

# Использование молекулярно-генетических технологий, основанных на полимеразной цепной реакции, в диагностике инфекционных заболеваний у новорожденных

Н.Н.Володин, Л.А.Дегтярева, Л.И.Кафарская, А.Н.Шкопоров,  
Е.В.Хохлова, М.Л.Шуникова, А.Н.Чаплин, Б.А.Ефимов

*Российский государственный медицинский университет, Москва*

Статья посвящена перспективам использования методов, основанных на полимеразной цепной реакции, в диагностике инфекционных состояний у новорожденных. Обсуждаются достигнутые к настоящему времени результаты, а также проблемы, возникающие на пути широкого внедрения этих методов в практику, и пути их преодоления.

*Ключевые слова:* полимеразная цепная реакция, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, новорожденные, инфекционные болезни, сепсис, диагностика

## The use of molecular-genetic technologies based on polymerase chain reaction in diagnosis of infectious diseases in the neonate

N.N.Volodin, L.A.Degtyareva, L.I.Kafarskaya, A.N.Shkoporov,  
E.V.Khokhlova, M.L.Shunnikova, A.N.Chaplin, B.A.Efimov

*Russian State Medical University, Moscow;*

The article deals with future prospects of using methods based on polymerase chain reaction in diagnosis of infectious conditions in the neonate. Current achievements, problems impeding wide introduction of these methods into medical practice, and ways to overcome them are discussed.

*Key words:* polymerase chain reaction, real time polymerase chain reaction, neonate, infectious diseases, sepsis, diagnosis

**У**спешное разрешение проблемы перинатальных инфекций как в их предупреждении, так и в патогенетически оправданном и своевременном лечении зависит от использования эффективных диагностических и лечебных технологий. Принимая во внимание скорость развития инфекционного процесса у новорожденного, можно понять, насколько значимо использование в неонатальной клинике методов экспресс-диагностики. В настоящее время спектр диагностических возможностей для выявления перинатальных инфекций значительно расширен. В частности, в существующих программах по раннему выявлению инфекций у новорожденных большое значение придается серологической диагностике, прежде всего, в выявлении вирусных инфекций [1].

В то же время существующие методы не всегда бывают достаточно чувствительными для выявления патогенных микроорганизмов.

### Для корреспонденции:

Ефимов Борис Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии Российского государственного медицинского университета

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 434-1766

Статья поступила 12.04.2010 г., принята к печати 23.07.2010 г.

В большей степени это относится к бактериальным патогенам, для обнаружения которых по-прежнему в основном используют традиционные микробиологические методы, требующие большого количества времени и усилий.

Наиболее частыми причинами госпитализации новорожденных остаются сепсис, менингит и респираторные инфекции, которые могут приводить к тяжелым осложнениям. Ключевыми патогенами, провоцирующими эти заболевания, являются *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus* и коагулаза-негативные стафилококки, стрептококки, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Haemophilus influenzae* [2, 3].

В связи с этим в последние годы наиболее быстро развивающимся направлением в области клинических лабораторных исследований стало создание и совершенствование методов молекулярной диагностики инфекционных болезней, основанных на обнаружении и анализе специфических нуклеотидных последовательностей возбудителей. Использование этих методов дополняет или приводит к постепенной замене широко применявшегося ранее в микробиологических лабораториях культивирования микроорганизмов, а также биохимического и иммунологического анализа.

Инструменты первого поколения, используемые для обнаружения нуклеиновых кислот, позволяли проводить только монопараметрический анализ и, как и традиционные тест-системы, определяли только один вид бактерий или вирусов. Усовершенствование этих инструментов и разработка новых технологических подходов в настоящее время открывают возможность для создания мультипараметрических тест-систем. Использование технологий микрочипов, мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) или масс-спектрометрии позволяет проводить быструю микробиологическую диагностику в сочетании со значительным уменьшением риска случайной микробной контаминации. Кроме того, в то время как первые тест-системы были нацелены на обнаружение и идентификацию только самих патогенных микроорганизмов, новые технологии используют для параллельного выявления у микроорганизмов генов множественной резистентности к антибиотикам или для эпидемиологического надзора за микробными популяциями [4].

Метод ПЦР был предложен в 1985 г. и впервые в перинатальной практике был применен для дородовой диагностики серповидноклеточной анемии [5–7]. Впоследствии его стали использовать для обнаружения сначала вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), а затем и других возбудителей (вирусы, бактерии, простейшие – токсоплазмы и др.), наиболее часто вызывающих болезни плода и новорожденных [8–11].

Чрезвычайный интерес к развитию и использованию методов, основанных на технологии ПЦР, связан с несколькими причинами:

- высокая их чувствительность и специфичность позволяют обнаруживать присутствие очень малого количества копий генетических последовательностей микроорганизмов в микроколичествах исследуемого материала и за короткое время;

- в патогенезе некоторых вирусных инфекций (ВИЧ-1 и др.) обнаружение провирусной последовательности ДНК ВИЧ является более ранним маркером инфекции, чем обнаружение антител;

- процесс антителообразования у новорожденных и, особенно, у недоношенных детей, а также у пациентов с врожденными или приобретенными иммунодефицитными состояниями может быть ослаблен, что затрудняет использование серологического типирования, но не будет влиять на результаты молекулярно-генетических методов [12, 13].

Кроме того, использование методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот в диагностике инфекционных заболеваний у новорожденных и детей раннего возраста, родившихся от серопозитивных матерей, исключает проблемы, связанные с интерференцией антител при проведении серологических исследований. Современные модификации этого метода позволяют проводить не только качественное определение присутствия патогенных микроорганизмов в исследуемом материале, но и количественное их содержание.

