



Современные молекулярно-генетические методы идентификации возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы

КИБИРЕВ Я.А., майор медицинской службы
ИСУПОВ С.Г., майор медицинской службы
ЧУХЛАНЦЕВ Д.А., подполковник медицинской службы

Научно-исследовательский центр 33 ЦНИИ Минобороны России, г. Киров

В статье представлен обзор современных молекулярно-генетических методов идентификации патогенных бактерий. Одним из основных в настоящее время является метод полимеразной цепной реакции и его модификации. Для регистрации результатов ПЦР-анализа используется метод электрофореза. Показаны преимущества использования флуоресцентной метки в режиме реального времени (количественная ПЦР, *Quantitative PCR*, *Q-PCR*, *Real-Time PCR*) и *Flash* ПЦР. *Real-Time PCR* позволяет осуществлять количественный анализ исследуемой пробы и сокращает время анализа. Упрощенный вариант ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала — ПЦР в формате *Flash*. Помимо ПЦР, существуют и другие методы, основанные на амплификации ДНК, в частности лигазная цепная реакция. Рассмотрены сложные методы идентификации патогенных бактерий — мультилокусное сиквенс-типирование, анализ переменных нуклеотидных тандемных повторов. Одним из наиболее удобных методов полной идентификации патогенных бактерий может стать секвенирование генома бактерий.

К л ю ч е в ы е с л о в а: возбудители инфекционных заболеваний, идентификация патогенных бактерий, молекулярно-генетические методы

Kibirev Ya.A., Isupov S.G., Chukhlantsev D.A. — Molecular genetic methods of identification of infectious bacterial agents. The paper presents an overview of modern molecular genetic methods for identification of pathogenic bacteria. One of the main current methods is the polymerase chain reaction and its modifications. Agarose gel electrophoresis is used for PCR analysis. The authors presented the advantages of the real-time fluorescent tag on this stage (quantitative PCR, Quantitative PCR, Q-PCR, Real-Time PCR) and Flash PCR. Real-Time PCR permits quantitative analysis of a test sample and reduces analysis time. Simplified version of the PCR detection of the fluorescent signal is Flash PCR. In addition to PCR, there are other methods based on the amplification of DNA, in particular, the ligase chain reaction. Considered sophisticated methods of identification of pathogenic bacteria — multilocus sequence typing, the analysis of variable nucleotide tandem repeats. One of the most convenient methods for the complete identification of pathogenic bacteria can be sequenced bacterial genome.

К е y w o r d s: infectious agents, identification of pathogenic bacteria, molecular genetic methods.

Идентификация возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы с минимальными затратами времени и сил — одна из основных задач биологической защиты войск и населения Российской Федерации. Это особенно актуально в связи с усилением угрозы возникновения и распространения опасных и особо опасных инфекций, связанной с неблагоприятной эпидемической ситуацией в мире, наличием стойких природных очагов опасных и особо опасных инфекций на территории

Российской Федерации и сопредельных государств, а также функционированием биологически опасных объектов. Решение данной задачи непосредственно зависит от наличия соответствующих доступных и эффективных методов выявления патогенных бактерий.

Для идентификации микроорганизмов используется целый комплекс молекулярно-генетических методов. Глубина анализа определяется только возможностью и/или целесообразностью привлечения для его проведения дополнитель-



ных сил и средств и затраченным на всесторонний анализ временем. В процессе идентификации на основании генетических особенностей бактерий устанавливается их видовая принадлежность, наличие или отсутствие генетических основ патогенности. Возможно установление первоначального источника, из которого произошло заражение, эпидемической значимости патогенных бактерий и т. д.

Исследования с помощью молекулярно-генетических методов отличаются длительностью, требуют для анализа чистой культуры микроорганизмов и выполняются высококвалифицированным персоналом на современном дорогостоящем оборудовании. Такие работы могут быть выполнены только на базе специализированных лабораторий и направлены в основном на углубленное научное исследование патогенных микроорганизмов.

