку для определения однонуклеотидных полиморфизмов достаточно провести секвенирование небольшого фрагмента ДНК, использование секвенирования методом Сэнгера или высокопроизводительных систем генетического анализа, обеспечивающих получение генетической информации, соответствующее последовательностям в несколько миллионов и более нуклеотидов, не всегда оптимально по ряду причин. Среди этих причин можно отметить длительность и трудоемкость процедуры пробоподготовки продуктов амплификации и в некоторых случаях отсутствие универсального программного обеспечения для автоматического учета результатов определения генотипа в заданных локусах ДНК. Поэтому удобной платформой для определения известных однонуклеотидных полиморфизмов на сегодняшний день остаются системы генетического анализа, работа которых основана на прямом методе определения нуклеотидных последовательностей – методе пиросеквенирования [18, 30].

Принцип метода пиросеквенирования, также обозначаемого как пиросеквенирующий синтез или секвенирование путем синтеза, и последовательность проведения анализа были неоднократно описаны [3, 18, 20, 30], а также представлены визуально [28] ранее.

При проведении реакции пиросеквенирования осуществляется одновременный синтез всех специфических, т. е. комплементарных праймеру для секвенирования, молекул ДНК, присутствующих в реакционной смеси, а количество выделяемого пирофосфата пропорционально количеству встраивающихся при синтезе ДНК нуклеотидов.

*к сведению*

Благодаря этому существует возможность для дифференциации всех возможных генотипов анализируемого генетического локуса в количественном формате. Данная возможность реализована с помощью программного обеспечения систем генетического анализа, которое позволяет проводить количественную оценку доли всех полиморфных нуклеотидов в заданных локусах ДНК [6, 12, 20].

## Возможности технологии пиросеквенирования

Обобщая литературные и собственные результаты использования систем генетического анализа, можно заключить, что основные возможности технологии пиросеквенирования заключаются в реализации двух типов исследований: направленных на определение наследуемого генетического полиморфизма в коротких фрагментах ДНК и на анализ смесей ДНК, присутствующих в одном анализируемом образце.

При определении генетических полиморфизмов были апробированы возможности технологии пиросеквенирования и разработаны соответствующие методики, позволяющие проводить следующие исследования:

- ~ определение однонуклеотидных полиморфизмов (замены нуклеотида или его инсерции/делеции) [18], включая одновременное определение генотипов двух близко расположенных однонуклеотидных полиморфизмов, например, определение генотипов по полиморфизмам T461N C>A (\*4, rs1799814) и I462V A>G (\*2C, rs1048943) в гене CYP1A1, или комплексные варианты замен одного нуклеотида на несколько – методика определения различных сочетаний генотипов по полиморфизму 2677T>A/G (rs2032582) в гене ABCB1 [9, 20];
- ~ детекцию инсерций/делеций нескольких нуклеотидов, например, определение генотипов по полиморфизму CCR5del32 (rs333) в гене CCR5 или мутации 185delAG (rs80357713) в гене BRCA1 [15, 18, 20];
- ~ определение количества повторов, например, количества ТА-повторов (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>7</sub> (rs8175347) в гене UGT1A1 [7, 13, 20].

Анализ смесей ДНК с помощью технологии пиросеквенирования был апробирован в следующих исследованиях:

- ~ проведение детекции соматических мутаций и при необходимости их количественная оценка [6, 12, 25];
- ~ определение частот аллелей в группах пациентов на основе исследования пулированных образцов ДНК [8].

Другие возможности технологии пиросеквенирования, а также опубликованные протоколы методик для различных лабораторных исследований приведены в недавно вышедшем втором издании руководства Pyrosequencing: Methods And Protocols. В частности, определение нуклеотидных последовательностей с помощью технологии пиросеквенирования может быть также использовано для идентификации и генотипирования микроорганизмов [19, 29].

## Практическое применение тестов, основанных на технологии пиросеквенирования

С использованием технологии пиросеквенирования в ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора были разработаны

---

тесты для детекции более 200 генетических полиморфизмов [18, 27]. Часть тестов сгруппирована в профили генетических исследований для определения предрасположенности к частым мультифакторным заболеваниям, определению мутаций, ассоциированных с наследственными формами рака, и некоторым другим состояниям. Значительная часть тестов связана с фармакогенетическими исследованиями, направленными в т. ч. на определение полиморфизмов в генах, кодирующих ферменты I и II фаз биотрансформации, а также транспортеры лекарственных средств [5, 7, 9, 10, 14, 20]. Для некоторых профилей генетических исследований получено регистрационное удостоверение Росздравнадзора (№ ФСР 2012/13246 от 19.03.2012).

Поскольку технология пиросеквенирования позволяет стандартизировать проведение анализа для различных однонуклеотидных полиморфизмов по одному протоколу [18, 28, 29], в профили генетических исследований для тех или иных мультифакторных заболеваний может быть включено несколько однонуклеотидных полиморфизмов. Также возможен анализ сочетаний полиморфизмов из разных профилей, выбранных в зависимости от поставленных перед исследователем задач.

В частности, при проведении фармакогенетических исследований, которые являются на сегодняшний день самой перспективной технологией персонализированной медицины [26], существует возможность использования комбинаций различных тестов, актуальных при назначении тех или иных лекарств.

*к сведению*

Описания большей части профилей и критерии выбора генетических полиморфизмов, а также информация об отдельных тестах были опубликованы ранее [3, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 20, 22, 23].

Некоторые из упомянутых профилей генетических исследований уже используются на практике [3, 24, 27]. Наиболее востребованными исследованиями являются профили, объединяющие полиморфизмы в генах, кодирующих факторы свертываемости крови, или генетических локусах, ассоциированных с частыми мультифакторными заболеваниями.

В генах, кодирующих **плазменные факторы системы свертывания крови**, проводятся исследования полиморфизмов F2 (20210 G>A; rs1799963), F5 (R534Q, G>A; rs6025), F7 (R353Q, G>A; rs6046), FGB (455 G>A; rs1800790) и SERPINE1 (-675 5G/4G; rs1799768). В генах, кодирующих **агрегационные факторы системы свертывания крови**, – полиморфизмов GP1BA (T-5C; rs2243093 и T145M, C>T; rs6065), ITGB3 (A1/A2; rs5918), JAK2 (соматическая мутация V617F; rs77375493) и SELPLG (M62I, G>A;

rs2228315). Полиморфные варианты данных генов повышают вероятность возникновения венозных тромбозов и связанных с ними осложнений. Одновременное наличие нескольких генетических факторов значительно увеличивает риск развития тромбозов.

Тестирование данных полиморфизмов позволяет прогнозировать развитие возможных осложнений, связанных с тромбофилией, и проводить профилактические мероприятия до их возникновения. Некоторые из этих полиморфизмов также ассоциированы с акушерской патологией [5, 22].

В генах, связанных с **метаболизмом фолиевой кислоты**, проводятся исследования полиморфизмов MTHFR (A222V, C>T; rs1801133 и E429A, A>C; rs1801131), MTRR (I22M, A>G; rs1805087), MTR (D919G, A>G; rs1801394) и SLC19A1 (H27R, A>G; rs1051266). Данные полиморфизмы, влияющие на активность ферментов фолатного цикла, могут приводить к гипергомоцистеинемии – состоянию, ассоциированному как с нарушением системы свертывания крови, так и с различными патологическими состояниями при беременности [5, 22].

Для определения генетической предрасположенности к **сахарному диабету 2-го типа** проводятся исследования полиморфизмов в генах KCNJ11 (K23E, C>T; rs5219), PPARG (P12A, C>G; rs1801282), TCF7L2 (IVS3, C>T; rs7903146) и TCF7L2 (IVS4, G>T; rs12255372) [23]. Для определения генетической предрасположенности к **артериальной гипертензии** – полиморфизмов в генах ADRB2 (G16R, G>A; rs1042713), AGT (T207M, C>T; rs4762 и M268T, T>C; rs699), AGTR1 (A1166C; rs5186) и NOS3 (D298E, G>T; rs1799983) [22].

Для выявления мутаций, приводящих к наследственным формам **рака молочной железы и/или яичников**, проводится исследование генов BRCA1 и BRCA2: 185delAG (rs80357713), 300T>G (rs28897672), 2080delA (rs80357522), 4153delA (rs80357711), 5382insC (rs80357906), 6174delT (rs80359550). Перечисленные мутации были найдены в отечественных популяциях. В последние годы накапливаются данные о роли этих мутаций в возникновении опухолей других органов, в т. ч. поджелудочной железы, желудка и предстательной железы [15, 17, 23].

Для фармакогенетического исследования полиморфизмов с целью определения **терапевтической дозы варфарина** с помощью онлайн-калькулятора [www.WarfarinDosing.org](http://www.WarfarinDosing.org) проводится исследование полиморфизмов в генах VKORC1 (-1639/3673; rs9923231), CYP4F2 (V433M; rs2108622), GGCX (rs11676382), CYP2C9\*2 (rs1799853), CYP2C9\*3 (rs1057910), CYP2C9\*5 (rs28371686) и CYP2C9\*6 (rs9332131). Исследование этих полиморфизмов, и в первую очередь полиморфизмов в гене CYP2C9, также может быть использовано для определения индивидуального фармакологического ответа на другие лекарства [3, 5, 14].

---

## Перспективы технологии пиросеквенирования

Помимо уже внедренных в лабораторную практику исследований, направленных на определение клинически значимых генетических полиморфизмов, технология пиросеквенирования – как прямой метод анализа нуклеотидных последовательностей – является удобным инструментом валидации непрямых методов определения однонуклеотидных полиморфизмов, например методик, разрабатываемых в рамках исследований по выявлению генетической предрасположенности к частому мультифакторному заболеванию – ишемическому инсульту [16, 21], или при выявлении мутаций, приводящих к наследственному гемохроматозу [1].

Возможности, связанные с количественным анализом смесей фрагментов ДНК на протяжении нескольких десятков пар оснований, делают технологию пиросеквенирования перспективным инструментом как для количественного определения уже известных соматических мутаций [12], так и для поиска новых мутаций в генах, ассоциированных с канцерогенезом [6, 25, 29].

Усовершенствование в последние годы систем генетического анализа заключалось в разработке зарубежными компаниями оборудования с полностью автоматизированной процедурой пробоподготовки [11, 18]. Кроме этого, создание систем генетического анализа с дополнительными картриджами для реакционных смесей обеспечивает возможность проведения параллельного определения нескольких нуклеотидных последовательностей в одном образце [11]. Другое направление совершенствования систем генетического анализа заключается в обновлениях программного обеспечения и изменении реагентов для синтеза ДНК. Заявленные разработчиками обновления и дополнительные опции программного обеспечения позволяют увеличить длину и качество сиквенсов, что имеет большое значение при анализе неизвестных или гипервариабельных локусов ДНК.

Поскольку все оборудование для проведения пиросеквенирования представляет собой открытую систему, существует возможность расширения спектра анализируемых генетических тестов и профилей генетических исследований. Разработка новых тестов для определения генетических полиморфизмов диктуется вновь публикуемыми данными о роли генетических факторов в возникновении тех или иных заболеваний и клинических состояний, информация о которых может быть использована для своевременного проведения диагностических и профилактических мероприятий в клинической практике [3, 20].

## Список использованной литературы

1. Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. Сравнение трех молекулярно-генетических методик для определения основных мута-

ций в гене HFE, связанных с развитием наследственного гемохроматоза // Клиническая лабораторная диагностика. 2016 (в печати).

2. Введение в молекулярную диагностику. В 2-х т. Т. 2 / Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залетаева. М.: ОАО «Издательство “Медицина”», 2011. 504 с.

3. Волкова Ю.В., Садыков Т.Ф., Кудрявцева Л.В. Технология пиросеквенирования как инструмент персонализированной медицины // Лабораторная служба. 2013. № 2. С. 12–15.

4. Генетика бронхолегочных заболеваний: монография / Под ред. В.П. Пузырева, Л.М. Огородовой. М.: Издательский холдинг «Атмосфера», 2010. 160 с.

5. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В.С. Баранова. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с.

6. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А. и др. Выявление активирующих соматических мутаций в гене KRAS методом пиросеквенирования // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 6. С. 49–51.

7. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. Определение полиморфизма (ТА)<sub>6</sub>/(ТА)<sub>7</sub> в гене UGT1A1 методом пиросеквенирования // Молекулярная медицина. 2014. № 2. С. 38–40.

8. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А. и др. Определение частот аллелей SNP в пулированных образцах методом пиросеквенирования // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014». Сборник трудов. М., 2014. Т. 2. С. 397–399.

9. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. Полиморфизмы генов, кодирующих транспортеры лекарственных средств ABCB1 и ABCG2, и исследование их методом пиросеквенирования // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т. 75. № 10. С. 29–36.

