

Олигонуклеотидный микрочип для одновременной идентификации шести возбудителей различной природы

А.И.Мызникова¹, Н.В.Захарова¹, Д.А.Грядунов¹, А.В.Чудинов¹,
Н.Н.Володин², А.С.Заседателев¹, В.М.Михайлович¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва;

²Российский государственный медицинский университет, Москва

Основными возбудителями опасных внутриутробных и неонатальных заболеваний являются: цитомегаловирус (CMV), вирусы простого герпеса первого (HSV-1) и второго типа (HSV-2), *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*. Своевременно проведенная диагностика и направленная специфическая терапия позволяют существенно снизить риск неблагоприятных исходов этих заболеваний. Разработан новый метод на основе ПЦР на микрочипе, который позволяет проводить одновременную идентификацию указанных 6 возбудителей в течение 3,5 ч.

Ключевые слова: HSV-1, HSV-2, CMV, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, олигонуклеотидный микрочип, ПЦР на микрочипе

Oligonucleotide microchip for simultaneous identification of the six pathogens of varied nature

A.I.Myznikova¹, N.V.Zakharova¹, D.A.Gryadunov¹, A.V.Chudinov¹,
N.N.Volodin², A.S.Zasedatelev¹, V.M.Mikhaylovich¹

¹V.A.Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

²Russian State Medical University, Moscow

The main pathogens of dangerous intrauterine and neonatal diseases are as follows: cytomegalovirus (CMV), herpes simplex viruses type I (HSV-1) and II (HSV-2), *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*. An early diagnosis and targeted specific therapy permit to considerably reduce the risk for unfavorable outcomes of these diseases. A new method based on microchip PCR has been worked out that permits to carry out simultaneous identification of these 6 pathogens within 3.5 h.

Key words: HSV-1, HSV-2, CMV, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, oligonucleotide microchip, PCR on microchip

Актуальной проблемой современной пери- и неонатологии является своевременная и проведенная в кратчайшие сроки диагностика внутриутробных инфекций, являющихся причиной ранней детской смертности, соматических и психоневрологических отклонений в развитии детей в постнеонатальном периоде. К основным возбудителям внутриутробных и неонатальных заболеваний, способных привести к тяжелым поражениям, относят цитомегаловирус (CMV), вирусы простого герпеса первого (HSV-1) и второго типов (HSV-2), *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* [1–5]. Своевременное применение соответствующей этиотропной и

иммунопатогенетической терапии позволяет существенно снизить риск неблагоприятных исходов этих заболеваний [1, 3, 6–8]. По этой причине, разработка и применение в клинической лабораторной диагностике быстрых и надежных методов идентификации указанных выше возбудителей внутриутробных инфекций представляется задачей актуальной и чрезвычайно важной.

В настоящее время существует ряд иммунологических и основанных на амплификации нуклеиновых кислот методов идентификации перечисленных выше инфекционных агентов [9–12]. Однако, большинство из используемых в клинической лабораторной диагностике коммерческих тест-систем позволяет выявлять в одной реакции лишь один тип возбудителя. Таким образом, для идентификации всего спектра указанных выше возбудителей, необходимо проведение шести отдельных реакций.

Биологические микрочипы являются современным диагностическим инструментом, позволяющим проводить одновременный многопараметрический анализ ряда генетических мишеней [13–16]. Ранее нами уже был разработан под-

Для корреспонденции:

Михайлович Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заместитель руководителя лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Телефон: (499) 135-1177

Статья поступила 21.07.2008 г., принята к печати 19.01.2009 г.

ход, позволяющий при помощи гибридизации на биологическом микрочипе выявлять в одном образце ДНК CMV, HSV-1, HSV-2 и вируса гепатита В [17]. В настоящей работе представлен усовершенствованный метод для одновременной идентификации на биологическом микрочипе CMV, HSV-1, HSV-2, *C. trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* методом ПЦР. К преимуществам нового подхода можно отнести расширенный и более адаптированный к практическим потребностям спектр одновременно анализируемых возбудителей (до шести) и сокращенное время анализа (до 3,5 ч). В новой системе также предусмотрен внутренний контроль реакции как необходимый критерий для применения метода в практической лабораторной диагностике.

Материалы и методы

Клинические образцы HSV, CMV, *M. hominis*, *C. trachomatis*, *U. urealyticum* включали таковые крови, мочи, букальных соскобов новорожденных, а также урогенитальные мазки, кровь и мочу беременных женщин. Препараты ДНК CMV, HSV-1, HSV-2, *M. hominis*, *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, выделенные из клинических образцов, были предоставлены Научным центром акушерства гинекологии и перинатологии РАМН.