Наконец, объектом исследования может быть любой биологический материал (околоплодные воды, ворсинки хориона, пуповинная кровь, слюна и др.).

ПЦР – это ферментативная реакция, проводимая *in vitro*, позволяющая синтезировать практически неограниченное

количество копий заданного фрагмента ДНК. Это происходит благодаря действию фермента ДНК-полимеразы, которая при соответствующих условиях может осуществлять копирование ДНК.

В самом простом варианте компонентами ПЦР являются искомая молекула ДНК, вносимые в молярном избытке 2 короткие одонитевые последовательности ДНК (олигонуклеотидные праймеры), термостабильная ДНК-полимераза, эквимольная смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов – дНТФ (дезоксирибоаденозинтрифосфат – дАТФ, дезоксирибоцитидинтрифосфат – дЦТФ, дезоксирибогуанозинтрифосфат – дГТФ и дезоксириботимидинтрифосфат – дТТФ),  $MgCl_2$ ,  $KCl$  и Трис- $HCl$  буфер.

Для успешного протекания реакции праймеры подбирают так, чтобы каждый из них был способен по принципу комплементарности связываться с соответствующей ему нуклеотидной последовательностью одной из двух нитей ДНК-мишени.

Область молекулы ДНК, отграниченная с двух сторон праймерами, которую принято называть амплифицируемой областью, может составлять от 100 (и менее) до нескольких сотен пар оснований.

Чтобы начать ПЦР реакционную смесь нагревают до разделения 2 нитей ДНК-мишени, затем охлаждают, чтобы позволить праймерам связаться с комплементарными им участками. После этого ДНК-полимераза инициирует удлинение праймеров по направлению друг к другу на их 3'-концах, используя добавленные в реакционную смесь дНТФ, которые последовательно присоединяются в соответствии с нуклеотидным составом амплифицируемой области ДНК-мишени.

В следующем цикле реакции вновь нагревают образовавшиеся продукты полимеризации для их отделения от ДНК-мишени. Теперь каждый из образовавшихся *de novo* продуктов реакции, а также первоначальная последовательность ДНК могут служить в качестве шаблона для последующих «раундов» связывания праймера и реакции полимеризации.

Теоретически в конце каждого цикла должно происходить удвоение числа продуктов ПЦР. Таким образом, после  $n$ -го числа циклов ПЦР количество отграниченной праймерами нуклеотидной последовательности может быть увеличено в  $2^n$  раз.

Для постановки реакции используют программируемые термостаты – термоциклеры (амплификаторы), в которых осуществляется контроль над временем протекания и температурой каждого шага очередного цикла реакции и за количеством самих циклов. В идеале после 20 циклов ПЦР количество копий искомой последовательности ДНК увеличивается в  $10^6$  раз, а после 30 – в  $10^9$  раз. На практике процесс амплификации не может быть полностью эффективным вследствие недостаточной оптимизации условий реакции или наличия в биологическом материале ингибиторов ДНК-полимеразы.

В этом случае процесс амплификации лучше всего описывается выражением:

$$(1 + e)^n,$$

где  $e$  – эффективность протекания реакции ( $0 \leq e \leq 1$ ) и  $n$  – общее число циклов [14].

Визуализация и определение молекулярной массы продуктов амплификации, образующихся во время ПЦР, проводят при помощи метода гель-электрофореза.

Так как ПЦР может быть инициирована не только ДНК мишени, но и самими продуктами амплификации, методы, основанные на этой технологии, очень чувствительны к загрязнению. Проникновение продуктов амплификации извне в реакционную смесь может привести к ложноположительным результатам. Возможность перекрестного загрязнения является серьезной проблемой, которую решают, строго выполняя регламентирующие требования, предъявляемые к устройству лаборатории, правила эксплуатации оборудования и условия рабочего процесса.

Метод постановки ПЦР с обнаружением продуктов реакции путем проведения гель-электрофореза (конвенциональная или классическая ПЦР) может быть использован для обнаружения микроорганизмов в клиническом материале. Современные модификации ПЦР более специфичны и чувствительны, протекают быстрее и позволяют определять количественное содержание микроорганизмов.

Важнейшей модификацией ПЦР является мультипраймерная ПЦР в реальном времени, которая позволяет проводить экспресс-диагностику сразу нескольких возбудителей различной природы (бактерии, вирусы, грибы и простейшие).

ПЦР в реальном времени (real-time PCR, мониторинговая ПЦР, ПЦР-РВ) – это метод, при котором этапы амплификации ДНК-мишени и детекция образующихся продуктов происходят одновременно в одной пробирке. Для постановки этого метода используют специальный амплификатор со встроенным оптическим блоком, который регистрирует флуоресцентное излучение, исходящее от образца. Программное обеспечение ЭВМ, поддерживающее работу амплификатора, строит график, описывающий течение реакции полимеризации и накопления вновь синтезированных последовательностей ДНК.

В самом простом варианте накопление продуктов ПЦР определяют при помощи флуоресцентных красителей, которые преимущественно связываются с двухцепочечной ДНК. Одним из таких красителей является SYBR Green. В свободном состоянии флуоресценция, генерируемая этим красителем, относительно низка, но, когда краситель связан с двухцепочечной ДНК, флуоресценция значительно усиливается.