10. Дрибноходова О.П., К.О. Миронов, Г.А. Шипулин. Профиль генетического исследования для оценки эффективности лечения хронического миелолейкоза // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010». М., 2010. Т. IV. С. 50–56.

11. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Шипулин Г.А. Апробация новой системы генетического анализа для пиросеквенирования Qseq // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014». Сборник трудов. М., 2014. Т. 2. С. 392–394.

12. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Количественное определение мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 11. С. 60–63.

13. Канестри В.Г., Миронов К.О., Кравченко А.В. Генетические маркеры клинически выраженных нежелательных явлений у больных с ВИЧ-

---

инфекцией, получающих антиретровирусную терапию // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2014. Т. 6. № 2. С. 49–57.

14. Клиническая фармакогенетика: учебное пособие / Под ред. В.Г. Кукуца, Н.П. Бочкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 248 с.

15. Колотвин В.В. Определение наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичника методом пиросеквенирования // Лабораторная служба. 2014. № 1. С. 29–31.

16. Корчагин В.И., Платонов А.Е., Миронов К.О. и др. Предпосылки профилактики инсульта с учетом индивидуальных генетических факторов предрасположенности // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014». Сборник трудов. М., 2014. Т. 2. С. 229–232.

17. Любченко Л.Н., Батенева Е.И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников М.: ИГ РОНЦ, 2014. 64 с.

18. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П. Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24 // Справочник заведующего КДЛ. 2011. № 4. С. 39–48.

19. Миронов К.О., Платонов А.Е., Козлов Р.С. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2011. Т. 13. № 4. С. 304–313.

20. Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. Определение нуклеотидных полиморфизмов с помощью систем генетического анализа, основанных на пиросеквенировании // Лабораторная медицина. 2013. № 12. С. 75–79.

21. Миронов К.О., Максимова М.Ю., Платонов А.Е. и др. Предварительные результаты комплексной оценки генетических факторов предрасположенности у лиц, перенесших ишемический инсульт // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014». Сборник трудов. М., 2014. Т. 2. С. 251–253.

22. Потехина Е.С., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Генетические полиморфизмы и риск развития некоторых мультифакторных заболеваний // Справочник заведующего КДЛ. 2014. № 9. С. 36–51.

23. Потехина Е.С., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Генетические полиморфизмы и риск развития некоторых мультифакторных заболеваний // Справочник заведующего КДЛ. 2014. № 10. С. 37–47.

24. Садыхов Т.Ф., Волкова Ю.В., Кудрявцева Л.В. Молекулярно-генетическая лаборатория: необходимость, назначение, перспективы // Лабораторная служба. 2012. № 2. С. 20–25.

25. Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О. Случай развития гомозиготности мутации N542-E543 del в 12-м экзоне гена JAK2 у пациента с истинной полицитемией // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. № 9. С. 37–38.

26. Сычев Д.А. Фармакогенетика и фармакогеномика: самые близкие к клинике направления персонализированной медицины // Фармакогенетика и фармакогеномика. 2015. № 1. С. 3.

27. Шипулин Г.А., Манзенюк И.Н. Вклад Центрального НИИ Эпидемиологии в развитие отечественной молекулярной диагностики // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 2. С. 21–27.

28. King C., Scott-Horton T. Pyrosequencing: A Simple Method for Accurate Genotyping // J. Vis. Exp. 2008. Vol. 11. P. 630.

29. Tost J., Lehmann U. Pyrosequencing: Methods And Protocols, 2 Edition (methods In Molecular Biology, Book 1315). Humana press, 2015. 429 p.

30. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate // Science. 1998. Vol. 17. № 281 (5375). P. 363–365.

31. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. № 12. P. 5463–5467.



---

## Современные методы молекулярной диагностики урогенитальной хламидийной и гонококковой инфекции

**Л.А. Чернышева**

*мл. науч. сотр.,*

**А.Е. Гуцин**

*канд. биол. наук, заведующий лабораторией*

*Лаборатория молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекции органов репродукции ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора*

*Chlamydia trachomatis и Neisseria gonorrhoeae – возбудители значимых для репродуктивной патологии инфекций. Клинические проявления урогенитальной хламидийной и гонококковой инфекций неспецифичны, поэтому для постановки диагноза необходимо проведение лабораторных исследований. В обзоре литературы дана сравнительная характеристика зарубежных наборов реагентов для выявления нуклеиновых кислот *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*, представлены диагностические характеристики, основные преимущества и ограничения амплификационных и неамплификационных методов. Также в обзоре приводится информация о наборах реагентов на основе методов амплификации нуклеиновых кислот российского производства.*

*Chlamydia trachomatis и Neisseria gonorrhoeae – возбудители широко известных, значимых для репродуктивной патологии инфекций. Клинические проявления урогенитальной хламидийной инфекции (УХИ) и гонококковой инфекции (ГИ) преимущественно неспецифичны и не позволяют установить этиологию заболевания, для постановки диагноза необходимо проведение лабораторных исследований [1, 3, 4]. Достоинствам и недостаткам разных способов лабораторной диагностики УХИ и ГИ посвящено большое количество публикаций, представляющих результаты собственных исследований или обзоры данных литературы [5, 6, 14, 15]. В настоящее время практически*

все исследователи сходятся во мнении, что выявление ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) следует считать основой лабораторной диагностики УХИ, исследование показано и для контроля результатов лечения. Выявление ДНК *N. gonorrhoeae* методом ПЦР многие авторы рассматривают как оптимальное исследование для скрининга пациентов обоего пола, показано его применение и для оценки результатов лечения ГИ.

Материалом для обнаружения ДНК *N. gonorrhoeae* и *C. trachomatis* методом ПЦР служат образцы соскобов отделяемого слизистой оболочки уретры, первая порция мочи или секрет предстательной железы у мужчин, отделяемое слизистой оболочки цервикального канала и влагалища у женщин, а также соскобное отделяемое слизистых оболочек ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы. Образцы соскобного отделяемого слизистой оболочки влагалища, полученные в условиях стационара, эквивалентны по информативности соскобам, полученным самостоятельно. Для некоторых тестов допустимо исследование образцов цервикальных соскобов, отобранных в транспортную среду для жидкостной цитологии.

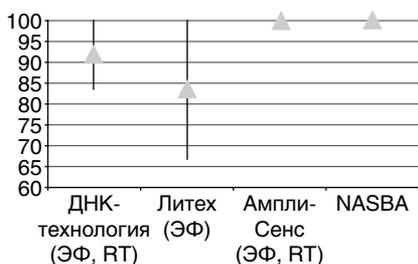
Разумеется, в настоящее время многие лаборатории отдают предпочтение реагентам отечественного производства, тем не менее мы полагаем, что предлагаемый обзор свойств наборов реагентов ведущих зарубежных фирм для молекулярной диагностики УХИ и ГИ представляет определенный интерес.

Первые наборы реагентов на основе методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), направленные на прямое обнаружение рибосомальной РНК *C. trachomatis*, появились в 1980-е гг. В последующие годы было разработано и внедрено в клиническую практику несколько МАНК на основе различных технологий, из которых преобладающее распространение получила ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

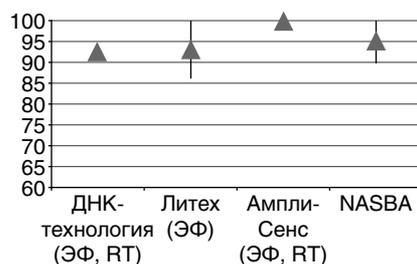
В основу первых тестов для обнаружения ДНК/РНК *N. gonorrhoeae*, таких как PACE 2 (Gen-Probe) и Hybrid Capture 2 (HC2) CT/NG (Digene Corporation), были положены неамплификационные методы гибридизации нуклеиновых кислот микроорганизма специфическими комплементарными зондами с последующей детекцией сигнала. Эти тесты были предназначены для одновременного обнаружения двух патогенов – *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*, однако не позволяли дифференцировать микроорганизмы, и в случае положительного результата было необходимо проведение дополнительного исследования с использованием тестов, определяющих наличие ДНК/РНК отдельных микроорганизмов. Исследования показали, что неамплификационные методы менее чувствительны, чем тесты следующего поколения, основанные на технологиях амплификации нуклеиновых кислот, и сейчас не рекомендованы для диагностики ГИ. В настоящее время набор Gen-Probe PACE® 2 System Assay (Gen-Probe, Сан-Диего, США) применяется только для исследования образцов соскобного отделяемого конъюнктивы.

В 2013 г. пять наборов реагентов были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) для диагностики УХИ и ГИ у пациентов обоего пола при наличии и отсутствии соответствующей симптоматики. Наборы реагентов на основе МАНК для одновременного выявления нуклеиновых кислот *S. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* основаны на различных молекулярно-биологических методах определения ДНК (ПЦР-РВ, технология термофильной амплификации с вытеснением цепи (strand displacement amplification, SDA)) или РНК (технология транскрипционно-опосредованной амплификации (transcription-mediated amplification, TMA)). Диагностическая чувствительность тестов, применяющих технологии ПЦР и SDA, отличалась в различных исследованиях и находилась в диапазоне 91,3–100% для всех регламентированных видов биоматериала за исключением мочи женщин (диагностическая чувствительность 66,7%), поэтому некоторые исследователи отмечают, что моча не является оптимальным биоматериалом для диагностики ГИ у женщин. Диагностическая чувствительность метода TMA превышала 98,0%, диагностическая специфичность МАНК-тестов достигала 98,0–100%. Хотя результаты многих исследований показали преимущество МАНК перед другими методами, для диагностики УХИ могут быть рекомендованы только те МАНК, которые способны выявлять все известные варианты хламидий, в т. ч. новый вариант *S. trachomatis* (nvCT), имеющий делецию длиной 377 п. н. в криптической плазмиде, описанный в 2006 г. в Юго-Западной Швеции [8, 10, 11]. Сравнительная характеристика диагностических тестов, в первую очередь одобренных FDA и широко применяемых за рубежом, представлена в таблице.

В Российской Федерации разработаны и зарегистрированы несколько наборов реагентов для обнаружения ДНК/РНК *N. gonorrhoeae* и *S. trachomatis*, с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза (ЭФ) или ПЦР-РВ. Доступны публикации о характеристиках некоторых из них (рис. 1, 2) [12, 13]. «Ахиллесовой пятой» большинства МАНК-тестов российского производства остается отсутствие полноценной валидации,



**Рис. 1.** Диагностическая чувствительность (%) российских МАНК-тестов для определения *N. gonorrhoeae* [12, 13]



**Рис. 2.** Диагностическая чувствительность (%) российских МАНК-тестов для определения *S. trachomatis* [12, 13]

проводимой с целью оценки их диагностических характеристик. В результате диагностическая чувствительность наборов реагентов сильно варьирует.

В связи с неспецифичностью симптомов и частым субъективно асимптомным течением диагноз ГИ и УХИ сложно установить на основании исключительно клинических данных, что согласно клиническим рекомендациям Российского общества дерматовенерологов и косметологов 2012 г. [13] обуславливает необходимость дифференциальной лабораторной диагностики урогенитальных заболеваний, вызванных различными патогенными микроорганизмами. Первые мультипраймерные наборы на основе ПЦР с детекцией методом электрофореза для выявления *C. trachomatis* и *M. genitalium* и/или условно патогенных организмов (*M. hominis*) в Российской Федерации были предложены около 10 лет назад [2]. Однако разработанные тесты не позволяли обнаружить один из значимых возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, – *N. gonorrhoeae*. В последующие годы ведущие отечественные производители реагентов для молекулярной диагностики предложили потребителям несколько вариантов мультиплексных наборов для выявления ДНК возбудителей урогенитальных заболеваний: «РеалБест ДНК Chlamydia trachomatis / Neisseria gonorrhoeae», ДНК-технология «NC КОМПЛЕКС», «АмплиСенс *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» и др. В настоящее время в Российской Федерации разработан и разрешен к применению набор реагентов на основе ПЦР в мультиплексном формате, позволяющий одновременно определять ДНК *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, не имеющий аналогов за рубежом. Набор реагентов был валидирован при участии Сотрудничающего центра ВОЗ по проблеме гонореи и других инфекций, передаваемых половым путем, Орбродо, Швеция (WHO Collaborating Centre for Gonorrhoea and Other STIs), Центра по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) в сравнении с тестами АРТИМА, одобренными FDA. Набор реагентов продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность для определения ДНК указанных микроорганизмов [7, 9].