Праймеры были сконструированы при использовании программы «Oligo 6» (Molecular Biology Insights, USA) и OligoAnalyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>). Процедура выбора праймеров осуществлялась согласно ранее предложенному алгоритму [14].

Праймеры синтезировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, USA) с использованием стандартной фосфорамидитной процедуры. Очистку осуществляли методом ВЭЖХ на колонке с обратной фазой C-18 Nucleosil (Sigma, USA). Праймеры для проведения ПЦР на чипе были иммобилизованы по 5'-концевому основанию, для чего в гель при синтезе в их состав вводили свободную аминогруппу, используя 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research, USA).

Подготовку проб для проведения ПЦР на чипе осуществляли мультиплексным методом в пробирке. Проводили амплификацию фрагмента гена *pol* для HSV-1, HSV-2 длиной 267 н.о. с помощью праймеров Hrp_f и HSV_r, для CMV длиной 190 н.о. с помощью праймеров Hrp_f и CMV_r, фрагмента гена *ureA* для *U. urealyticum* длиной 167 н.о. с помощью праймеров Ur_f и Ur_r, фрагмента гена *adi* для *M. hominis* длиной 127 н.о. с помощью праймеров Mys_ad_f и Mys_ad_r,

фрагмента гена 16S rRNA для *C. trachomatis* длиной 201 н.о. с помощью праймеров Chl_f и Chl_r.

Кроме того, одновременно с указанными ДНК-мишенями амплифицировали фрагмент ДНК бактериофага λ длиной 339 н.о., который был использован в качестве внутреннего контроля, с помощью праймеров lam_for и lam_r (см. табл. 1). Последовательности всех использованных праймеров и их позиции в геноме, а также характеристики иммобилизованных праймер, представлены в табл. 1, 2. Реакционная смесь (конечный объем 25 мкл) содержала 2,5 мМ MgCl₂, 70 мМ Трис-HCl (pH 8,6), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 Ед. ДНК-полимеразы Taq (Силекс, Россия), 0,3 Ед. урацил-ДНК-гликозилазы (Силекс, Россия), по 20 нмоль каждого праймера, по 0,2 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дУТФ, 1 мкл образца ДНК. Амплификацию проводили на приборе «DNA Engine Dyad™» («MJ Research», USA) в режиме: денатурация при 95°C – в течение 5 мин; 10 циклов (95°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30 с), 25 циклов (95°C – 30 с, 67°C – 30 с, 72°C – 30 с), заключительная элонгация при 72°C 10 мин.

ПЦР на чипе. Реакционная смесь (конечный объем 40 мкл) содержала 70 мМ Трис-HCl (pH 8,6), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 4мМ MgCl₂, по 0,2 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дУТФ, 12,5 ед. ДНК-полимеразы Taq (Силекс, Россия), 2 мкМ dU*-2 (ИМБ, Москва), 0,125 мг/мл БСА, 200 нмоль X1 праймера (AGG TGG TGA ACG GGC TGT A) и 1 мкл ПЦР-продукта, полученного при амплификации на первой стадии. Реакцию проводили на приборе Tgradient Biometra («Wahman», Germany) в режиме: 95°C – 2 мин, 35 циклов (95°C – 40 с, 55°C – 20 с, 72°C – 45 с), заключительная элонгация 72°C – 10 мин.

Отмывку чипа проводили электрофоретически (5 мин, 15 В/см).

Регистрацию результатов выполняли на портативном анализаторе флуоресценции «УАПК» (ИМБ РАН, Россия) с использованием специализированного программного обеспечения ImageWare (Biochip-IMB, Россия).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ с помощью разработанной системы одновременной идентификации HSV-1, HSV-2, CMV, *M. hominis*, *U. urealyticum* и *C. trachomatis* с использованием биологического микрочипа включает в себя две стадии мультиплексной ПЦР. Первая стадия – мультиплексная ПЦР в пробирке – предназначена для предварительного накопления специфичных ДНК-фрагментов и включения в них универсальной последовательности (X), ко-

Таблица 1. Праймеры, использованные для проведения мультиплексной ПЦР HSV-1, HSV-2, CMV, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *C. trachomatis*