Специфичность метода ПЦР-РВ может быть увеличена за счет включения в реакционную смесь гибридных зондов. Эти зонды должны быть помечены флуоресцентными красителями или с помощью комбинации флуоресцентных красителей и гасителей флуоресценции.

В методе Taqman используют 5'-3'-экзонуклеазную активность Taq-полимеразы, которая разрушает меченый олигонуклеотидный зонд, специфично связывающийся с амплифицируемым участком ДНК между праймерами и препятствующий нормальному ходу процесса полимеризации. В этой методике используют флуорогенные гибридные зонды с двойным мечением. Одна метка является флуоресцентным красителем и служит в качестве репортера, вторая метка – это краситель, гасящий спектр излучения репортерного красителя. Нуклеазная деградация гибридного зонда высвобождает репортерный краситель от

связи с гасителем, что приводит к увеличению его флуоресцентного излучения до максимума. Усиление флуоресценции, регистрируемое прибором, означает, что специфический ПЦР-продукт был получен, при этом интенсивность флуоресценции зависит от количества продукта. Существуют и другие методы ПЦР-РВ, в которых используются иные варианты зондов (Molecular Beacons и FRET) [14].

Таким образом, важной особенностью этого метода, в отличие от классической ПЦР, является возможность количественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории, а также автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Отсутствие стадии электрофореза позволяет уменьшить затрачиваемое на исследование время и минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР окружающей среды, то есть резко уменьшить число ложноположительных результатов. Поскольку регистрация результатов происходит автоматически, непосредственно в процессе ПЦР, то весь анализ можно проводить в одной–двух комнатах лаборатории, и нет необходимости в отдельном помещении для организации детекции продуктов реакции.

На рисунке показан типичный образец кинетической кривой ПЦР-РВ, описывающей зависимость уровня флуоресценции (нормализованной интенсивности флуоресценции) репортерного красителя Rn от цикла амплификации.

График имеет сигмовидную форму и демонстрирует 3 стадии реакции: стадию инициации (когда флуоресцентная метка еще не детектирует ПЦР-продукты); экспоненциальную, во время которой наблюдается экспоненциальная зависимость интенсивности флуоресценции от увеличения количества циклов ПЦР; и стадию насыщения, когда кривая выходит на «плато».

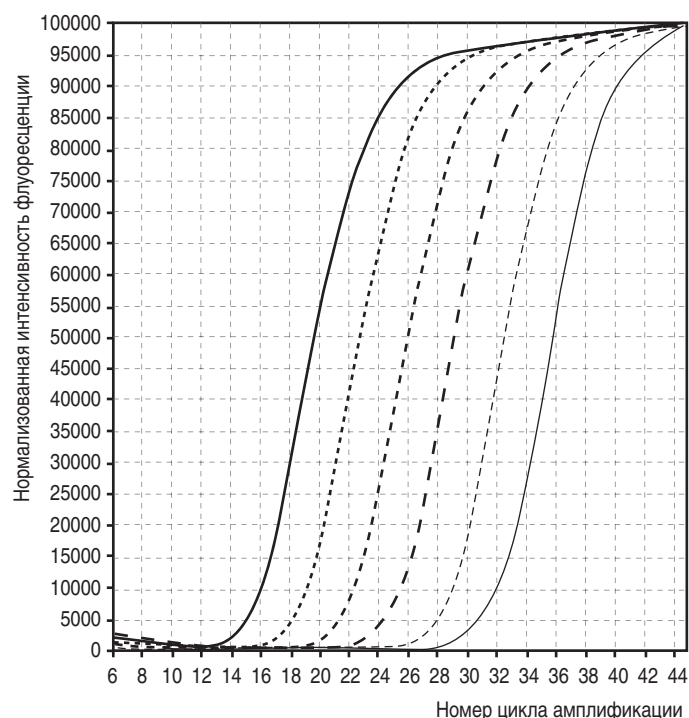


Рисунок. Кинетические кривые полимеразной цепной реакции в реальном времени.

В начальных циклах ПЦР существуют небольшие изменения флуоресцентного сигнала, значения которого определяют исходный (базовый) уровень графика. Увеличение уровня флуоресценции сверх базового свидетельствует о накоплении ПЦР-продуктов.

При этом фиксируемое пороговое значение флуоресценции может быть установлено выше ее базового уровня. Пороговый цикл определяют как номер цикла, при котором флуоресценция преодолевает фиксированный порог. Функция, описывающая зависимость значений десятичных логарифмов начальных концентраций мишени от значений пороговых циклов, представляет собой прямую пропорциональность. Количество мишени в неизвестном образце определяют, измеряя его пороговый цикл с помощью стандартной калибровочной кривой.

Для проведения ПЦР-РВ в нашей стране используют следующие приборы: детектирующий амплификатор «ДТ-322» – для обработки 32 образцов одновременно, имеющий 2 канала измерений для двух флуоресцентных красителей в одной пробе («ДНК-технология», Россия); анализатор нуклеиновых кислот «АНК-32» – для обработки 32 образцов одновременно с использованием 4 каналов флуоресценции («Синтол», Россия).

Наиболее часто встречающиеся на отечественном рынке западные образцы амплификаторов: Rotor-Gene 3000 с одновременной обработкой 36 или 72 образцов, имеющий 2 или 4 канала измерений (Corbett Research, Австралия); iCycler iQ5 – 96 образцов и 5 каналов измерений (Bio-Rad, США).

В неонатальной практике методы, основанные на ПЦР, прежде всего, используют для диагностики вирусных инфекций.