Выявленные особенности патогенных бактерий используются для разработки простых в применении наборов реагентов, основанных на амплификации (увеличении числа копий) определенного фрагмента ДНК бактерии. Такие наборы реагентов позволяют получить специфическую информацию, достаточную для выявления (индикации) патогенных бактерий в пробе и их начальной идентификации без использования сложных и дорогостоящих методов исследования. Для проведения анализа с их помощью достаточно обученного оператора и минимально оборудованной лаборатории.

С 90-х годов прошлого века и до настоящего времени основной практический способ амплификации ДНК, обеспечивающий индикацию с начальной идентификацией, связан с использованием *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). Она основана на прямом выявлении нуклеотидных последовательностей микроорганизмов, не требует выделения чистой микробной культуры, позволяет выявлять нежизнеспособные и мертвые, а также фенотипически измененные формы микроорганизмов.

Метод ПЦР с некоторыми отступлениями имитирует естественный процесс копирования ДНК в клетке с участием специального фермента *Taq-полимеразы*

и отдельных элементов ДНК — нуклеотидов, необходимых для построения новой ДНК. Кардинальным отличием является ограниченное копирование, т. е. копируется не вся ДНК бактерии, а только ее определенная часть. Достигается это путем выбора и искусственного синтеза коротких участков ДНК — праймеров. Праймеры выбираются таким образом, что «узнают» ДНК только определенного вида бактерий даже в присутствии ДНК других организмов. Еще одно отличие от естественного процесса — многократное копирование одного участка ДНК в ходе реакции. Это обеспечивается благодаря использованию фермента термостабильной *Taq-полимеразы* и быстрой сменой температуры реакционной смеси в виде циклов, что делает необходимым использование специализированного программируемого термостата — амплификатора.

Итогом ПЦР является увеличение количества вновь синтезированных нитей ДНК в геометрической прогрессии с каждым завершаемым температурным циклом, что в течение 1–3 ч (в зависимости от условий реакции) приводит к накоплению в реакционной смеси огромного количества специфических (характерных только для этого вида бактерий) нитей ДНК.

Регистрацию результатов ПЦР-анализа в классическом варианте проводят с помощью метода электрофореза в агарозном геле. В специальные лунки последнего вносится реакционная смесь после проведения ПЦР. Короткие цепи ДНК, содержащиеся в реакционной смеси, движутся внутри геля под действием электрического тока, формируя отдельные полосы (скорость движения цепей ДНК в геле зависит от их размера, поэтому цепи ДНК разного размера образуют в геле отдельные полосы). Увидеть сформированные в процессе электрофореза полосы ДНК позволяет добавление в буферный раствор для электрофореза различных флуоресцирующих веществ, способных соединяться с ДНК. При просмотре агарозного геля в специальных приборах полосы ДНК, содержащие большое количество флуоресцирующих веществ, ярко светятся.



Для повышения точности и информативности ПЦР в некоторых случаях могут использоваться различные модификации этого метода. В частности, при подборе соответствующей комбинации олигонуклеотидных праймеров возможно одномоментное, в ходе одной реакции выявление нескольких генетических детерминант, что позволяет расширить объем получаемой информации, например определить вид микроорганизма и одновременно оценить его эпидемическую значимость.

При невозможности обеспечить требуемый уровень специфичности возможно проведение так называемой гнездовой ПЦР, в которой последовательно используют две пары праймеров. При этом сначала первой парой праймеров копируется более протяженный участок гена, после чего второй парой праймеров копируется участок гена, расположенный внутри ранее амплифицированной последовательности ДНК.

Несмотря на относительную простоту и универсальность метода, наличие отдельного этапа регистрации результатов ПЦР увеличивает общее время анализа и требует большего количества выполняемых оператором действий. Это повышает вероятность ошибки оператора и, что важнее, значительно повышает риск контаминации оборудования и помещения продуктами амплификации из-за необходимости переноса реакционной смеси из пробирок в агарозный гель, что в дальнейшем может привести к появлению ложноположительных результатов.

Эти недостатки классической ПЦР были устранены путем использования для регистрации результатов ПЦР флуоресцентной метки. Такой способ регистрации результатов используется в ПЦР в режиме реального времени (количественная ПЦР, *Quantitative PCR*, *Q-PCR*, *Real-Time PCR*) и *Flash* ПЦР.