### Список использованной литературы

1. Гуцин А.Е., Иванова Т.А. Инфекции органов репродукции. Лабораторная диагностика инфекционных болезней: Справочник / Под ред. В.И. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. М.: Издательство БИНОМ, 2013. С. 23–29.
2. Щербо С.Н. Мультипраймерная ПЦР в лабораторной диагностике инфекций // Лабораторная медицина. 2006. № 8. С. 77–82.
3. Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями Российского общества дерматовенерологов и косметологов. М., 2012.
4. Молекулярно-биологическое исследование для выявления ДНК и/или РНК возбудителей инфекций, передаваемых половым путем (*Neisseria gonorrhoeae*,

---

Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis) // Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины». <http://www.fedlab.ru/upload/medialibrary/f0b/kochetov-ag.-klin-rek-kld.-standartiz.an.tekhn.-ptsr-po-ipp-p-noya-2014.pdf> (дата обращения: 02.09.2015).

5. Arlo Upton, Collette Bromhead, David M. Whiley Neisseria gonorrhoeae False-Positive Result Obtained from a Pharyngeal Swab by Using the Roche cobas 4800 CT/NG Assay in New Zealand in 2012 // Journal of Clinical Microbiology. 2013. Vol. 51. P. 1609–1610.

6. Barbara Van Der Pol, Edward W. Hook, James A. Williams, et al. Performance of the BD CTQx and GCQx Amplified Assays on the BD Viper LT Compared With the BD Viper XTR System // Sex Transm Dis. 2015. Vol. 42. P. 521–523. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000313.

7. Domeika M., Chen C. Y., Ivanova T. et al. International validation of AmpliSens® – Neisseria gonorrhoeae / Chlamydia trachomatis / Mycoplasma genitalium / Trichomonas vaginalis – MultiPrime-FL PCR (Moscow, Russia) to detect Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium and Trichomonas vaginalis in vaginal samples // Abstract Book: 12th IUSTI World Congress, New Delhi, India. 2012. P. 51.

8. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae – 2014 // CDC – Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6302a1.htm> (дата обращения: 07.07.2015).

9. Rumyantseva T., Golparian D., Nilsson C.S. et al. Evaluation of the new AmpliSens multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, and Trichomonas vaginalis // APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2015. P. 1–8.

10. Screening Tests To Detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae Infections – 2002 // CDC – Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5115.pdf> (дата обращения: 07.07.2015).

11. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015 // CDC – Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6403a1.htm> (дата обращения: 07.07.2015).

12. Shipitsyna E., Zolotoverkhaya E., Agné-Stadling I. et al. First evaluation of six nucleic acid amplification tests widely used in the diagnosis of Chlamydia trachomatis in Russia // Journal European Academy of Dermatology and Venereology. 2009. № 23. P. 268–276.

13. Shipitsyna E., Zolotoverkhaya E., Hjelmvoll S.O. et al. Evaluation of six nucleic acid amplification tests used for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in Russia compared with an international strictly validated real-time porA pseudogene polymerase chain reaction // Journal European Academy of Dermatology and Venereology. 2009. № 23. P. 1246–1253.

14. Stephanie N. Taylor, Oliver Liesenfeld, Rebecca A. Lillis et al. Evaluation of the Roche cobas CT/NG Test for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Male Urine // Sexually Transmitted Diseases. July 2012. Vol. 39. Number 7. P. 543–549.

15. Whiley D.M., Limnios A., Moon N.J. et al. False-negative results using Neisseria gonorrhoeae porA pseudogene PCR - a clinical gonococcal isolate with an N. meningitidis porA sequence, Australia, March 2011 // Euro Surveillance. 2011. № 16 (21). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19874>.

## Характеристика некоторых зарубежных тестов для молекулярной диагностики *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* [1, 3, 5, 6, 7]

| Принцип метода  | Определяемые возбудители | Мишень   | Биоматериал  | Чувствительность                      | Специфичность  | Дополнительная информация  |
|---|--------------------------|----------|--|---------------------------------------|----------------|--|
| 1   | 2                        | 3        | 4  | 5                                     | 6              | 7  |
| <b>Неамплификационные методы</b>  |                          |          |  |                                       |                |  |
| <b>Gen-Probe PACE<sup>®</sup> 2 System Assay (Gen-Probe, США)</b>   |                          |          |  |                                       |                |  |
| Неамплификационная гибридизация нуклеиновых кислот. В ходе реакции одноцепочечно-го ДНК-зонда с хемилюминесцентной меткой, комплементарного рибосомальной РНК искомым микроорганизмов, образуется стабильный ДНК-РНК-гибрид, люминесценция которого измеряется люминометром. Результат выдается в относительных световых единицах (RLU) | <i>C. trachomatis</i>    | 23S рРНК | Отделяемое конъюнктивы<br>Соскоб из цервикального канала<br>Соскоб из уретры | Около 70%<br>89,9–98,0%<br>93,3–97,1% | 99,8%<br>98,9% | Преимущества:<br>~ биоматериал для исследования стабилен в течение 7 дней при комнатной температуре;<br>~ высокая пропускная способность (100 образцов за 3 ч).<br>Ограничения:<br>~ тест не рекомендован для исследования соскобного отделяемого слизистой оболочки, прямой кишки, ротоглотки, влагалища, мочи;<br>~ не позволяет дифференцировать микроорганизмы, в случае положительного результата необходимо проведение дополнительного исследования с использованием тестов, определяющих наличие ДНК/РНК отдельных микроорганизмов;<br>~ <i>N. gonorrhoeae</i> тест рекомендован только для исследования образцов конъюнктивы |
|   | <i>N. gonorrhoeae</i>    | 16S рРНК | Отделяемое конъюнктивы   | 97,8%                                 | 98,9%          |  |

| 1   | 2                     | 3   | 4  | 5   | 6          | 7  |
|---|-----------------------|---|--|---|------------|--|
| <b>Digene Hybrid Capture II (HC2 CT-GC Dual ID DNA Test, Qiagen, Германия)</b>  |                       |   |  |   |            |  |
| Технология гибридного захвата. В ходе реакции образуются гибриды между ДНК искомого микроорганизма и РНК-зондом, который захватывается моноклональными антителами с последующей сорбцией на полистироловом планшете | <i>S. trachomatis</i> | Геномная ДНК (длина фрагмента 39 тыс. п. н.) или ДНК криптической плазмиды  | Соскоб из цервикального канала, соскоб из уретры   | 92,3–97,7%                                    | 98,2–98,6% | Преимущества: биоматериал для исследования стабилен в течение 7 дней при комнатной температуре (14 дней – эндцервикальные соскобы при выявлении ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> ).<br>Ограничения:<br>~ тест не рекомендован для исследования соскобного отделяемого слизистой оболочки прямой кишки, ротоглотки, влагалища, отделяемого конъюнктивы, мочи;<br>~ не позволяет дифференцировать микроорганизмы, в случае положительного результата необходимо проведение дополнительного исследования с использованием тестов, определяющих наличие ДНК/РНК отдельных микроорганизмов;<br>~ средняя пропускная способность (96 образцов при ручной подготовке на планшете за 6–8 ч) |
|   | <i>N. gonorrhoeae</i> | Геномная ДНК или ДНК криптической плазмиды  | Соскоб из цервикального канала, соскоб из уретры (мужчины), вагинальный соскоб, моча (мужчины и женщины) | 92,6–95,2%                                    | 98,5–98,9% |  |
| <b>Амплификационные методы</b>  |                       |   |  |   |            |  |
| <b>Cobas Amplicor / Cobas CT/NG test (Roche Diagnostics, США)</b>   |                       |   |  |   |            |  |
| Технология мультиплексной ПЦР в режиме реального времени  | <i>S. trachomatis</i> | Двойная мишень: фрагмент последовательности ДНК криптической плазмиды длиной 207 п. н. (прайммеры CP102 и CP103); | Моча   | 92,0% (при исследовании образцов мочи мужчин) | 98,4–100%  | Преимущества:<br>~ набор реагентов позволяет обнаруживать «Шведский» вариант <i>S. trachomatis</i> (pVST), имеющий делецию длиной 377 п. н. в криптической плазмиде;   |

## Повышение квалификации

| 1 | 2                    | 3  | 4   | 5   | 6   | 7   |
|---|----------------------|--|---|---|---|---|
|   |                      | ~ фрагмент гена главного белка наружной мембраны (МOMP) длиной 182 нуклеотида (праймеры СТМР101 и СТМР102)   | Соскоб из цервикального канала<br>Соскоб из уретры<br>Соскоб слизистой оболочки влагалища (полученный самостоятельно или в клинике) | 44,4–82,5% (при исследовании образцов мочи женщин)<br>51,9–96,8%<br>98,0%<br>97,6–98,2%                                     |   | ~ использование внутреннего контроля позволяет определять присутствие ингибиторов в пробе;<br>~ разрешено использование различных типов зондов-гампонов (дакроновые, вискозные, из альгината кальция на пластинковой или неалюминиевой основе) и транспортных сред; тест определяет штаммы <i>S. trachomatis</i> , не содержащие плазмид.<br>Ограничения:<br>~ соскобы из цервикального канала и уретры стабильны для исследования при комнатной температуре не более 1 ч;<br>~ тест не рекомендован для исследования соскобного отделяемого слизистой оболочки прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы |
|   | <i>N.gonorrhoeae</i> | В наборе реагентов Cobas AmpliCor: последовательность гена цитозин-метилтрансферазы <i>MiNgO P11</i> длиной 201 п. н.<br>В наборе реагентов COBAS CT/NG assay: две различные последовательности в области прямого повтора DR9, который повторяется | Моча  | 66,7% (при исследовании образцов мочи женщин)<br>95,2% (при исследовании образцов мужской мочи)<br>42,3% (при исследовании) | 97,9–98,7% (в наборе реагентов Cobas AmpliCor)<br>99,4–100% (в наборе реагентов COBAS AmpliCor CT/NG assay) | Преимущества: в наборе реагентов COBAS AmpliCor CT/NG assay используется принцип двойной мишени – для подтверждения положительного результата необходимо повторное исследование с использованием второй тест-системы, что исключает ложноположительные результаты.<br>Ограничения: возможны перекрестные реакции с <i>N. meningitidis</i> и другими видами <i>Neisseria spp.</i>  |

| 1  | 2  | 3  | 4   | 5   | 6                          | 7   |
|--|--|--|---|---|----------------------------|---|
|  |  | трижды в геноме <i>N. gonorrhoeae</i> и имеет две высококонсервативные последовательности: ~ праймеры NG514 и NG519, определяющие последовательность длины примерного 190 п. н. (DR-9A); ~ праймеры NG552 и NG579, определяющие последовательность длины примерного 215 п. н. (DR-9B)  | Соскоб из цервикального канала<br>Соскоб из уретры (мужчины)  | образцов мочи у бесплодных пациентов (мужчин)<br>84,0–100%<br>96,4–100% |                            |   |
| <b>Abbott RealTime CT/NG (ABBOTT Molecular diagnostics, США)</b> |  |  |   |   |                            |   |
| Технология мультиплексной ПЦР в режиме реального времени         | <i>C. trachomatis</i><br><br><i>N. gonorrhoeae</i> | Две различные последовательности ДНК криптокислотной плазмиды <i>C. trachomatis</i> длиной 102 и 140 п. н. В качестве внутреннего контроля используется фрагмент гена гидроксилирующей рибонуклеотидилтрансферазы ( <i>Cucurbita pepo</i> ) длиной 136 п. н.<br><br>Мультикопийная последовательность гена белка мутности ( <i>NG-OPA</i> ) длиной 122 п. н. | Соскоб слизистой оболочки влагалища (полученный самостоятельно или в клинике), моча, соскоб из цервикального канала, соскоб из уретры | 93,7–100%<br><br>91,4–100%  | 98,2–100%<br><br>99,3–100% | Преимущества:<br>~ полностью автоматизированная система Abbott m2000 system;<br>~ использование внутреннего контроля амплификации позволяет определять присутствие ингибиторов в пробе;<br>~ доступна ручная (96-луночный планшет), полуавтоматизированная (платформа COBAS) или автоматизированная подготовка;<br>~ набор реагентов позволяет обнаруживать «Шведский» вариант <i>C. trachomatis</i> ( <i>nvCT</i> ), имеющий делецию длиной 377 п. н. в криптокислотной плазмиде.<br>Ограничения:<br>~ тест не рекомендован для исследования соскобного отделяемого слизистой оболочки |