Традиционные методы обнаружения вирусов в клиническом материале имеют несколько недостатков по сравнению с молекулярными методами: несмотря на то, что выделение вирусов с использованием технологии клеточных культур считается «золотым стандартом», он способен обнаруживать одновременно малое число таксономических групп вирусов. Кроме того, на эффективность этого метода в значительной степени влияет качество клинического материала, условия транспортировки и хранения проб, а также тип используемых клеток.

Поскольку время постановки этого метода составляет от нескольких дней до нескольких недель, получаемые результаты не в состоянии помочь в выборе стратегии терапевтических мероприятий на первом этапе лечения, непосредственно после поступления пациента в стационар.

Результаты анализов, получаемые при помощи еще одного часто используемого метода диагностики вирусных инфекций – иммунофлуоресценции, доступны в более короткие сроки, что улучшает качество терапевтической помощи, уменьшая необходимость применения антибиотиков и укорачивая сроки пребывания пациентов в стационаре [15, 16]. Однако этот метод менее чувствителен по сравнению с культуральными технологиями при выявлении некоторых групп вирусов. ПЦР обладает более высокой чувствительностью и скоростью по сравнению с традиционными методами, и в настоящее время ее считают «золотым стандартом» для диагностики у новорожденных менингита, вызываемого вирусом простого герпеса [16, 17].

Продолжается интенсивная разработка и внедрение в клиническую неонатологическую практику методов, основанных на ПЦР, для выявления цитомегаловирусов, вирусов ветряной оспы и опоясывающего лишая, парво- и энтеровирусов, а также вирусов краснухи и гепатита В [9, 10, 18–20].

Дополнительным преимуществом метода ПЦР является его способность обнаруживать в клиническом материале одновременно нескольких типов вирусов, а также атипичные патогены бактериальной и вирусной природы, которые не могут быть выявлены культуральными бактериологическими методами, или для которых пока не существует доступных тест-систем, основанных на проведении реакции иммунофлуоресценции (корона- и метапневмовирус человека (hMPV), *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) [15].

Быстрая и высокоточная идентификация широкого диапазона вирусов имеет жизненно важное значение для пациентов палат интенсивной терапии неонатологических отделений, а также может улучшить наше понимание природы вирусной инфекции врожденной или приобретенной этиологии. Наконец, результаты вирусологических исследований, получаемые на ранних этапах развития инфекционного заболевания, в ближайшем будущем могут быть востребованы в связи с тем, что специфическая противовирусная терапия становится все более эффективной и приобретает все более широкое распространение.

Диагностическую ценность ПЦР-РВ в сравнении с традиционными методами продемонстрировали результаты сравнительного исследования, проведенного J.W.A.Rossen et al. (2006). Из 23 детей раннего возраста (медиана = 2,6 мес), поступивших в отделение интенсивной терапии с инфекциями нижних отделов дыхательных путей, при помощи традиционных методов удалось обнаружить респираторные вирусы (респираторный синцитиальный вирус, аденовирусы и вирусы гриппа) только у 11 (48%). Применение метода ПЦР-РВ не только позволило подтвердить позитивные результаты, но и идентифицировать еще 22 вируса (рино- и коронавирусы, вирусы парагриппа 1/3 и hMPV) у 11 пациентов. Общее число пациентов с позитивными образцами исследуемого материала составило 22 (96%). Причем у 8 (35%) детей был обнаружен более чем один вирус [15].

К инфекционным состояниям, вызываемым бактериальными патогенами и нуждающимся в улучшении методологии лабораторной диагностики, прежде всего, относят неонатальный сепсис – относительно редко встречающееся заболевание, часто заканчивающееся летальным исходом [21–23]. Диагностика его включает проведение большого количества разнообразных анализов, а конечный результат – выявление небольшого числа случаев этого заболевания.

Сложность диагностики неонатального сепсиса связана с тем, что клинические симптомы его слабо выражены и могут быть имитированы другими клиническими состояниями, часто возникающими у новорожденных (гипогликемия, задержка внутриутробного развития, транзиторное тахипное) [18, 24].

Новорожденным, поступающим в отделения интенсивной терапии с подозрением на сепсис, как правило, проводят комплексное клиническое обследование и назначают комбинированную антимикробную терапию препаратами широкого спектра действия (ампициллин+гентамицин,

ампициллин+цефотаксим). Обычно антибиотикотерапию проводят в течение 72 часов в ожидании негативных результатов посева культуры крови.

В настоящее время не существует лабораторного теста, который имел бы решающее значение в диагностике неонатального сепсиса; даже методы, основанные на культивировании крови, имеют неприемлемо низкий уровень чувствительности.

Причинами для этого могут быть: низкая численность бактерий в кровеносном русле ребенка; малые объемы крови, получаемые от новорожденных для культивирования; все чаще практикуемая противинфекционная профилактика (антибиотикотерапия) как в дородовом периоде беременным, имеющим высокий риск развития преждевременных родов, так и непосредственно во время родов инфицированным роженицам (*Streptococcus agalactiae* и др.) [25]. Хорошо известно, что меньший объем крови, полученный для бактериологического исследования, уменьшает шансы обнаружения микроорганизмов. Хотя новорожденные, как правило, имеют несколько большую величину бактериемии по сравнению с взрослыми людьми (10–300 колониеобразующих единиц бактерий на 1 мл – КОЕ/мл и 1–30 КОЕ/мл крови, соответственно), количество крови, забираемой для бактериологического исследования у новорожденных, значительно меньше (менее 1 мл и 10–30 мл соответственно) [26].