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	№№ нуклеотидных позиций в геноме	№ последовательности в GenBank
Hrp_f	GCG GGT CAT CTA CGG GGA CAC GGA C	2712–2736, 3219–3244	DQ180391, M10792
HSV_r	X-CGG TTG ATA AAC GCG CAG TTG	3463–3483	M10792
CMV_r	X-GCC GAT GTA ACG TTT CTT GC	2882–2901	DQ180391
Ur_f	CAG AAG GTG CTG GTG GTG GAC A	1743–1764	AF085728.2
Ur_r	X-CTT CTG GAA CCT TAG GAT TTA AGT G	1886–1910	AF085728.2
Mys_ad_f	GAC TAC ATT ACA CCA GCT CGT TTA GAC	97–123	D13314.1
Mys_ad_r	X-CAA CAA CGT TGA TTC CTC TGT	200–220	D13314.1
Chl_f	GCG TGT GTG ATG AAG GCT CTA GGG TTG	407–433	DQ019310.1
Chl_r	X-AAC TAA CTT ACC TTT CCG CCT AC	586–608	DQ019310.1
lam_for	ATT GAG CGT GCA GCC AGT GA	1377–1396	J02459.1
lam_r	AGG TGG TGA ACG GGC TGT ACG CTG T	1692–1716	J02459.1

*X- последовательность AGG TGG TGA ACG GGC TGT A

Таблица 2. Иммобилизованные праймеры

Праймер	№№ нуклеотидных позиций тельности в геноме	№ последоват- в GenBank	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	T _{отжига} (конц. Na ⁺ 100 мМ)
im_ur	1817–1839	AF085728.2	ACA AAC CCA ACT ATT CCA TAT AC	55,9°C
im_chl	467–488	DQ019310.1	GTT AAT ACC CGC TGG ATT TGA G	58,9°C
im_myc_ad	140–161	D13314.1	CTA TTC TAG AAA GCC ACG ATG C	58,6°C
im_CMV	2739–2756	DQ180391	CGT GTT TGT CCG CTT TCG	59,7°C
im_HSV_1	3240–3257	M10792	CGG ACT CCA TAT TTG TGC	55,8°C
im_HSV_2	2675–2692	AY038367.1	CGG ACT CCA TTT TCG TTT	55,4°C
im_lam	1561–1581	J02459.1	AGG AGC TGG ACT TTA CTG ATG	59,3°C

торая находится на 5'-конце обратных праймеров. Вторая стадия (на чипе) проводится в присутствии флуоресцентно меченых нуклеотидов, что позволяет идентифицировать специфичные продукты по флуоресценции достроенных иммобилизованных праймеров. Во избежание получения ложноотрицательных результатов в качестве внутреннего контроля в разработанной системе использовали коммерческий препарат ДНК бактериофага λ (10^5 копий на реакцию).

На рисунке представлена схема сконструированного биочипа и результаты отдельных экспериментов при анализе клинических образцов ДНК. Биочип содержит 7 ячеек с иммобилизованными дискриминирующими праймерами, 3 маркерные ячейки с иммобилизованным флуоресцентным красителем и 2 ячейки, не содержащие олигонуклеотиды и используемые в качестве ячеек сравнения. Каждому возбудителю соответствует одна ячейка на чипе. После прохождения ПЦР реакции на чипе флуоресценция в ячейке с внутренним контролем обозначает, что реакция прошла, флуоресценция в любой другой ячейке обозначает присутствие ДНК соответствующего инфекционного агента. Флуоресцен-

цию в ячейках регистрируют с помощью специализированного программного обеспечения, которое позволяет также сохранять полученные данные в виде графического файла, либо в виде текстового документа с отчетом.

Разработанная система была использована для анализа выборки клинических образцов ДНК. Всего было проанализировано 44 образца: 5 оказались положительными по ДНК *HSV-1*, 5 – по ДНК *HSV-2*, 3 – по ДНК *CMV*, 13 – по ДНК *C. trachomatis*, 4 – по ДНК *M. hominis*, 4 – по ДНК *U. urealyticum*; 1 образец содержал одновременно ДНК *C. trachomatis* и *CMV*, 7 образцов содержали одновременно ДНК *M. hominis* и *U. urealyticum*, а 2 образца дали отрицательный результат. Полученные результаты сравнивали с результатами коммерческих тест-систем, основанных на ИФА («DCLab», USA) и ПЦР с индивидуальными праймерами («ДНК-технология», Россия). Ложноотрицательных и ложноположительных результатов получено не было.