## Повышение квалификации

| 1   | 2                            | 3   | 4   | 5   | 6  | 7   |
|---|------------------------------|---|---|---|--|---|
| <p><b>BD ProbeTec ET CT/GC Amplified DNA assay; BD ProbeTec Qx CT Amplified DNA assay; BD ProbeTec Qx GC Amplified DNA Assay (Becton Dickinson and Company, США)</b></p> <p>Технология термофильной амплификации с вытеснением цепи (Strand displacement amplification (SDA)).</p> <p>В реакции используются праймеры, содержащие сайты рестрикции, которые распознаются и «надрезаются» рестриционными ферментами. ДНК-полимераза синтезирует новую цепь ДНК, вытесняя рестрицированную цепь</p> | <p><i>S. trachomatis</i></p> | <p>Последовательность ДНК криптической плазмиды длиной 100 п. н.</p>          | <p>Соскоб из цервикального канала</p> <p>Соскоб из уретры</p> <p>Моча</p> | <p>91,3–92,8%</p> <p>92,5%</p> <p>80,5–93,0% (при исследовании образцов мочи женщин);</p> <p>93,1–98,0% (при исследовании образцов мочи мужчин)</p> | <p>98,3%</p> <p>98,4%</p> <p>99,4% (при исследовании образцов мочи женщин);</p> <p>98,1% (при исследовании образцов мочи мужчин)</p> | <p>прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы;</p> <p>~ средняя пропускная способность (в зависимости от конфигурации – от 22 образцов за 3 ч 45 мин до 120 образцов за 10 ч);</p> <p>~ тест не определяет штаммы <i>S. trachomatis</i>, не содержащие плазмид</p> |
| <p><b>BD ProbeTec ET CT/GC Amplified DNA assay; BD ProbeTec Qx CT Amplified DNA Assay; BD ProbeTec Qx GC Amplified DNA Assay (Becton Dickinson and Company, США)</b></p> <p>Технология термофильной амплификации с вытеснением цепи (Strand displacement amplification (SDA)).</p> <p>В реакции используются праймеры, содержащие сайты рестрикции, которые распознаются и «надрезаются» рестриционными ферментами. ДНК-полимераза синтезирует новую цепь ДНК, вытесняя рестрицированную цепь</p> | <p><i>N.gonorrhoeae</i></p>  | <p>Мультикопийная последовательность гена пилина (PilNG) длиной 103 п. н.</p> | <p>Соскоб из цервикального канала</p> <p>Соскоб из уретры</p>             | <p>91,3–96,5%</p> <p>98,5–100%</p>  | <p>99,3–99,8%</p> <p>99,2–100%</p>   | <p>Преимущества: образцы мочи стабильны для исследования в течение 4–6 дней при температуре 2–8 °С и в течение 2 дней при температуре 15–27 °С.</p>   |

| 1  | 2   | 3  | 4                              | 5  | 6  | 7   |
|--|---|--|--------------------------------|--|--|---|
|  |   |  | Моча                           | 82,1–100% (при исследовании образцов мочи женщин); 92,3–100% (при исследовании образцов мочи мужчин) | 99,5–99,9% (при исследовании образцов мочи женщин); 99,2–99,8% (при исследовании образцов мочи мужчин) | Ограничения:<br>~ набор реагентов не рекомендован для исследования биоматериала на наличие ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> у бессимптомных пациентов-мужчин;<br>~ возможны перекрестные реакции с <i>Neisseria cinerea</i> , <i>Neisseria subflava</i> и <i>Neisseria lactamica</i>   |
| <b>Xpert CT/NG Assay (Cepheid, США)</b>  |   |  |                                |  |  |   |
| Технология мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Реакция протекает в индивидуальном для каждого образца картридже, что минимизирует процедуру пробоподготовки | <i>C. trachomatis</i>   | Последовательность ДНК криптической плазмиды   | Соскоб из цервикального канала | 97,4%  | 99,4%  | Преимущества:<br>~ тест определяет штаммы <i>C. trachomatis</i> , не содержащие плазмид;<br>~ возможность быстрого получения результата (менее чем за 2 ч).<br>Ограничения:<br>~ тест не рекомендован для исследования соскобного отделяемого слизистой оболочки прямой кишки, уретры, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы;<br>~ невысокая пропускная способность |
|  |   |  | Моча                           | 97,6% (при исследовании образцов женской мочи); 97,5% (при исследовании образцов мужской мочи)       |  |   |
|  | Соскоб слизистой оболочки влагалища (полученный самостоятельно или в клинике) | 98,7%  |                                |  |  |   |
|  | <i>N. gonorrhoeae</i>   | Две различные последовательности бактериальной хромосомы. Для получения положительного результата по | Соскоб из цервикального канала | 100%   | 100%   |   |
|  |   |  | Моча                           | 91,7% (при исследовании)   | 99,9%  |   |

## Повышение квалификации

| 1   | 2   | 3   | 4   | 5  | 6          | 7          |
|---|---|---|---|--|------------|------------|
| Технология транскрипционно-опосредованной амплификации и двойного кинетического анализа | C. trachomatis  | N.gonorrhoeae должны быть определены обе последовательности   | <p>Артима COMBO 2 assay; Артима СТ assay;</p> <p>Артима Combo 2 assay: 23S рРНК Артима СТ assay: 16S рRNA</p> | Соскоб слизистой оболочки влагалища (полученный самостоятельно)  | 100%       | 99,9%      |
|   |   |   |   | <p>Соскоб из цервикального канала</p> <p>Соскоб из уретры</p> <p>Моча</p> <p>Соскоб слизистой оболочки влагалища (полученный самостоятельно или в клинике)</p> | 92,8–94,1% | 97,6–99,4% |
|   | N.gonorrhoeae   | Артима Combo 2 assay: 16S рРНК Артима СТ assay: 16S рРНК, отличающаяся от используемой в Артима Combo 2 assay | Соскоб из цервикального канала  | 98,6–99,2%   | 98,7–99,8% |            |
|   |   |   | Соскоб из уретры  | 99,1%  | 97,8%      |            |
|   |   |   | Моча  | 98,5%  | 99,6%      |            |
|   | <p><b>Артима COMBO 2 assay; Артима СТ assay (Hologic/Gen-Probe Inc., США)</b></p> <p>Преимущества:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>~ образцы, отобранные в транспортные пробирки, стабильны для исследования в течение длительного периода при температуре 2–30 °С (60 дней для соскобного отделяемого и 30 дней для мочи);</li> <li>~ полностью автоматизированная платформа с тремя уровнями пропускной способности (400, 800 или 1600 результатов за 8 ч);</li> <li>~ набор реагентов позволяет обнаруживать «Шведский» вариант C. trachomatis (nuСТ), имеющий делецию длиной 377 п. н. в криптической плазмиде.</li> </ul> <p>Ограничения:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>~ тест не рекомендован для исследования соскобного отделяемого слизистой оболочки прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы;</li> <li>~ внутренний контроль не входит в состав набора реагентов;</li> <li>~ тест не определяет штаммы C. trachomatis, не содержащие плазмид</li> </ul> |   |   |  |            |            |

## Применение технологии биочипов в лабораторной диагностике и клинической практике

**М.Л. Маркелов**

*канд. биол. наук, ст. науч. сотр.  
лаборатории постгеномных технологий  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-исследовательский  
институт медицины труда», Москва,*

**Г.В. Савинов**

*канд. биол. наук, мл. науч. сотр.  
отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии  
Федерального бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»  
Роспотребнадзора, Москва*

*Основная цель персонализированной медицины – улучшение качества оказываемой медицинской помощи. Для выполнения данной задачи требуются особые диагностические системы, которые бы давали необходимую индивидуальную физиологическую, генетическую и биохимическую информацию, позволяющую выбирать лечебные и профилактические средства, оптимальные для конкретного пациента. В настоящее время ДНК-биочипы являются одними из наиболее перспективных диагностических систем в приложении к персонализированной медицине. В данной статье мы даем краткий экскурс в историю создания технологии ДНК-биочипов, а также описываем основные подходы к их изготовлению. В заключительной части данного обзора мы рассматриваем ДНК-биочипы ведущих фирм-производителей.*

---

С развитием методов молекулярной диагностики возникла необходимость увеличения количества одновременно анализируемых параметров биологического материала, ускорения процесса анализа и его удешевления. Так, например, генетическое картирование индивидуальных особенностей генома человека (для оценки риска предрасположенности к некоторым соматическим заболеваниям или для т. н. генетической паспортизации населения) предполагает анализ одновременно от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч однонуклеотидных полиморфизмов (Single nucleotide polymorphism, SNP).

В 1953 г. Уотсон и Крик совершили фундаментальное открытие, доказав, что молекулы нуклеиновых кислот способны образовывать полимерные структуры в форме двунитевых спиралей. Термодинамические свойства таких структур определяются буферными условиями растворов, в которых анализируется ДНК (ионная сила, кислотность, двухвалентные ионы, полярные компоненты (формамид, диметил сульфоксид), концентрация ДНК). Кроме того, кинетика процессов денатурации (плавления) – ренатурации (реассоциации) ДНК определяется особенностями ее первичной структуры: соотношением нуклеиновых оснований, наличием повторяющихся последовательностей, суммарной протяженностью уникальных участков и их гетерогенностью. Эти особенности ДНК позволяют проводить сравнительный анализ последовательностей генетического материала микроорганизмов с помощью так называемых методов молекулярной гибридизации.

### **Методы гибридизационного анализа**

Один из наиболее информативных и удобных форматов гибридизационного анализа предполагает иммобилизацию (пришивку) исследуемого препарата ДНК или РНК на плотную поверхность-носитель (мембрану, стекло, органические полимеры), которую помещают в водный раствор с препаратом ДНК для сравнения. Высокомолекулярная ДНК предварительно может быть гидролизована ферментами рестрикции (эндонуклеазами), фракционирована с помощью гель-электрофореза и перенесена на полоску полимерной мембраны (10 × 10–100 мм). В качестве гибридизационной пробы, как правило, используют сравнительно небольшие фрагменты ДНК или РНК известной структуры с включенными изотопными, флуоресцентными или другими низкомолекулярными метками. Данный метод, названный в честь предложившего его ученого «гибридизацией по Саузерну (Southern)» (или ДНК-блот гибридизация), очень эффективен при анализе одновременно до нескольких десятков препаратов ДНК [16, 17]. Подобным же образом можно анализировать и препараты РНК (без предварительного гидролиза ферментами), данный метод называют Нозерн-блот гибридизацией (Northern).

Ранее при использовании радиоактивных изотопов в качестве молекулярной метки детекция сигнала на поверхности мембраны после гибридизации осуществлялась с помощью рентгеновской пленки, которую помещали непосредственно на мембрану, экспонировали несколько часов, проявляли и фиксировали для дальнейшего анализа результатов. Использование радиоактивных изотопов обеспечивало очень высокую чувствительность выявления гомологов соответствующих гибридизационной пробе. Чувствительность могла достигать 1000–10 000 молекул фрагментов ДНК/РНК длиной в несколько сотен нуклеотидов.

В настоящее время для тех же целей и с теми же значениями чувствительности используют в основном хемилюминесцентные и флуоресцентные метки, не требующие специальных условий безопасности работы, как в случае с радиоактивными изотопами. Кроме того, вместо рентгеновской пленки для документирования результатов используют специальные устройства-сканеры на основе цифровых камер и чувствительных к ионизирующему излучению детекторов.

Несмотря на высокую чувствительность, обе модификации гибридизационного анализа (Southern и Northern) имеют ряд ограничений:

- ~ количество одновременно анализируемых проб ДНК составляет лишь десятки образцов;
- ~ время гибридизационного анализа может составлять несколько часов;
- ~ трудно стандартизовать количественный анализ результатов;
- ~ процедура весьма трудоемка и требует большого количества биологического материала (ДНК или РНК) и дорогостоящих расходных материалов.

Стремление увеличить количество одновременно анализируемых препаратов ДНК для выявления гомологии к специфическим фрагментам в исследуемых пробах, привело к разработке методики анализа в формате т. н. дот-блота или слот-блота. С помощью несложных приспособлений на поверхность мембраны размером 70 × 128 мм может быть нанесено до 384 препаратов нуклеиновых кислот в виде отдельных пятен диаметром несколько миллиметров. Долгое время такой формат позволял проводить даже количественную оценку наличия в анализируемых препаратах интересующих исследователей ДНК маркеров.

### **Технология «биологические микрочипы»**

В середине 80-х возникла идея расшифровки (секвенирования) структуры полного генома человека. На тот момент скорость секвенирования даже с использованием автоматических секвенаторов была недостаточно высока для реализации такого проекта за короткий период времени. На фоне дискуссий, посвященных выработке стратегии высокопроизводи-

---

тельного анализа первичной структуры геномной ДНК, научная группа во главе с А.Д. Мирзабековым предложила технологию секвенирования с помощью гибридизации, при которой на подложке иммобилизуются короткие «секвенирующие олигонуклеотиды» известной структуры в виде индивидуальных пятен, а анализируемая проба ДНК (предварительно помеченная флуоресцирующим красителем) вносится в гибридизационный раствор, находящийся непосредственно на поверхности подложки [8, 9].