С другой стороны, J.A.Kellogg et al. (2000) обнаружили, что у педиатрических пациентов низкий уровень бактериемии (менее 10 КОЕ/мл) может быть обнаружен с гораздо большей частотой (вплоть до 68%), чем считали ранее. Было сделано заключение, что для обнаружения низких концентраций патогенных бактерий необходимо собирать вплоть до 4,5% от объема крови пациента (приблизительно 4 мл/кг) причем, как минимум, для двух культур крови.

Однако новорожденные очень чувствительны к небольшой потере крови, и у пациентов этой группы невозможно забрать более чем 1–2 мл. В то же время, данные проведенных ранее исследований показали, что при необходимости субкультивирования полученного от пациентов небольшого количества крови на нескольких питательных средах, диагноз сепсиса более чем в 27% случаев может остаться неподтвержденным, в частности, в неонатальном периоде [28].

На сегодняшний день не существует ни одной стандартизированной, оцененной путем проведения широких клинических испытаний, коммерчески доступной тест-системы, пригодной для обнаружения нуклеиновых кислот патогенных бактерий в образцах крови новорожденных. Недавно создана доступная и основанная на методе ПЦР тест-система для детекции ДНК патогенных бактерий в крови больных с подозрением на сепсис («LightCycler SeptiFast system», Roche). Эта тест-система (стандартизированная и коммерчески доступная в Европе) позволяет обнаруживать 25 патогенных бактерий и грибов в образцах крови. Однако требуемый для тестирования объем крови составляет 3 мл, а оценки исследований по ее использованию для подтверждения сепсиса у новорожденных не проводилось [29, 30].

В настоящее время для культивирования крови в микробиологических лабораториях применяют автоматизированные приборы, например системы BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, MD), BacT/Alert (Biome'rieux, Durham, NC) или ESP

(Trek Diagnostic Systems, Inc, Westlake, OH). В них используют датчики, либо постоянно отслеживающие изменение концентрации активно продуцируемого микроорганизмами в процессе метаболических реакций углекислого газа, либо контролирующее изменение давления в культуральной емкости.

Для обнаружения бактерий при помощи метода культур крови требуется приблизительно от 12 до 24 ч инкубации для грамотрицательных бактерий и от 24 до 48 ч – для грамположительных; дополнительное время необходимо для изоляции микроорганизмов, содержащихся в культуре крови, их идентификации и определения чувствительности к антимикробным препаратам [17].

По данным I.Kurlat et al. (1989), положительные и отрицательные прогнозируемые значения, получаемые при использовании метода культуры крови для 2-го и 4-го дня исследования, составляют 92 и 99%, соответственно.

Однако при оценке состояния новорожденных, находящихся в отделении интенсивной терапии с подозрением на сепсис, существенное значение имеет скорость получения лабораторных данных. Включение надежных дополнительных и быстрых методов анализа, при помощи которых можно было бы обнаружить бактерии непосредственно в образцах крови (без их посева) будет способствовать своевременной диагностике и адекватной терапии у новорожденных.

Первое исследование по сравнительному обнаружению бактерий в крови у новорожденных при помощи классической ПЦР с использованием общих бактериальных праймеров, специфичных к высококонсервативным полинуклеотидным последовательностям гена, кодирующего 16S рибосомную РНК бактерий, и метода культуры крови было проведено еще в 1997 г. N.Laforgia et al. Исследование 33 образцов крови новорожденных с высоким риском развития раннего неонатального сепсиса показало корреляцию результатов, полученных обоими методами. Ложноотрицательных результатов отмечено не было, напротив, 4 случая выявления бактерий бактериологическим методом были подтверждены положительными результатами ПЦР-исследования. В 2 случаях ПЦР-исследование дало положительные результаты при отрицательных заключениях бактериологического. По мнению авторов этого исследования, положительные результаты ПЦР могут быть связаны с более высокой ее чувствительностью по сравнению с методом культивирования крови.

ПЦР способна выявлять присутствие бактериальной ДНК, даже если ее количество в крови соответствует очень небольшому количеству возбудителя, которого может быть недостаточно для выявления обычными методами культивирования. Кроме того, амплификация бактериальной ДНК позволяет определить в клиническом образце как наиболее часто обнаруживаемые при сепсисе возбудители, так и редкие виды микроорганизмов, для культивирования которых необходимы необычные условия, не применяющиеся в практике рутинных бактериологических исследований.

J.A.Jordan et al. (2000) провели первое масштабное исследование по выявлению сепсиса у новорожденных с использованием ПЦР. В общей сложности было исследовано 548 парных образцов крови, полученных от новорожденных, поступивших в отделение интенсивной терапии с подозрением на сепсис. Анализ проводили бактериологическим мето-

дом с использованием аппарата ВАСТЕС 9240 и методом ПЦР с амплификацией гена бактериальной 16S рРНК; предварительно культивировали 200 мкл образцов крови в 4 мл жидкой питательной среды TSB (tryptic soy broth) в течение 5 часов с целью обогащения образцов крови бактериями. Положительные результаты при культивировании крови и ПЦР-исследовании были получены в 25 (4,6%) и 27 (4,9%) случаях, соответственно. Сравнительный анализ результатов исследования показал, что чувствительность и специфичность для метода ПЦР составили 96,0 и 99,4%, а положительное и отрицательное предсказывающие значения – 88,9 и 99,8% соответственно.

Таким образом, результаты ПЦР, занимавшей с учетом предварительной инкубации крови в питательной среде лишь 9 часов, коррелировали с результатами, полученными при использовании стандартного метода культивирования крови.