Примером *Real-Time PCR* может служить техника «*taq-man*» *Real-Time PCR*, когда в реакционную смесь вводят третий праймер — зонд, к концам которого ковалентно присоединены молекулы источника и гасителя флуоресценции. В обычном состоянии молекулы источника и гасителя флуоресценции на кон-

цах этого зонда располагаются вблизи друг друга, и флуоресценции не наблюдается. Во время ПЦР праймеры и зонд присоединяются к ДНК, а фермент *Taq*-полимераза расщепляет зонд, находящийся на пути синтеза новой цепи ДНК. Молекулы гасителя и источника флуоресценции при этом освобождаются, и становится возможной регистрация флуоресцентного сигнала. С каждым новым циклом ПЦР освобождаются новые молекулы флуорофора, что приводит к усилению флуоресцентного свечения в реакционной смеси в геометрической прогрессии. Такая модификация ПЦР позволяет регистрировать флуоресцентный сигнал непосредственно в пробирке после окончания каждого цикла *Real-Time PCR*. Единственными условиями для проведения *Real-Time PCR* являются наличие специализированных тест-систем и специального прибора — амплификатора, совмещенного с флуориметром.

Использование этого прибора для амплификации и регистрации результатов позволяет осуществлять количественный анализ исследуемой пробы, сокращает время анализа, снижает вероятность ошибки оператора и практически исключает риск контаминации оборудования и помещения продуктами амплификации.

Упрощенный вариант ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала — ПЦР в формате *Flash*. В этом случае амплификация осуществляется на амплификаторе, а детекция результатов ПЦР производится на специализированном флуоресцентном детекторе. При этом теряется возможность количественного учета результатов ПЦР, но также сокращается время анализа, снижается вероятность ошибки оператора и риск контаминации оборудования и помещения продуктами амплификации, а также значительно снижается стоимость оборудования.

Помимо ПЦР, существуют и другие методы, основанные на амплификации ДНК, в частности *лигазная цепная реакция* (ЛЦР, *LCR* — *Ligase chain reaction*). Данный метод основан на последовательных циклах лигирования (соединения) в присутствии фермента ДНК-лигазы олигонуклеотидных зондов. Зонды — ко-



роткие цепи ДНК, синтезированные искусственно, — подбираются таким образом, чтобы присоединяться к одной и той же цепи ДНК-матрицы встык друг с другом. Любое нарушение гомологии (сродства) зондов с матричной цепью ДНК в области их соединения сразу же предотвращает лигирование.

Существуют различные модификации ЛЦР, в частности ЛЦР с заполнением бреши, в ходе которой праймеры гибридизуются (соединяются) с ДНК-матрицей на некотором расстоянии друг от друга. Образующаяся брешь застраивается с помощью фермента ДНК-полимеразы, а затем фермент ДНК-лигаза осуществляет лигирование полученных цепочек ДНК в месте стыка.

Особый интерес представляют реакции амплификации, протекающие в изотермических условиях: амплификация с вытеснением цепи, технология циклирующей пробы, самоподдерживающаяся репликация и т. д. При их проведении не требуется циклическая смена температур, что позволяет отказаться от использования дорогостоящих амплификаторов, заменив их простыми термостатами. Реализация методов ПЦР, протекающих в изотермических условиях, более сложна по сравнению с обычной ПЦР или ЛЦР, но в конечном итоге оператор так же получает готовый к использованию набор реагентов, использование которого не представляет трудности для подготовленного оператора.

Все упомянутые молекулярно-генетические методы выявления патогенных бактерий основаны на накоплении в ходе реакции определенного продукта — специфического (уникального) фрагмента ДНК. Они могут применяться как в лабораторных, так и в полевых условиях силами специально подготовленных операторов. Для проведения ПЦР необходимо предварительное выделение всей ДНК, содержащейся в пробе, и ее очистка, поскольку зачастую содержащиеся в пробе некоторые вещества ингибируют работу ферментов, необходимых для осуществления реакции.