Слайды-подложки с закрепленными олигонуклеотидами получили название «биологические микрочипы» (биочипы, DNA microarray). В настоящее время биочип, как правило, представляет собой слайд-пластинку площадью несколько квадратных сантиметров (от 0,1 до 10 см<sup>2</sup>) с фиксированными на его поверхности в виде индивидуальных микрооточек (диаметр от 10 до 500 микрон) образцами биологически активных веществ. В качестве сорбента может быть использована особым образом активированная поверхность дна 96-луночных плашек, традиционно используемых для иммуноферментного анализа. Современные технологии микропечати позволяют наносить на биочип десятки тысяч индивидуальных образцов нуклеиновых кислот, белков, пептидов, полисахаридов, культур клеток, микроорганизмов и т. д. При этом необходимые количества индивидуальных препаратов могут составлять лишь триллионные и миллиардные доли грамма (пикограммы и нанogramмы). Практически любые субстанции (сыворотка, цельная кровь, фекалии, микробиологические препараты, суспензии органических веществ, продуктов питания, почвы и т. д.) после несложной предварительной обработки могут быть подвергнуты анализу с помощью биочипа. Для этого экстрагированные из препаратов и химически модифицированные нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) или белки переносятся на поверхность биочипа, и далее осуществляется регистрация процессов межмолекулярных взаимодействий на поверхности биочипа с помощью флуоресценции, хемилюминесценции или масс-спектрометрии.

### Основные подходы к изготовлению биочипов

В настоящее время существует несколько основных подходов к изготовлению биочипов. Первая технология производства ДНК-чипов заключается в синтезе олигонуклеотидов с помощью поэтапной достройки нуклеотидов непосредственно на поверхности чипа (on-chip). Данная технология получила название – синтез *in situ*. Вторая технология основана на размещении на чипах предварительно синтезированных олигонуклеотидов или полученных с помощью ПЦР одноцепочечных фрагментов ДНК – синтез *non in situ*.

Технология синтеза *in situ* предполагает возможность одновременного синтеза всех олигонуклеотидов, которые размещаются на чипе.

Существуют два подхода к такому синтезу биочипов: последовательный и параллельный. Последовательный подход заключается в использовании фосфорамидитного метода синтеза олигонуклеотидов, при котором защищенные с 5'-конца фосфорамидиты нуклеозидов наносятся на необходимые точки [13]. Преимуществом данного подхода является его простота, а также отсутствие необходимости в сложном оборудовании. Однако данный подход невозможно использовать для одновременного синтеза большого количества нуклеотидов. Более перспективны технологии, основанные на селективной активации растущих концов олигонуклеотидов. Такие технологии лежат в основе параллельного подхода. При использовании этого подхода каждый новый нуклеотид защищен по растущему концу. Таким образом, к нему не может быть присоединен последующий нуклеотид. На определенных участках биочипа олигонуклеотиды подвергаются активации путем удаления защитной группы, и они становятся способны присоединить нуклеотиды, находящиеся в растворе. Следовательно, при использовании данного подхода нет необходимости доставлять соответствующие мономеры к каждому участку чипа. Пространственная структура активных растущих концов создается в результате селективной активации соответствующих участков биочипа. При использовании такой технологии при синтезе ДНК-чипов все олигонуклеотиды биочипа в каждом цикле одновременно удлиняются на один нуклеотид. Это снимает все принципиальные ограничения по плотности синтеза, т. к. любое количество олигонуклеотидов может синтезироваться одновременно. На данный момент наиболее распространенным способом селективной активации олигонуклеотидов является использование литографических масок и ультрафиолетового излучения. Такие технологии позволяют наиболее полно использовать самое важное свойство ДНК-чиповой технологии – возможность одновременного анализа большого количества ДНК-проб. Размер ячейки биочипа при этом составляет всего лишь несколько микрометров. Недостатком этой технологии является необходимость использования литографических масок или сложных и дорогих рефлекторных устройств. Это привело к тому, что с 1994 г. фирма Affymetrix – единственный производитель чипов методом фотолитографии [6, 15].

Технология синтеза *non in situ* применяется для создания двух видов биочипов. Исторически первыми были разработаны биочипы с размещенными на них олигонуклеотидами. Несмотря на ряд недостатков (необходимость предварительного синтеза большого количества олигонуклеотидов, ограничение емкости чипа), такие биочипы могут применяться для детекции некоторых клинически значимых онкомаркеров, выявления некоторых наследственных заболеваний, онкозаболеваний, связанных с возникновением нуклеотидных замен в строго определен-

---

ных сайтах генов. Все эти области применения могут иметь серьезное клиническое значение.

Другим распространенным типом биочипов, произведенных с использованием технологии синтеза *non in situ*, являются «кДНК-чипы». На поверхность данных биочипов наносятся одноцепочечные молекулы ДНК. При разработке и использовании таких биочипов процессы амплификации и гибридизации ДНК могут осуществляться различными способами. В более традиционном подходе амплификация ДНК и гибридизация амплифицированной ДНК с биочипом проводятся в две отдельные стадии. Такие двухстадийные методы были разработаны, к примеру, для идентификации нуклеотидного полиморфизма в гене  $\mu$ -опиоидного рецептора [12], определения ряда бактериальных генов, ответственных за антибиотикорезистентность и синтез некоторых токсинов [18]. В других подходах гибридизацию на биочипе объединяют с амплификацией в одну стадию, что ускоряет и упрощает анализ. Размещение олигонуклеотидных зондов, фрагментов ДНК/РНК на поверхности биочипа осуществляется с помощью специальных роботов (принтеров, плоттеров). Принтеры различаются по способу переноса вещества на подложку-матрицу: одни используют контактную печать с помощью твердых головок, которые механически переносят субстрат на поверхность биочипа, другие же – бесконтактную печать с помощью пьезоэлектрических диспенсеров (Piezoelectric ink jet технология). Таким образом, данный метод создания ДНК-чипов позволяет наносить один и тот же олигонуклеотид на десятки биочипов одновременно [10].

### **Этапы проведения анализа с использованием ДНК-чипов**

Процедура проведения анализа с помощью ДНК-чипов включает несколько основных стадий:

- ~ выделение РНК/ДНК из биологического материала;
- ~ включение молекулярных меток в гибридизационную пробу (выделенную РНК/ДНК);
- ~ собственно гибридизация пробы на ДНК-чипе;
- ~ сканирование биочипа – получение цифрового образа ДНК-чипа;
- ~ математический анализ результатов гибридизации.

Процедура выделения РНК/ДНК зависит от природы биологического материала (плотные или жидкие ткани животных и растений, культуры клеток, поддерживаемых в условиях *in vitro* и т. д.). На сегодняшний день существует несколько фирм – производителей наборов реагентов, расходных материалов и даже роботизированных комплексов для выделения РНК/ДНК [19]. Соответствующие протоколы и методические указания предоставляются компаниями, специализирующимися на выпуске таких наборов. При необходимости возможно пригото-

ние в лабораторных условиях некоторых растворов, необходимых для выделения РНК при использовании доступных реактивов и ферментов. При соблюдении основных правил работы с РНК, направленных на исключение контаминации препаратов РНК-азами из окружающей среды, получение недеградированных, высокомолекулярных препаратов РНК становится простой и недорогой задачей. Следует отметить, что качество РНК является одним из критических факторов, определяющих эффективность проведения гибридизационного анализа, особенно когда речь идет о необходимости количественной оценки минорных видов РНК, т. е. РНК, представленных в препарате в низкой концентрации. Не лишней бывает и предварительная оценка качества РНК с помощью электрофореза в денатурирующих условиях или прибора Agilent Bioanalyser 2100 .

Несколько проще обстоит дело при подготовке ДНК для анализа, поскольку ДНК значительно более стабильна по отношению к воздействию факторов окружающей среды, однако следует учитывать некоторые физико-химические свойства ДНК во избежание ее деградации. В частности, не следует подвергать ДНК воздействию растворов с низкими значениями рН или длительному воздействию ультрафиолетового излучения, приводящего к ее деградации.

Молекулярные метки, которые можно включить в состав гибридизационной пробы, не должны препятствовать образованию двухцепочечных комплексов ДНК-ДНК или ДНК-РНК на поверхности микрочипа. Термодинамические свойства таких комплексов не должны существенно отличаться от немодифицированных аналогов. Кроме того, молекулярные метки должны обеспечивать возможность инструментальной оценки относительного количества гибридизационной пробы, образующей двухцепочечный комплекс с ДНК-зондами на поверхности микрочипа.

В настоящее время наибольшее распространение приобрели молекулярные метки на основе низкомолекулярных флуорофоров (флуоресцеины, цианины, родамины и т. д.). При этом для детекции образующегося комплекса используют флуоресцентные сканеры или имиджеры.

Наиболее часто для введения метки в гибридизационную пробу используют методы на основе ферментативного включения модифицированных нуклеотидов в состав нуклеиновых кислот (с использованием ДНК и РНК полимераз). Например, в случае использования ферментативного способа мечения РНК из биологического материала подвергают процедуре обратной транскрипции в присутствии дезоксинуклеозид трифосфатов, меченых флуорофорами или биотином. При этом меченые нуклеотиды включаются в состав вновь синтезируемой кДНК.

В случае если анализу с помощью биочипов необходимо подвергнуть полученные в результате ПЦР фрагменты нуклеиновых кислот, удобно

---

флуоресцентную метку включать непосредственно в структуру одного из олигонуклеотидных праймеров, а собственно амплификацию проводить в формате асимметричного ПЦР, т. е. с накоплением в ходе реакции одноцепочечной формы ДНК. Существует большое количество вариантов приготовления гибридационной пробы. В конечном счете все определяется количеством анализируемых параметров, чувствительностью сканера/ридера, необходимой производительностью и скоростью анализа, допустимой себестоимостью анализа и т. д.

Как правило, компании, производящие наборы для анализа ДНК/РНК с помощью биочипов, предоставляют все необходимые компоненты, начиная с подготовки пробы (включения метки в структуру нуклеиновых кислот), собственно биочипа с иммобилизованными на его поверхности олигонуклеотидами, растворами и приспособлениями для гибридизации, сканирования и заканчивая программным обеспечением для анализа результатов.

Гибридизация представляет собой процесс инкубации пробы в солевом растворе с реактивами, препятствующими неспецифическому взаимодействию пробы с поверхностью биочипа и иммобилизованными на нем олигонуклеотидными зондами. Температура гибридизации определяется структурой олигонуклеотидов и составом буфера и может варьировать в пределах от 37–65 °С. Время гибридизации зависит от концентрации пробы, количества вариантов зондов и может достигать 48 часов. После гибридизации поверхность биочипа отмывают от непрореагировавшей с олигонуклеотидами пробой и просматривают поверхность биочипа с помощью флуоресцентного сканера или имиджера. Данная процедура сходна с визуализацией микроскопических флуоресцирующих объектов с помощью флуоресцентного микроскопа. При использовании сканеров за счет применения лазерных технологий удается достичь чувствительности визуализации до единичных молекул флуорофора на квадратный микрон поверхности биочипа. По существу, сканеры для биочипов представляют собой узкоспециализированные устройства, в конструкции которых реализованы принципы сканирующих лазерных микроскопов.

Оптические схемы имиджеров подобны оптическим флуоресцентным микроскопам, но ряд производителей дополняет конструкцию роботизированными приспособлениями для анализа в автоматизированном режиме нескольких биочипов-слайдов, 96-луночных плашек (дно каждой ячейки которых является отдельным биочипом) или собранных в виде единых пластин 96/384 биочипов-эреев [23].

Получаемый образ биочипа подвергается анализу с помощью специализированного программного обеспечения таким образом, что для каждого пятна на поверхности биочипа (в месте локализации индивидуальных

олигонуклеотидов) определяется интенсивность флуоресценции. Исходя из полученных значений флуоресценции, оценивается эффективность гибридизации с соответствующими олигонуклеотидами, и с помощью программно заданных критериев определяется степень гомологии каждого олигонуклеотида соответствующему участку геномной ДНК. В конечном итоге может быть определено наличие точечных мутаций, делеций, инсерций одновременно в большом количестве участков геномной ДНК.

В том случае, если анализу подвергается суммарная кодирующая РНК из различных тканей, можно определить профиль экспрессии генов, т. е. относительное количество специфических молекул РНК гомологичных олигонуклеотидным зондам на поверхности биочипа. Например, на основе сравнения профилей экспрессии РНК в нормальных тканях и соответствующих им опухолях можно выявить гены, которые вовлечены в процесс злокачественной трансформации конкретной ткани [7, 11, 22].