В 2009 г. были опубликованы результаты еще одного сравнительного исследования эффективности применения классической ПЦР для диагностики сепсиса у новорожденных [29]. В это исследование вошли 48 новорожденных с подозрением на сепсис. У 31 из них на основании комплекса клинических и лабораторных показателей диагноз был подтвержден. При этом только у 6 (19,4%) из них были обнаружены бактерии в культуре крови. При помощи ПЦР на присутствие гена 16S рРНК бактерий среди образцов крови, полученной от всех 48 детей, было выявлено 10 положительных проб на присутствие бактериальной ДНК. У 2 пациентов метод ПЦР не дал позитивных результатов, а посев крови был положительным. Еще в одном случае метод ПЦР дал ложноположительный ответ, хотя была достоверно установлена не септическая природа патологического состояния у новорожденного.

В этом исследовании параметры эффективности ПЦР-диагностики бактериального сепсиса у новорожденных составили: чувствительность – 66,7%, специфичность – 87,5%, положительное и отрицательное предсказывающие значения – 95,4 и 75%, соответственно.

Учитывая относительно малое количество пациентов в этом исследовании, различия не были статистически достоверными. В комбинации этих двух методов чувствительность составила 35,5%. У 5 из уже упомянутых ранее 6 пациентов сепсис был диагностирован на основании клинкоморфологических признаков и повышения уровня С-реактивного белка, что позволяет считать эти результаты истинными, а не следствием экзогенной контаминации образцов крови бактериями.

По мнению авторов, отрицательный результат, полученный при культивировании крови, возможно, был связан с недостаточным ее объемом, взятым для исследования. Кроме того, предварительная апробация использовавшейся в этой работе тест-системы, основанной на ПЦР, показали, что предел обнаружения микроорганизмов для нее составлял  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл крови, то есть не позволял детектировать низкий уровень бактериемии. Более низкие значения, характеризующие эффективность диагностики септических состояний путем проведения ПЦР в сравнении с культуральным методом, полученные в этом исследовании, могут быть также связаны с тем, что авторами был исключен этап предварительной инкубации в питательной среде образцов крови.

J.A.Jordan et al. (2005) разработали диагностическую тест-систему, основанную на использовании ПЦР-РВ методом TaqMan. Обнаружение бактерий в крови новорожденных проводили путем амплификации высококонсервативной последовательности (размер – 380 пар оснований гена 16S рРНК) рРНК бактерий. ДНК была выделена из проб цельной крови с помощью концентрирующих колонок Qiagen без ее инкубации в питательной среде. Предварительные испытания показали, что предел чувствительности созданной тест-системы составлял 40, 50 и 2000 КОЕ/мл для таких часто ассоциированных с сепсисом новорожденных патогенных бактерий, как кишечные палочки, стрептококки группы В и *Listeria monocytogenes* соответственно при условии числа лейкоцитов крови ниже  $39,0 \times 10^9$ /л образца. Проведение исследований с использованием этой тест-системы требовало не более 4 часов для обоих этапов, включавших подготовку образцов и проведение реакции ПЦР. Также было показано полное соответствие между результатами, полученными путем культивирования крови и методом ПЦР-РВ, составившее в этом исследовании 94,1%.

Эти результаты позволяют сделать заключение о том, что использование молекулярно-генетических технологий позволяет увеличить эффективность прямых диагностических процедур, проводимых у новорожденных с подозрением на неонатальный сепсис. Однако необходимо отметить, что в настоящее время технология ПЦР-РВ не устраняет необходимость проведения посева крови, так как чистые культуры изолированных бактерий все еще необходимы для определения их чувствительности к антимикробным препаратам.

С другой стороны, объединение ПЦР-РВ, основанного на выявлении в образцах крови консервативной области гена, кодирующего 16S рРНК бактерий, с методом быстрого определения и анализа последовательности нуклеотидов, накапливающихся при амплификации (метод пиросеквенирования), позволит менее чем за 8 часов обеспечить врача такой важной информацией, как таксономическая принадлежность обнаруживаемых бактерий. Последняя поможет врачу выбрать антибактериальный препарат для лечения инфицированного ребенка или, напротив, позволит предотвратить необоснованное использование антибиотиков у неинфицированных детей.

Таким образом, внедрение молекулярных методов для быстрой диагностики септических состояний у детей будет способствовать уменьшению риска возникновения и распространения бактериальных штаммов с лекарственной резистентностью, а также предотвратит возникновение побочных эффектов, связанных с использованием антибиотиков [33].

Результаты проведенных к настоящему времени исследований позволили также выявить и основные проблемы, возникающие при использовании метода ПЦР для диагностики неонатальных септических состояний, решение которых должно повысить уровень аналитической чувствительности метода.

По сравнению с традиционным методом культивирования крови наибольшие трудности при использовании техники ПЦР возникают при выявлении грамположительных кокковидных бактерий, что указывает на необходимость внесения изменений в стандартные протоколы подготовки проб.