Для оценки чувствительности метода была приготовлена серия разведений коммерческого препарата ДНК бактериофага λ . Количество образца, соответствующее 10^1 копий на реакцию, оказалось достаточным.

Таким образом, преимуществами предложенного в настоящей работе метода являются: возможность одновременно выявления 6 инфекционных агентов, высокая чувствительность в сочетании с высокой специфичностью и короткое время проведения анализа, что чрезвычайно важно для новорожденных детей, так как позволяет своевременно назначить им адекватную терапию. Именно перечисленные выше преимущества разработанной системы идентификации возбудителей дают возможность рекомендовать ее применение в диагностических а, в перспективе, и в перинатальных центрах.

Исследователи выражают благодарность Л.З.Файзулину за любезно предоставленные образцы и квалифицированную помощь, М.В.Дегтяревой – за полезные советы и обсуждение, С.В.Панькову, С.А.Суржикову и Э.Я.Крейндлину – за изготовление чипов, В.Е.Барскому – за предоставленное регистрирующее оборудование. Настоящая работа была выполнена в рамках государственного контракта Минздрава-соцразвития РФ №364-ПД.м

Литература

1. Biernat-Sudolska M., Rojek-Zakrzewska D. and Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. Acta Biochimica Polonica 2006; 53 (3): 609–12.
2. Knausz M., Niederland T., Dosa E. and Rozgonyi F. Meningo-encephalitis in a neonate caused by maternal *Mycoplasma hominis* treated successfully with chloramphenicol. J Med. Microbiol. 2002; 51: 187–8.

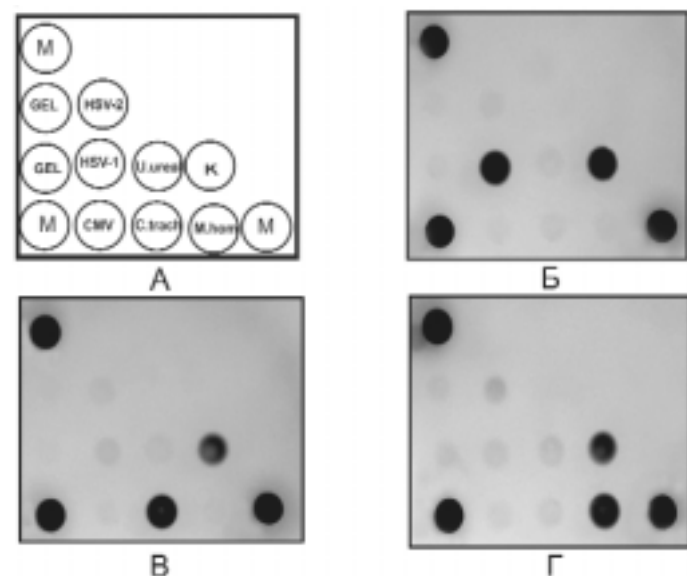


Рисунок. Схема микрочипа и результаты идентификации патогенных агентов методом ПЦР на чипе.

А – схема расположения специфических праймеров в гелевых элементах микрочипа. Используются следующие обозначения: зонды для идентификации вирусов простого герпеса 1-го, 2-го типов и цитомегаловируса – *HSV-1*, *HSV-2*, и *CMV*, соответственно; *U. ureal* – *Ureaplasma urealyticum*, *C. trach* – *Chlamydia trachomatis*, *M. hom* – *Mycoplasma hominis*. К – зонд внутреннего положительного контроля реакции, М – маркерные ячейки, Gel – контрольные гелевые ячейки, не содержащие зондов. Б, В, Г – флуоресцентные картины, полученные после проведения ПЦР на чипе с образцами *HSV-1*; *C. trachomatis*, *M. hominis*, соответственно.