Как известно, одним из основных элементов, определяющих в норме индивидуальные особенности отдельных организмов одного вида, является набор т. н. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). В среднем в геноме человека однонуклеотидные полиморфизмы встречаются 1 раз на 300 нуклеотидов, т. е. всего может насчитываться до 10 млн полиморфизмов. Многие из них могут служить генетическими маркерами повышенного риска развития различных заболеваний, восприимчивости к факторам окружающей среды и лекарственным препаратам, особенностей физиологического потенциала и т. д. Поиск ассоциаций полиморфизмов с теми или иными признаками на основе анализа большой совокупности полиморфизмов называется «полногеномный поиск ассоциаций» (GWAS – Genome-Wide Association Studies).

Очевидно, что анализ индивидуальных образцов геномной ДНК, направленный на выявление одновременно сотен тысяч SNP, требует специальных подходов. Основными инструментами для проведения таких исследований являются гибридизационный анализ с помощью ДНК-биочипов высокой плотности и массовое параллельное секвенирование. Следует отметить, что с 2005 г. количество публикаций, посвященных данному направлению, превысило 2000 [21].

### **Производители ДНК-чипов**

Компании Affymetrix, Illumina, Beckman Coulter, Eppendorf Biochip Systems, General Electric Healthcare, Applied Biosystems и Agilent являются ведущими поставщиками ДНК-биочипов, а также реактивов и оборудования для работы с ними.

При производстве ДНК-биочипов компания Affymetrix [24] использует фотолитографический способ синтеза олигонуклеотидных ДНК

зондов на кварцевой подложке. Количество вариантов индивидуальных структур олигонуклеотидов в пределах одного чипа может достигать сотен тысяч, причем локализация (координаты) зон-пятен, соответствующих каждому варианту, четко определяется по маркерным последовательностям в пределах чипа (табл. 1). Несложно оценить, что площадь индивидуальных пятен не превышает нескольких квадратных микрон. Для визуализации результатов гибридизации компания предлагает специализированные лазерные сканеры с соответствующей чувствительностью, разрешающей способностью и производительностью [14]. Кроме того, предлагаются роботизированные комплексы для автоматического высокопроизводительного анализа ДНК/РНК на чипах.

*Таблица 1*

**Биочипы в формате слайда, доступные для полногеномного анализа ДНК человека (компании Affymetrix)**

| Биочипы                                | Количество эрреев | Количество детектируемых SNP |
|--|-------------------|------------------------------|
| GeneChip Human Mapping 10 K 2.0 Array  | 1                 | 10 204                       |
| GeneChip Human Mapping 100 K Set       | 2                 | 116 204                      |
| GeneChip Human Mapping 500 K Array Set | 2                 | 500 568                      |
| Genome-Wide Human SNP Array 5.0        | 1                 | 500 568                      |
| Genome-Wide Human SNP Array 6.0        | 1                 | 906 600                      |

Биочип Genome-Wide Human SNP Array 6.0 фирмы Affymetrix предназначен для полногеномного генотипирования человека и изучения особенностей генома, ассоциированных с соматическими и онкологическими заболеваниями человека. При этом биочип является лишь одним из компонентов для проведения анализа. Кроме самого биочипа, необходимы микрофлюидная станция GeneChip® Fluidics Station 450, специальный термостат GeneChip® Hybridization Oven 645 (для проведения гибридизации); а также сканер GeneChip® Scanner 3000 7G (рисунок).

Собственно на биочипе Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (в последней версии середины 2015 г.) локализованы олигонуклеотиды к 906,600 хромосомным однонуклеотидным полиморфизмам, к 465 митохондриальным однонуклеотидным полиморфизмам, а также олигонуклеотиды для выявления вариаций количества копий 8583 участков Y-хромосомы. Анализируемый материал предварительно гидролизуеться с помощью эндонуклеаз NspI и StyI на фрагменты размеров 200–1100 пар нуклеотидов. К фрагментам лигируются олигонуклеотидные адапторы, которые служат в качестве участков «отжига» олигонуклеотидных праймеров для дальнейшей амплификации и включения молекулярных меток в струк-

туру вновь синтезированной ДНК – гибридизационной пробы. Качество получаемых «библиотек» гарантируется поставляемыми компанией наборами реагентов. Упрощение и стандартизация процедуры пробоподготовки и гибридизации обеспечивается за счет использования перечисленного выше оборудования, а также роботизированного комплекса NIMBUS Target Preparation Instrument (совместная разработка Affymetrix и Hamilton Robotics) [26].

Для высокопроизводительного анализа одновременно большого количества образцов геномной ДНК человека компания Affymetrix выпускает биочипы, организованные в виде блоков по 96 или 384 индивидуальных элементов по аналогии и в соответствии со стандартами размеров 96- и 384-луночных плашек для иммунохимических анализов.

Например, продукт, называемый Axiom Genome-Wide ASI 1 Array Plate, состоит из 96 микроэрреев, каждый из которых содержит олиго-



*Affymetrix Genechip® System [25]*

нуклеотиды для выявления более 600 тыс. SNP и 2834 инсерций/делеций. Аналогичные по структуре Axiom Genome-Wide CEU Array Plate и Axiom® Genome-Wide CHB 1 & CHB 2 Array Plate Set предназначены специально для генотипирования европейских популяций и китайской популяций хань (Han

Chinese) соответственно. Микроэрреи данных наборов включают дополнительные олигонуклеотиды для выявления редких «европейских» или «китайских» вариантов SNP. Кроме того, компания предоставляет возможность заказа и производства микроэрреев, собранных в блоки по 384 элемента, для высокопроизводительного скрининга геномной ДНК человека на 1500–51 000 SNP по выбору покупателя.

Кроме компании Affymetrix микроэррейные платформы представляет компания Illumina [27]. Для изготовления чипов специалисты компании реализовали оригинальную технологию, названную BeadArray (табл. 2). Олигонуклеотидные зонды при данной технологии связаны с шариками диаметром 3 микрона, которые случайным образом распределяются по микрочайкам на поверхности слайда. Микрочайки равномерно распределены на поверхности слайда и получают путем «химического травления». Шарик удерживается в ячейках слайда за счет сил Ван-дер-Ваальса и электростатического взаимодействия поверхностей. При этом расстояние между соседними шариками составляет около 5,7 микрона. Каждому слайду прилагается специальный файл-паспорт, содержащий информацию о координатах индивидуальных шариков на поверхности микроэррея и соответствующих ему структурах иммобилизованных оли-

---

гонуклеотидов. Координаты каждого шарика определяются в процессе изготовления микроэреев с помощью нескольких последовательных раундов гибридизации – отмытки с пулами меченных флуорофорами элементарных олигонуклеотидов [4].

**Таблица 2**

**Биочипы в формате BeadChip, доступные для полногеномного анализа ДНК человека (компания Illumina)**

| Биочипы                                 | Количество эреев | Количество детектируемых SNP |
|---|------------------|------------------------------|
| HumanCytoSNP-12 DNA Analysis BeadChip   | 12               | 29 914                       |
| Human660W-Quad v1 DNA Analysis BeadChip | 4                | 657 366                      |
| HumanOmniExpress BeadChip               | 12               | 731 442                      |
| Human1M-Duo DNA Analysis BeadChip       | 2                | 1 199 187                    |
| HumanOmni1-Quad BeadChip                | 4                | 1 140 419                    |
| HumanOmni1S-8 BeadChip                  | 8                | 1 200 000                    |
| HumanOmni2.5-Quad BeadChip              | 4                | 2 450 000                    |

Для полногеномного анализа ДНК человека Illumina предлагает использовать слайд Infinium HumanOmni5-4 v1.1 BeadChips, который позволяет одновременно анализировать более 4 200 000 маркеров в 4 различных образцах ДНК. При этом для анализа требуется всего 0,4 микрограмма геномной ДНК. Более того, при необходимости в структуру чипа можно ввести до 500 000 маркеров по выбору исследователя. Согласно оценкам специалистов компании, высокопроизводительная сканирующая система HiScan, сопряженная с роботизированным комплексом компании Tecan, позволяет проводить полногеномный анализ на данном типе чипа более 460 образцов в неделю (5 дней).

Кроме данного шедевра в области биочиповой технологии, Illumina предлагает еще несколько вариантов чипов для анализа меньшего количества маркеров, но большего количества одновременно анализируемых образцов с акцентом на этнические особенности распределения SNP, CNV (copy number variation) и генетически обусловленные заболевания человека. Стоит упомянуть чип на 12 образцов для анализа профилей экспрессии генов человека. В пределах каждого микроэрея данного чипа в среднем находится по 30 микрочастиц с иммобилизованными олигонуклеотидами уникальной структуры (длиной 50 нуклеотидов). Наличие большого количества повторов гарантирует хорошую точность и воспроизводимость получаемых количественных оценок уровня экспрессии генов. Всего количество вариантов проб в пределах одного микроэрея

составляет 47 321, из них 28 688 олигонуклеотидов гомологичны кодирующим последовательностям, наличие которых подтверждено альтернативными молекулярно-биологическими методами. Согласно литературным данным использование данного чипа позволяет воспроизводимо оценивать профили экспрессии РНК, выделенной даже из материала, фиксированного в парафиновых блоках [5].

Микроэрреи несколько меньшей плотности предлагает компания Agilent [28]. Для их производства компания разработала технологию SurePrint, в основе которой лежит фосфорамидитный синтез шестидесятизвенных олигонуклеотидов непосредственно на двумерном носителе с доставкой реагентов в область синтеза с помощью технологии струйной печати. Так же как и упомянутые выше компании Agilent предлагает микроэрреи как для анализа SNP, так и для полногеномного сравнительного гибридизационного (Comparative Genomic Hybridization) анализа для выявления разного рода aberrаций (нарушений) структуры генома человека, включая CNV и потерю гетерозиготности.

Примечательно, что для молекулярно-биологических исследований компания предлагает микроэрреи для оценки профилей экспрессии генов целого спектра позвоночных, насекомых, растений и микроорганизмов. Для удобства пользователей предлагаются чипы стандартного размера 25 × 75 мм, включающие 4–8 одинаковых эрреев. Это позволяет использовать для визуализации гибридизационного анализа сканеры многих производителей, удовлетворяющие рекомендуемым требованиям чувствительности и разрешающей способности. Соответственно и компания Agilent предлагает свои сканеры и другое оборудование для удобства проведения анализа.

Для генетических исследований ДНК человека можно выделить набор реагентов, предназначенный для определения фармакогенетического статуса человека и выявления генетической предрасположенности к ряду онкологических заболеваний, а также набор реагентов «ЛК-Биочип» производства ООО «Биочип-ИМБ», предназначенный для выявления и идентификации основных хромосомных транслокаций при острых и хронических лейкозах в образцах костного мозга или периферической крови человека.

На базе ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора совместно с ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» был разработан диагностический набор, включающий ДНК-чип, для одновременного и дифференциального выявления возбудителей особо опасных инфекций, а именно холерного вибриона, туляремии, бруцеллеза, чумы и сибирской язвы. Отличительной особенностью данного набора является введение дополнительной стадии транскрипции ДНК с целью уменьшения времени проведения гибридизации, что позволяет сократить общее время проведения анализа [1].

---

В контексте разговора о микроэррейных технологиях в качестве инструмента детекции и анализа ДНК стоит упомянуть «жидкие чипы». Данная технология была предложена компанией Luminex и зарегистрирована под названием xMAP® Technology [29]. Отличительной особенностью данной технологии является то, что олигонуклеотидные пробы синтезированы с C-12 модификациями на 5'-конце и ковалентно иммобилизованы на полистириновых микросферах (микрочастицы несколько микрон в диаметре) с помощью карбодиимидного метода [2]. Данные микрогранулы маркированы с помощью комбинации двух флуоресцентных красителей, так что становится возможным в одной гибридационной смеси анализировать до 500 вариантов микрогранул. При этом к каждому «индексированному» флуорофорам варианту гранул могут быть ковалентно пришиты олигонуклеотиды индивидуальной структуры. При использовании микрогранул, взвешенных в растворе, гибридизация иммобилизованных на поверхности гранул зондов и анализируемой ДНК происходит существенно быстрее, чем при гибридизации на поверхности двумерного слайда – микроэррея. После гибридизации гранулы фракционируются по соотношению интенсивностей двух флуорофоров с помощью специального прибора с использованием микрофлюидных технологий, по аналогии с тем, как это делается при проточной цитометрии. Одновременно оценивается интенсивность флуоресценции каждого типа гранул по дополнительному каналу флуоресценции, которому соответствует молекулярная метка анализируемой ДНК [3].

Компании, имеющие лицензию на использование данной технологии, предлагают как готовые решения в виде диагностических наборов, так и отдельные компоненты для разработчиков тест-систем и исследований в области биохимии и молекулярной биологии.