В отличие от изложенных способов амплификации ДНК, метод гибридизации с использованием *разветвленных зон-*

дов (bDNA — *branch DNA*) основан на амплификации получаемого сигнала. В результате ряда манипуляций к целевому гену патогенной бактерии (без его копирования) присоединяется зонд, с которым ковалентно сшиты несколько флуоресцентных или ферментативных меток. В результате на каждую молекулу целевого бактериального гена приходится по несколько молекул метки и таким образом происходит многократное усиление сигнала, регистрируемого тем или иным способом в ходе исследования.

Аналогичная методика используется при разработке ДНК-чипов. Последние основаны на гибридизации (связывании) неизвестной ДНК с расположенными в определенном порядке известными ДНК-последовательностями (зондами), фиксированными на поверхности стекла или кремния. Результат детектируется по флуоресценции зонда, предварительно меченого флуорофором и гибридизованного с одной из иммобилизованных проб.

Как упоминалось выше, сложные методы идентификации патогенных бактерий используются в основном в углубленных исследованиях патогенных микроорганизмов при проведении научно-исследовательских работ. Большинство из них преследуют узкие цели и не используются на практике для исследования патогенных бактерий в конкретных пробах.

К числу сложных методов идентификации патогенных бактерий следует отнести МЛСТ (мультилокусное сиквенс-типирование) и ВНТП-анализ (анализ переменных нуклеотидных тандемных повторов). Вероятно, в ближайшем будущем войдет в практику определение последовательности всего генома патогенных бактерий или группы целевых генов. В сети Интернет созданы и постоянно пополняются общедоступные базы данных, содержащие уникальные характеристики различных микроорганизмов. Сравнение получаемых данных позволяет сделать определенные выводы об особенностях выявленных патогенных бактерий.

Для проведения анализа бактерий с помощью указанных методов в исследуемой пробе должен присутствовать только один вид бактерий, т. е. требуется выделение чистых культур микроорганизмов.



Метод МЛСТ основан на прямом установлении нуклеотидной последовательности фрагментов нескольких определенных генов. МЛСТ включает в себя этапы амплификации выбранных фрагментов генов методом ПЦР, их секвенирования (установления последовательности) с помощью прибора — автоматического секвенатора и сравнение полученных данных с помощью специальных программ с соответствующими генами в международной базе данных.

ВНТП-анализ основан на определении длины ВНТП-локусов — участков ДНК, состоящих из коротких повторяющихся нуклеотидных отрезков. Таких локусов в геноме бактерий может быть несколько десятков, а их длина может изменяться в зависимости от разных условий их существования. Исследование включает этапы амплификации переменных tandemных повторов методом ПЦР, определения размера полученных фрагментов ДНК и сравнения с помощью специальных программ полученных данных с соответствующими генами из международной базы данных.

МЛСТ и ВНТП-анализ позволяют осуществлять эпидемиологический анализ выявленных патогенных бактерий.

Одним из наиболее удобных методов полной идентификации патогенных бактерий может стать секвенирование генома бактерий. До недавнего времени

секвенирование ДНК представляло собой длительную, сложную и дорогостоящую задачу. Однако совершенствование технологий секвенирования и снижение стоимости исследований позволяют рассматривать прямое определение нуклеотидной последовательности в качестве реального метода идентификации патогенных бактерий. Необходимым элементом в этом случае является формирование общедоступной базы последовательностей геномов различных бактерий и установление функций основных генов, определяющих их патогенные свойства.

Материалы данной статьи лишь в небольшой степени раскрывают возможности молекулярной генетики в вопросах выявления и исследования бактериальных патогенов. Молекулярно-генетические методы постоянно развиваются, совершенствуется техническая составляющая исследований, повышается уровень автоматизации, отмечается тенденция к миниатюризации оборудования, а также проведению нескольких анализов в ходе одного исследования (микрочиповые технологии). Кроме того, по мере изучения бактерий формируются более полные базы данных, позволяющие как унифицировать проведение анализа, так и идентифицировать все большее число видов и штаммов возбудителей инфекционных заболеваний.