Важнейшим условием для достижения адекватной чувствительности молекулярных методов является эффектив-

ный лизис бактериальных клеток для высвобождения ДНК. Специфическое строение клеточной стенки грамположительных бактерий затрудняет их лизис. Возможно, включение в протокол подготовки проб дополнительных этапов ферментативной обработки с использованием недавно предложенных и отличающихся более широким спектром литической активности по сравнению со стандартно применяющимся лизоцимом ферментов лабиазы или ахромопептидазы позволит более эффективно получать препараты ДНК из грамположительных бактерий [34, 35]. Кроме того, несмотря на то, что использование клеточных лизатов без их дополнительной обработки не вызывает существенного ингибирования ПЦР, целесообразно также усовершенствовать и такие этапы стандартных протоколов, как экстракция и концентрирование ДНК. Для этой цели ДНК из лизатов цельной крови может быть извлечена ручными (специальные сорбирующие колонки) или уже существующими автоматизированными методами. Необходимо также учитывать, что нуклеиновые кислоты, выделенные из клинического материала, в частности из цельной крови, содержат не только возможную бактериальную, но и геномную лейкоцитарную ДНК. Человеческая ДНК обычно присутствует в исследуемой пробе в гораздо более высокой концентрации, чем бактериальная, что создает для нее конкурентное преимущество при связывании на экстрагирующих колонках. Как уже было упомянуто ранее, в одном из исследований было показано, что ДНК, содержащаяся в образцах цельной крови, собранной от новорожденных с повышенным числом лейкоцитов крови (более или равно  $39,0 \times 10^9/\text{л}$ ), конкурировала с экзогенно добавленной бактериальной ДНК при связывании на колонках Qiagen, что приводило к ложноотрицательному результату в ПЦР-исследовании.

Таким образом, на сегодняшний день можно констатировать, что основные проблемы, встречающиеся на пути создания тест-систем, основанных на использовании ПЦР, и широкого внедрения этой технологии в практику клинической диагностики бактериальных септических состояний у новорожденных, в основном определены и могут быть преодолены.

Фактически, предпринятые недавно попытки улучшения чувствительности молекулярных исследований (использование улучшенных методов очистки ДНК и применение для тестирования образцов технологии ПЦР-РВ) дали обнадеживающие результаты. Однако прежде чем этот подход можно будет рекомендовать для широкого внедрения, его эффективность необходимо проверить большим количеством исследований.

Внедрение методов диагностики, основанных на ПЦР, для обнаружения бактериальной контаминации других анатомических областей организма ребенка не встречает таких сложностей, как исследование крови или цереброспинальной жидкости. Это связано с тем, что при инфекционных состояниях патологическая контаминация таких часто исследуемых источников патогенных бактерий, как слизистые оболочки ротовой полости и носоглотки, кожи, слухового канала, желудочного содержимого или трахеального секрета, получаемых в виде аспиратов, а также мочи или испражнений, обычно достигает высоких значений. Кроме того, объемы клинического материала, получаемые из этих источников, при правильной методике его забора составляют достаточное для проведения ПЦР количество.

Так, группой S.M.Paule et al. (2004) была разработана тест-система, основанная на технологии ПЦР-РВ, для обнаружения колонизации носовой полости новорожденных золотистыми стафилококками. Носительство *S. aureus* в носовой полости считается источником поддержания и распространения внутрибольничной инфекции. Таким образом, использование ПЦР-РВ для быстрого выявления этих микроорганизмов имеет значительный потенциал. В этом исследовании парные носовые тампоны были собраны от 299 новорожденных, находившихся в условиях стационара. Один мазок был использован для бактериологического, другой – для ПЦР-исследования. Предварительная обработка полученного образца для ПЦР-исследования включала лизис бактерий при помощи фермента ахромопептидазы. Анализ полученных результатов показал, что чувствительность, специфичность, положительные и отрицательные значения прогностической ценности для культурального и метода ПЦР составили 92 против 96%, 100 против 100%, 100 против 100% и 98 против 99% соответственно. Причем время, затраченное на определение *S. aureus* путем использования метода ПЦР-РВ, составило всего 2 часа, в то время как на проведение диагностики при помощи традиционного бактериологического метода потребовалось от 1 до 4 дней.

Таким образом, к настоящему времени внедрение новых методов диагностики, основанных на молекулярных технологиях, уже привело к изменению способов выявления инфекционных заболеваний, вызываемых, прежде всего, вирусами. Также в течение последнего десятилетия неуклонно увеличивалось число диагностических тестов, применяющихся в клинической бактериологии. Несмотря на то, что использование методов выявления и идентификации наиболее важных патогенных микроорганизмов бактериальной и вирусной природы, основанных на использовании массива молекулярных технологий, становится сегодня обычным направлением в лабораторной практике, в ближайшем будущем классические микробиологические методы не будут полностью вытеснены. Это связано с несколькими причинами, основными из которых являются необходимость улучшения техники выделения и очистки нуклеиновых кислот микроорганизмов из проб биологического материала, а также необходимость получения чистых культур бактерий для определения спектра их чувствительности к антибиотикам. С другой стороны, результаты проводимых в настоящее время исследований, посвященных преодолению этих проблем, позволяют надеяться, что методы молекулярной микробиологии в еще большей степени будут приближены к обычной клинической лаборатории.

## Литература

1. Барашнев Ю.И. Перинатальная неврология. М.: Триада-Х, 2001; 640.
2. Osrin D., Vergnano S., Costello A. Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Curr Opin Infect Dis.* 2004; 17(3): 217–24.
3. Jeffery H.E., Lahra M.M. The Impact of Infection During Pregnancy on the Mother and Baby. In: *Fetal and Neonatal Pathology* Keeling J.W., Khong T.Y. (eds.). 2007; 4th ed.: 379–423.
4. Weile J., Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 731–42.

5. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; (155): 335.
6. Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986; (51): 263.
7. Embury S.H., Scharf S.J., Saiki R.K., et al. Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. *N Engl J Med* 1987; (316): 656.
8. Jackson J.B., Kwok S.Y., Sninsky J.J. Human immunodeficiency virus type 1 detected in all seropositive symptomatic and asymptomatic individuals. *J Clin Microbiol* 1990; (28): 16–9.
9. Меджидова М.Г., Адуева С.М., Федорова Н.Е. и др. Выявление маркеров вирусов простого герпеса и цитомегалии у новорожденных и детей раннего возраста. *Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 5: 74–81
10. Павлова М.В., Адуева С.М., Федорова Н.Е. и др. Алгоритм вирусологического лабораторного обследования недоношенных новорожденных детей с врожденной цитомегаловирусной инфекцией в течение первого года жизни и влияние терапии Вифероном на исход внутриутробной инфекции. *Педиатрия* 2009; 87(2): 55–62.
11. Calderaro A., Piccolo G., Gorrini C. Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed* 2006; 77: 75–80.
12. Sison A.V., Campos J.M. Laboratory Methods for Early Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Newborns and Infants *Clinical Microbiology Reviews* 1992; 5(3): 238–47.
13. Barenfanger J., Drake C., Leon N., Mueller T., Trout T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol* 2000; (38): 2824–8.
14. Nolte F.S., Caliendo A.M. Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray P.R. (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> edn., American Society for Microbiology, Washington DC. 2003; 236–43.
15. Pol A.C., Wolfs T.F.W., Rossen J.W.A., et al. Diagnostic value of real-time polymerase chain reaction to detect viruses in young children admitted to the pediatric intensive care unit with lower respiratory tract infection *Critical Care* 2006; 10(2): 1–7.
16. Kimberlin D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 2004; 11(Suppl 2): 65A–76A.
17. Jordan J.A., Durso M.B. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis. *J of Molecular Diagnostics* 2005; 7(5): 575–81.
18. Archimbaud C., Chambon M., Bailly J.L. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009; 81(1): 42–8.
19. Nozawa N., Koyano S., Yamamoto Y., et al. Real-Time PCR Assay Using Specimens on Filter Disks as a Template for Detection of Cytomegalovirus in Urine. *J of Clinical Microbiology* 2007; 45(4): 1305–7.
20. Pawlotsky J.M. Virologic techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 56–63.
21. Harris K.A., Hartley J.C. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J of Medical Microbiology* 2003; 52: 685–91.
22. Jordan J.A., Durso M.B. Butchko A.R. Evaluating the Near-Term Infant for Early Onset Sepsis Progress and Challenges to Consider with 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Testing. *J of Molecular Diagnostics* 2006; 8(3): 357–63.
23. Ohlin A., Backman A., Bjorkqvist M., et al. Real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal bacteraemia. *Acta Paediatrica* 2008; 97: 1376–80.
24. Kaufman D., Fairchild K.D. Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17(3): 638–80.
25. Bergseng H., Bevanger L., Rygg M. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B streptococcus colonization in pregnant women at delivery. *J of Medical Microbiology* 2007; 56: 223–8.
26. Yagupsky P., Nolte F.S. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol* 1990; 3: 269–79.
27. Kellogg J.A., Manzella J.P., Bankert D.A. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2181–5.
28. Laforgia N., Coppola B., Carbone R., et al. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr* 1997; 86: 1097–9.
29. Reier-Nilsen T., Farstad T., Nakstad B., et al. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatrics* 2009; 9(5): 1–8.
30. Dierkes C., Ehrenstein B., Siebig S., et al. Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infectious Diseases* 2009; 9(126): 1–7.
31. Kurlat I., Stoll B.J., Mc Gowan J.E.J. Time to positivity for detection of bacteremia in neonates. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1068–71.
32. Jordan J.A., Durso M.B. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2574–8.
33. Ruimy R., Dos-Santos M., Raskine L., Bert F., et al. Accuracy and Potential Usefulness of Triplex Real-Time PCR for Improving Antibiotic Treatment of Patients with Blood Cultures Showing Clustered Gram-Positive Cocci on Direct Smears. *J of Clinical Microbiology* 2008; 46(6): 2045–51.
34. Niwa T., Kawamura Y., Katagiri Y., et al. Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA. *J Microbiol Methods* 2005; 61(2): 251–60.
35. Oana K., Kawakami Y., Hayashi T., et al. Simple broad-spectrum protocol using labiase for bacterial cell lysis to prepare genomic DNA for pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Microbiol Immunol* 2009; 53(1): 45–8.
36. Paule S.M., Pasquariello A.C., Hacek D.M. Direct Detection of *Staphylococcus aureus* from Adult and Neonate Nasal Swab Specimens Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J of Molecular Diagnostics* 2004; 6(3): 191–6.

---

**Информация о соавторах:**

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

Дегтярева Лидия Андреевна, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии Российского государственного медицинского университета  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
 Телефон: (495) 434-1766

Кафарская Людмила Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии Российского государственного медицинского университета  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
 Телефон: (495) 434-1766

Шкопоров Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии и биобезопасности Российского государственного медицинского университета  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
 Телефон: (495) 434-1766

Хохлова Екатерина Викторовна, научный сотрудник лаборатории микробиологии и биобезопасности Российского государственного медицинского университета  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
 Телефон: (495) 434-1766

Шуникова Мария Леонтьевна, аспирант кафедры неонатологии ФУВ Российского государственного медицинского университета  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
 Телефон: (495) 434-1766

Чаплин Андрей Викторович, студент медико-биологического факультета Российского государственного медицинского университета  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
 Телефон: (495) 434-1766