Все перечисленные варианты чипов используются исключительно для исследовательских целей и не сертифицированы для использования в качестве диагностических инструментов в клинической практике. Основным препятствием внедрению описанных вариантов чипов в лабораторную диагностику являются очень высокие цены как на чипы, так и на оборудование для работы с ними. Кроме того, к настоящему времени накоплено еще недостаточно информации о соответствии структурных особенностей генома человека и индивидуальных фенотипических признаков, предрасположенности к заболеваниям или степени риска развития тех или иных заболеваний. Однако с накоплением знаний о соответствии структуры индивидуального генома и признаков широкое применение микроэрреев высокой плотности для развития персонализированной медицины будущего является лишь вопросом времени [20].

### Список использованной литературы

1. Пудова Е.А., Чеканова Т.А., Маркелов М.А., Дедков В.Г. и др. Разработка и апробация ДНК-чипа для индикации возбудителей особо опасных инфекций // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. № 3. С. 13–19.
2. Colinas R.J., Bellisario R., Pass K.A. Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres // Clin. Chem. Vol. 46. P. 996–998.
3. Drago F., Karpasitou K., Poli F. Microarray beads for identifying blood group a single nucleotide polymorphisms // Transfus. Med. Hemother. Vol. 36. P. 157–160.
4. Fan J.B., Hu S.X., Craumer W.C., Barker D.L. BeadArray™-based solutions for enabling the promise of pharmacogenomics. // BioTechniques. Vol. 39. P. 583–588.
5. Faruki H., Mayhew G.M., Fan C., Wilkerson M.D. et al. Validation of the lung subtyping panel in multiple fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded lung tumor gene expression data sets // Arch Pathol Lab Med. 2015 Oct 2.
6. Gibson G. Microarrays in ecology and evolution: A preview. // Mol Ecol. 2002. Vol. 11(1). P. 17–24.
7. Karbiener M., Scheideler M. Microarray analysis of small non-coding RNAs // Methods Mol Biol. 2015. Vol. 1296. P. 161–171.
8. Khrapko K.R., Khorlyn A.A., Shick V.V., Florentiev V.L. et al. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. // FEBS Lett. 1989. Vol. 256. P. 118–122.
9. Khrapko K.R., Khorlyn A.A., Shick V.V., Florentiev V.L. et al. Determination of the nucleotide sequence of DNA using hybridization with oligonucleotides. A new method. // Dokl Akad Nauk SSSR. 1988. Vol. 303(6). P. 1508–1511.
10. Kitayeva N.V., Frigo N.V., Volkova I.A., Likhareva V.V. Biomicrochips and aspects of their application in dermatovenerology. // Vestn Dermatol Venerol. 2009. Vol. 6. P. 33–45.
11. Li M., Qiu M., Xu Y., Mao Q. et al. Differentially expressed protein-coding genes and long noncoding RNA in early-stage lung cancer. // Tumour Biol. 2015. Vol. 36 (12). P. 9969–9978.
12. LaForge K.S., Shick V.V., Spangler R., Proudnikov D. et al. Detection of single nucleotide polymorphisms of the human mu opioid receptor gene by hybridization or single nucleotide extension. // Am. J. Med. Genet. 2000. Vol. 96 (5). P. 604–615.
13. McBride L.J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. // Tetrahedron Lett. 1983. Vol. 24. P. 245–248.

- 
14. McCall M.N., Almudevar A. Affymetrix GeneChip microarray preprocessing for multivariate analyses. // *Brief Bioinform.* 2012. Vol. 13 (5). P. 536–546.
  15. Pease A.C., Solas D., Sullivan E.J., Cronin M.T. et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 5022–5026.
  16. Southern E.M., Mitchell A.R. Chromatography of nucleic acid digests on thin layers of cellulose impregnated with polyethyleneamine. // *Biochemical Journal.* 1971. Vol. 123. P. 613–617.
  17. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. // *Journal of Molecular Biology.* 1975. Vol. 98. P. 503–517.
  18. Strizhkov B.N., Drobyshch A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligo-nucleotides: Detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations. // *BioTechniques.* 2000. Vol. 29. P. 844–857.
  19. Thatcher S.A. DNA/RNA preparation for molecular detection. // *Clin Chem.* 2015. Vol. 61 (1). P. 89–99.
  20. Veldhuisen B., van der Schoot C.E., de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening // *Vox Sang.* 2009. Vol. 97 (3). P. 198–206.
  21. Welter D., MacArthur J., Morales J., Burdett T. et al. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. // *Nucleic Acids Research.* 2014. Vol. 42. P. D1001–1006.
  22. Zhang X., Lopez-Berestein G., Sood A.K., Calin G.A. Profiling long noncoding RNA expression using custom-designed microarray // *Methods Mol Biol.* 2016. Vol. 1402. P. 33–41.
  23. <http://www.axoscience.com/technology/hifi-technology/> (дата обращения 14.01.2016)
  24. <http://www.affymetrix.com> (дата обращения 14.01.2016)
  25. <http://www.med.nus.edu.sg/gsl/Affymetrix.html> (дата обращения 14.01.2016)
  26. [http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod860001/AFFY/Axiom%26%23174%3B+Automated+Target+Preparation+on+Affymetrix%26%23174%3B+NIMBUS%26%23174%3B+Target+Preparation+Instrument#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod860001/AFFY/Axiom%26%23174%3B+Automated+Target+Preparation+on+Affymetrix%26%23174%3B+NIMBUS%26%23174%3B+Target+Preparation+Instrument#1_1) (дата обращения 14.01.2016)
  27. <http://www.illumina.com> (дата обращения 14.01.2016)
  28. <http://www.agilent.com> (дата обращения 14.01.2016)
  29. <http://www.luminexcorp.com> (дата обращения 14.01.2016)
-



---

## **Диагностические возможности метода ПЦР в режиме реального времени для оценки биоты и локального воспаления в тканях урогенитального тракта**

**М.Н. Болдырева**

*д-р мед. наук, ведущ. науч. сотр.,  
ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России,  
научный консультант ЗАО «ДНК-Технология,*

**Г.Р. Байрамова**

*д-р мед. наук, зав. научно-поликлиническим отделом,*

**О.В. Бурменская**

*канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,*

*ФГБУ «Научный центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России*

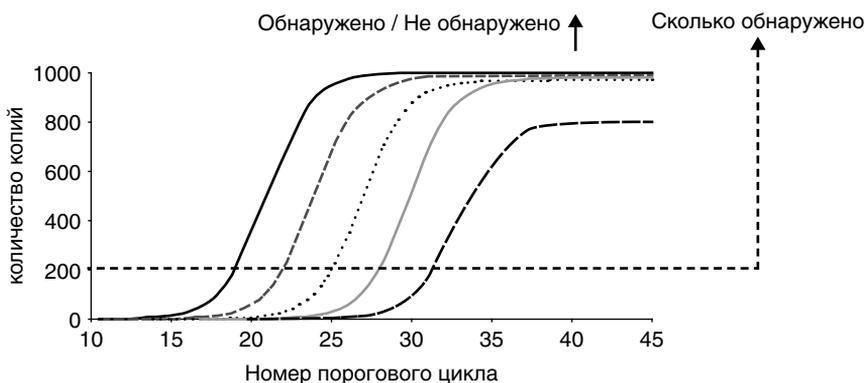
*Статья посвящена описанию современного молекулярно-биологического метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и его диагностическим возможностям. В качестве примера приводятся данные о составе микробиоты в сочетании с профилем экспрессии генов, молекулярных маркеров активации иммунной системы у женщин, страдающих бактериальным вагинозом и вагинитом. Представленные результаты свидетельствуют о том, что экспрессионный профиль молекулярных маркеров активации иммунной системы, соответствующий местному воспалению, аналогичный вагиниту, выявляется почти у 50% женщин с диагнозом бактериальный вагиноз и у 40% женщин, не имеющих клинических симптомов заболевания, но у которых обнаружены ДНК *Ureplasma* в количестве более  $10^4$  ГЭ/мл. Экономически доступные комплексные лабораторные тесты с использованием ПЦР-РВ: количе-*

*ственный анализ биоты урогенитального тракта, объективная количественная оценка воспаления – в конечном итоге обеспечат переход к персонализированному лечению заболеваний УГТ у женщин.*

Открытие в конце 1980-х гг. и внедрение в практику научных исследований метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) открыло новые пути для развития современной биологии и медицины. Несколькоими годами позже была предложена модификация этого метода, получившая название «ПЦР в режиме реального времени» (ПЦР-РВ). Основное отличие ПЦР-РВ от «классической» ПЦР заключается в том, что регистрация количества ДНК происходит в ходе реакции, а положительный результат определяется по увеличению флуоресцентного сигнала, который регистрируется прибором. В «классической» ПЦР результат оценивают по окончании реакции (рис. 1).

Автоматическое измерение увеличения флуоресценции, пропорциональное увеличению количества амплифицированной ДНК в ходе реакции ПЦР-РВ, позволяет проводить количественную оценку ДНК (например, микроорганизма), исходно содержащейся в биологическом образце, в то время как «классическая» ПЦР – это качественная реакция.

В настоящее время метод ПЦР-РВ широко используется для решения целого ряда как фундаментальных научных проблем, так и прикладных диагностических задач, включая количественную диагностику ДНК/РНК микроорганизмов (вирусы гепатитов, ВИЧ), нормо- и условно-патогенной биоты урогенитального тракта у женщин, полиморфных вариантов различных генов (SNP-однонуклеотидные полиморфизмы, HLA-гены главного комплекса тканевой совместимости человека), функциональной активности генов (определение мРНК) и т. д. С помощью метода ПЦР можно из одного образца биоматериала выполнить комплексное исследование ряда параметров, включая количественную оценку микроорганизмов.



**Рис. 1.** Кривые накопления продуктов амплификации при полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

---

Аномальные влагалищные выделения и вульвовагинальный дискомфорт – частые мотивы обращения женщин за врачебной помощью [1, 2]. Причины, которые могут вызывать указанные симптомы, бывают разными [5, 7], в т. ч. могут иметь место инфекционные заболевания. Часть из них связана с ИППП (трихомониаз, хламидиоз, гонорея, микоплазмоз). В других случаях причиной инфекционного процесса могут быть условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), причем в последние годы наблюдается увеличение этиологической роли УПМ по сравнению с ИППП.

Клинически инфекционный процесс, вызванный УПМ, может протекать в виде вагинита или вагиноза. Считается, что наиболее часто причиной вагинита, вызванного УПМ, являются аэробные бактерии – кишечная палочка, стрептококки, стафилококки и др. Диагноз вагинита может быть поставлен на основании осмотра в зеркалах и микроскопии окрашенного мазка: при наличии более 10 лейкоцитов в поле зрения, большого количества клеток слущенного эпителия влагалища и отсутствии «ключевых» клеток. В целом наблюдается микроскопическая картина, характерная для воспалительного экссудата.

Диагноз бактериального вагиноза (БВ) выставляется после исключения диагноза бактериального вагинита, на основании критериев, предложенных Amsel R. и соавт [6]:

- ~ наличие патологических выделений из половых путей;
- ~ pH > 4,5;
- ~ положительный аминный тест с КОН (появление специфического «рыбного» запаха при добавлении к вагинальному секрету 10% раствора КОН);
- ~ выявление более 20% «ключевых» клеток (клетки плоского эпителия, покрытые коккобактериями) при микроскопии влажных неокрашенных препаратов вагинального отделяемого и мазков, окрашенных по Граму.

Наличие трех признаков из четырех позволяет поставить диагноз БВ. Таким образом, в настоящее время БВ рассматривается как инфекционный невоспалительный синдром полимикробной этиологии, обусловленный дисбиозом вагинального биотопа, который характеризуется уменьшением количества или полным исчезновением лактобактерий и увеличением облигатно-анаэробных УПМ (шифр по МКБ-10 N89.9 – Невоспалительная болезнь влагалища неуточненная) [4].

Объективным симптомом воспаления в случае урогенитальных инфекций является лейкоцитарная реакция. Поскольку БВ считается невоспалительным синдромом, количество лейкоцитов в мазке при БВ должно быть менее 10 в поле зрения [3], хотя этот показатель и не входит в число критериев Амсела.

Развитие инфекционного заболевания, вызванного воздействием патогенных микроорганизмов, а также его исход в равной мере зависят как

от патогенного потенциала микроорганизма, так и от защитного потенциала организма «хозяина». В случае УПМ развитие инфекционного процесса в большей мере зависит от организма «хозяина», в т. ч. и от индивидуальных особенностей его иммунной системы.

Не нужно забывать, что воспаление, если оно адекватно действующему на организм стимулу, – это защитная реакция (местная и общая), возникающая в ответ на повреждение клеточных структур организма инфекционным агентом и проявляющаяся в реакциях, направленных на ликвидацию возбудителя инфекции, устранение продуктов повреждения тканей и обеспечивающих восстановление в зоне повреждения.