3. Knezevic A., Martic J., Stanojevic M., et al. Disseminated neonatal herpes caused by herpes simplex virus types 1 and 2. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13(2): 302–4.
4. Lanari M., Lazzarotto T., Venturi V., et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in Symptomatic and Asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006; 117(1): e76–e83.
5. Numazaki K. Current problems of perinatal Chlamydia trachomatis infections. *J Immune Based Ther Vaccines* 2004; 2: 4.
6. Гриноу А., Осборн Дж., Сазерленд Ш. Врожденные, перинатальные и неонатальные инфекции. Пер. с англ. М.: Медицина, 2000; 288: ил.
7. Протоколы диагностики, лечения и профилактики внутриутробных инфекций у новорожденных детей. Москва, 2-е издание (переработанное и дополненное), ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ Медицинский научный и учебно-методический журнал (Методические рекомендации), 2005; 24: 33–160.
8. Kimberlin D.W., Lin C.Y., Jacobs R.F., et al. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. *Pediatrics* 2001; 108 (2): 223–9.
9. Lazzarotto T., Galli C., Pulvirenti R., Rescaldani R., et al. Evaluation of the Abbott AxSYM Cytomegalovirus (CMV) Immunoglobulin M (IgM) Assay in Conjunction with Other CMV IgM Tests and a CMV IgG Avidity Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 196–8.
10. Liljeqvist J.-A., Svennerholm B, and Bergstrom T. Typing of clinical Herpes Simplex Viruses type 1 and type 2 isolates with monoclonal antibodies. *J Clin. Microbiol.* 1999; 37(8): 2717–8.
11. Martin D.H., Nsuami M., Schachter J., et al. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient “Gold Standard” in clinical trials of new diagnostic tests for Chlamydia trachomatis infections. *J Clin. Microbiol.* 2004; 42: 4749–58.
12. Waites K.B., Katz B., and Schelonka R.L. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18: 757–89.
13. Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., et al. Species-Level Identification of Orthopoxviruses with an Oligonucleotide Microchip. *J Clin. Microbiol.* 2002; 40: 753–7.
14. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadinov D., et al. Identification of rifampin-resistant Mycobacterium Tuberculosis Strain by hybridization, PCR, and Ligase Detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2531–40.
15. Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 531–9.
16. Rubina A.Yu, Pan_kov S.V., Dementieva E.I., et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* 2004; 325: 92–106.
17. Мызникова А.И., Файзуллин Л.З., Захарова Н.В. и др. Олигонуклеотидные микрочипы в диагностике неонатальных инфекций. *Вопросы практической педиатрии* 2006; 1(3): 61–4.

Информация об авторах:

Мызникова Анна Игоревна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
Телефон: (499) 135-9846.

Захарова Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
Телефон: (499) 135-9846.

Грядун Дмтрий Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
Телефон: (499) 135-9846.

Чудинов Александр Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
Телефон: (499) 135-1177.

Володин Николай Николаевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ректор Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-1422.

Заседаев Александр Сергеевич, доктор физико-математических наук, профессор, заместитель директора Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
Телефон: (499) 135 1414.

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Эффективность плацебо в лечении мигрени у детей и подростков: анализ двойных слепых плацебо-контролируемых исследований

Исследования в области лечения мигрени у детей и подростков встречаются редко и очень сложны по дизайну. В частности, высокая эффективность плацебо в некоторых исследованиях затрудняет доказательства эффективности настоящих лекарств. Для упрощения изучения медикаментозного лечения мигрени были проанализированы все плацебо-контролируемые исследования по лечению и профилактике мигрени у детей и подростков с различными оценками эффективности плацебо (отсутствие или сохранение боли в течение 2 ч после приема препарата, снижение частоты атак на 50% и более). Было зафиксировано 8 перекрестных и 11 параллельных работ по лечению острых приступов мигрени. Эффект плацебо был значительно меньше в перекрестных работах (19,2% против 27,1% для исчезновения боли через 2 ч и 39,4 против 56,9% для сохранения болевого синдрома, в перекрестных и параллельных исследованиях, соответственно). В 10 изученных работах по профилактике мигрени отмечалась только небольшая тенденция к снижению эффекта плацебо в перекрестных исследованиях. Другими достоверными факторами, повышающими оценку эффективности плацебо в исследованиях лечения острых приступов мигрени, являются одноцентровые (по сравнению с мультицентровыми) исследования и малая выборка в исследовании. Пол и возраст детей не влияют на оценку эффективности плацебо. Таким образом, полученные данные доказывают, что высокая эффективность плацебо в сочетании с низкой эффективностью настоящих лекарств для лечения острых приступов мигрени у детей отмечается при исследованиях, проводимых в параллельных группах. При этом, однако, эффективность настоящих лекарств похожа на эффективность лекарственных препаратов, выявленную у взрослых пациентов. Для увеличения достоверности исследований необходимо учитывать эти результаты при проведении дальнейших работ по лечению мигрени у детей и подростков.

Evers S., Marziniak M., Frese A., Gralow I.

Placebo efficacy in childhood and adolescence migraine: an analysis of double-blind and placebo-controlled studies. Cephalalgia. 2008 Dec 11.