Первую линию защиты от инфекции обеспечивают различные факторы, прежде всего присутствующие в тканях, контактирующих с внешней средой, – анатомические барьеры, рН, нормальная микрофлора, обеспечивающая колонизационную резистентность, активные формы кислорода, слушивание и регенерация эпителия, антиадгезивные факторы (муцин), секреторный IgA.

Вторая линия защиты – местное, локальное воспаление, которое возникает в случаях, когда факторы врожденной, естественной защиты не справляются с функцией сохранения микробного баланса на поверхности тканей, контактирующих с внешней средой. В результате активируются системы иммунной защиты – система комплемента, рецепторы к различным структурам бактерий и вирусов (toll-like receptor, TLR) на поверхности клеток, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, тучные клетки, которые вырабатывают различные хемокины и цитокины, обеспечивающие привлечение клеток иммунной системы в очаг воспаления, активацию местного иммунитета и развитие адаптивного иммунного ответа.

И наконец, третья линия защиты – общее, системное воспаление, которое развивается в ответ на проникновение микроорганизмов во внутреннюю среду организма, адаптивный иммунитет.

Можно полагать, что местное воспаление и местная иммунная реакция – это наиболее вероятная реакция организма в ответ на размножение УПМ в урогенитальном тракте у женщин.

Для одновременного исследования биоты урогенитального тракта и экспрессии ряда генов иммунной системы были обследованы женщины репродуктивного возраста (от 18 до 45 лет).

По результатам обследования были выделены следующие группы:

- ~ I. Условно-здоровые (n = 141): отсутствие жалоб и признаков воспаления, количество лейкоцитов в мазке менее 10 в поле зрения;
- ~ IA. Контрольная группа (n = 95) – преобладание *Lactobacillus* spp (80–100% от общей бактериальной массы по результатам ПЦР-РВ);
- ~ IB. Наличие ДНК *Ureaplasma* spp  $>10^4$  ГЭ/мл (n = 19);
- ~ IC. Наличие ДНК *Candida* spp  $> 10^3$  ГЭ/мл (n = 27);

- ~ II. Вагинит (n = 215): жалобы, воспаленная слизистая, количество лейкоцитов в мазке более 10 в поле зрения;
- ~ III. Бактериальный вагиноз (n = 55): жалобы, наличие критериев Амсела, отсутствие воспаления, количество лейкоцитов в мазке менее 10 в поле зрения.

Обследование включало анализ жалоб, анамнеза, определение гинекологического статуса, осмотр вульвы, слизистых влагалища и шейки матки в зеркалах, бимануальное гинекологическое исследование, микроскопия влагалищных мазков, окрашенных по Граму.

Количественная оценка ДНК микроорганизмов проводилась методом ПЦР-РВ с использованием наборов реагентов «Фемофлор-16» (ЗАО «ДНК-Технология»).

Для оценки уровня экспрессии генов, активирующихся при воспалении, определяли транскрипционный профиль генов иммунной системы: цитокины (*IL1 $\beta$* , *IL8*, *IL10*, *IL12 $\alpha$* , *IL18*, *IL23*, *TNF $\alpha$* , *TGF $\beta$ 1*), транскрипционные факторы (*GATA3*, *RORC*), толл-подобные рецепторы (*TLR2*, *TLR4*) и поверхностные маркеры клеток иммунной системы (*CD45*, *CD68*, *CD69*) – с использованием наборов реагентов производства ЗАО «ДНК-Технология».

Нормировка результатов ПЦР-РВ мРНК генов иммунной системы осуществлялась методом сравнения пороговых циклов (метод  $\Delta\Delta Cq$ ) этих генов по четырем референтным генам (*B2M*, *GUSB*, *TBP* и *HPRT1*), которые имеют относительно стабильный уровень экспрессии, и значению медианы уровня экспрессии в контрольной группе, которая принималась равной единице.

Результаты исследования количественного состава биоты в обследованных группах женщин представлены в таблице.

### Состав биоты во влагалище в обследованных группах женщин

| Условно-патогенные микроорганизмы   | Условно здоровые    |            |            | Вагинит<br>N=215 | Бактериальный вагинит<br>N=55 |
|---|---------------------|------------|------------|------------------|-------------------------------|
|   | 1А контроль<br>N=95 | 1В<br>n=19 | 1с<br>N=27 |                  |                               |
| 1   | 2                   | 3          | 4          | 5                | 6                             |
| <b>Факультативно-анаэробные микроорганизмы</b>  |                     |            |            |                  |                               |
| <i>Enterobacterium spp</i>  | 1,1                 | 5,3        | 0          | 14,9*            | 3,6                           |
| <i>Streptococcus spp</i>  | 5,3                 | 10,5       | 7,4        | 20,5*            | 12,7                          |
| <i>Staphylococcus spp</i>   | 0                   | 0          | 3,7        | 3,7              | 3,6                           |
| <b>Облигатно-анаэробные микроорганизмы</b>  |                     |            |            |                  |                               |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> /<br><i>Prevotella spp</i> /<br><i>Porphyromonas spp</i> | 3,2                 | 15,8*      | 11,1       | 37,7*            | 87,3*                         |

## Обмен опытом

| 1   | 2   | 3    | 4     | 5     | 6     |
|---|-----|------|-------|-------|-------|
| Eubacterium spp                                   | 8,4 | 15,8 | 39,6* | 43,7* | 85,5* |
| Sneathia spp/ Leptotrichia spp/ Fusobacterium spp | 0   | 0    | 3,7   | 6,5*  | 29,1* |
| Megasphaera spp/ Veilonella spp/ Dialister spp    | 0   | 0    | 3,7   | 22,8* | 41,8* |
| Lachnobacterium spp/ Clostridium spp              | 2,1 | 0    | 7,4   | 9,3*  | 27,3* |
| Mobiluncus spp/ Corynebacterium spp               | 0   | 0    | 3,7   | 9,3*  | 12,7* |
| Peptostreptococcus spp                            | 0   | 0    | 0     | 14,9* | 30,9* |
| Atopobium vaginae                                 | 2,1 | 0    | 3,7   | 14,4* | 49,1* |
| Молликуты   |     |      |       |       |       |
| Mycoplasma spp                                    | 0   | 0    | 3,7   | 1,9   | 9,1*  |
| Ureaplasma spp                                    | 0   | 100* | 29,6* | 27,9* | 34,5* |
| Грибы   |     |      |       |       |       |
| Candida spp                                       | 0   | 0    | 100*  | 43,3* | 0     |
| Сочетанные формы                                  | 2,1 | 10,5 | 55,6* | 61,9* | 94,5* |

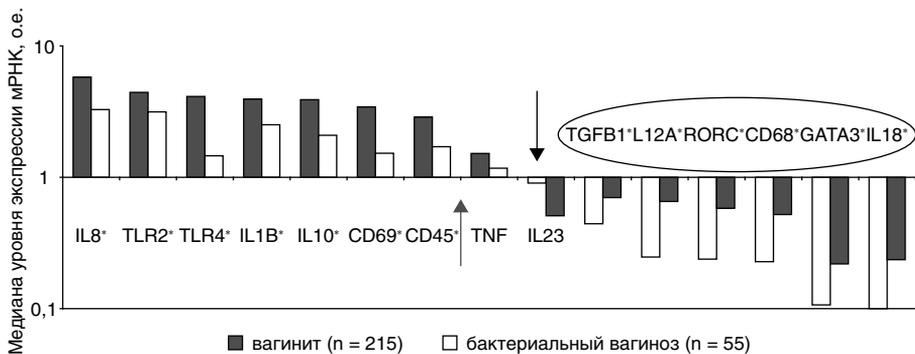
\*  $p < 0,05$ .

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что у женщин с диагнозом вагинита, по сравнению с контрольной группой, увеличена доля энтеробактерий и стрептококков. Доля анаэробных УПМ увеличена как в группе пациенток с вагинитом, так и в группе пациенток с БВ. В то же время у пациенток при концентрации *Ureaplasma spp*  $> 10^4$  ГЭ/мл достоверно увеличено отношение *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella spp* / *Porphyromonas spp* по сравнению с контрольной группой и при этом отсутствуют клинические симптомы воспаления.

Для оценки воспалительной реакции в тканях урогенитального тракта у женщин с клиническим диагнозом вагинит или БВ было проведено исследование транскрипционного профиля ряда генов иммунной системы. Результаты представлены на рис. 2.

В целом результаты исследования свидетельствуют об одинаковом направлении усиления и снижения уровней экспрессии одних и тех же генов иммунной системы в ответ на увеличение УПМ при БВ и вагините. Однако при вагините уровень изменений профиля транскрипции генов иммунной системы в слизистой влагалища более выражен, чем при БВ.

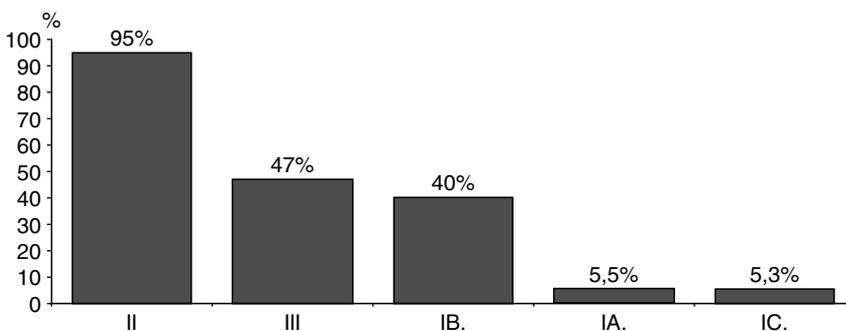
У пациенток с клиническим диагнозом вагинит при помощи ROC-анализа были установлены уровни количественных показателей транскрипции генов, характеризующие наличие воспалительной реакции. Все обследованные группы были проанализированы с точки зрения вероят-



**Рис. 2.** Транскрипционный профиль ряда генов иммунной системы при вагинитах и бактериальном вагинозе (относительно уровня экспрессии в контрольной группе)

ности локальной воспалительной реакции в соответствии с этими границами. Результаты анализа представлены на рис. 3.

Представленные на рис. 3 результаты свидетельствуют о том, что почти 50% женщин, имеющих клинический диагноз бактериальный вагиноз, и 40% женщин, не имеющих клинических симптомов заболевания, но у которых обнаружены ДНК *Ureaplasma* в количестве  $> 10^4$  ГЭ/мл, обнаруживают экспрессионный профиль молекулярных маркеров активации иммунной системы, соответствующий местному воспалению, аналогичный вагиниту.



**Рис. 3.** Вероятность локальной воспалительной реакции в исследованных группах (по уровню экспрессии комплекса генов иммунной системы, характеризующих наличие воспалительной реакции %)

IA. Контрольная подгруппа (n=95), IB. *Ureaplasma spp* более  $10^4$  ГЭ/мл (n=19), IC. Кандидоносительство (n= 27), II. Вагинит (n=215), III. Бактериальный вагиноз (n = 55).

Может показаться, что диагностика микробного состава и местной воспалительной реакции такими сложными, молекулярно-биологическими методами является избыточным и дорогостоящим исследованием. Однако возможности метода приобретают особое значение, когда необходимо диагностировать воспаление в труднодоступных биотопах, например в полости матки в случаях диагностики эндометрита или эндометриоза. Если новые возможности будут доступны в экономическом плане, они будут востребованы в диагностике воспалительных заболеваний, т. к. для правильной трактовки состояния пациента необходимо оценивать и этиологию инфекционного процесса, и реакцию организма на возбудитель.

Доступные комплексные лабораторные тесты с использованием ПЦР-РВ, количественный анализ биоты урогенитального тракта, объективная количественная оценка воспаления в конечном итоге обеспечат возможность перехода к персонифицированному лечению заболеваний урогенитального тракта у женщин.

### Список использованной литературы

1. *Кира Е.Ф., Муслимова С.З.* Неспецифический вагинит и его влияние на репродуктивное здоровье женщины // Проблемы репродукции. 2008. Т. 5. С. 8–14.
2. *Кисина В.И., Забиров К.И.* Урогенитальные инфекции у женщин: клиника, диагностика, лечение. М: «Медицинское информационное агентство», 2005, 288 с.
3. *Манухин И.Б., Сухих Г.Т., Савельева Г.М.* Гинекология: национальное руководство . М: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 704 с.
4. Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10).
5. *Anderson M.R., Klink K., Cohrssen A.* Evaluation of vaginal complaints // JAMA : the journal of the American Medical Association. 2004. Vol. 291. P. 1368–1379.
6. *Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A. et al.* Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations // Am J Med. 1983. Vol. 74. P. 14–22.
7. *Farage M.A., Miller K.W., Ledger W.J.* Determining the cause of vulvovaginal symptoms // Obstetrical & gynecological survey. 2008. Vol. 63. P. 445–464.