

А.А.Приймак, М.А.Владимирский, Л.К.Шипина, А.Н.Калюк, Т.С.Денисова,
Б.С.Народицкий, М.В.Калинина

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ — БЫСТРЫЙ И ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ

Московский НИИ туберкулеза Минздрава РФ, ВНИИ сельхозбиотехнологии РАСХН

POLYMERASE CHAIN REACTION AS A FAST AND HIGH SENSIBLE METHOD TO DISCOVER THE TUBERCULOSIS AGENT IN BIOLOGICAL MATERIALS

A.A.Priymack, M.A.Vladimirskiy, L.K.Shipina, A.N.Kaliuck, T.S.Denisova, B.S.Naroditskiy, M.V.Kalinina

Summary

The efficacy of polymerase chain reaction (PCR) for *M.tuberculosis* detection in biological materials was studied. Sputum and biological fluids were investigated in 106 patients with tuberculosis and non-specific pulmonary diseases. The observed specific and great PCR sensitivity was two times greater than the sensitivity of bacteriological culture in solid media.

A kit of reagents for rapid *M.tuberculosis* detection by PCR-technique has been developed.

It was shown that the improving and simplifying possibility of PCR technology by magnetic immunosorbent use allows to perform PCR without DNA isolation and keep the method sensitivity.

Резюме

Изучена эффективность применения метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения микобактерий туберкулеза в биологических материалах. При исследовании мокроты и других жидкостей от 106 больных туберкулезом и неспецифическими заболеваниями легких была показана специфичность и высокая чувствительность метода ПЦР, вдвое превышающая чувствительность бактериологических посевов на плотные питательные среды.

Разработан отечественный набор реагентов для быстрого выявления возбудителя туберкулеза методом ПЦР.

Показана возможность усовершенствования и упрощения технологии ПЦР путем использования магнитного иммуносорбента, что позволило проводить ПЦР без выделения ДНК при сохранении чувствительности анализа.

Проблема своевременной и надежной диагностики туберкулеза в настоящее время приобретает немалую остроту. Это связано в первую очередь с уменьшением объема рентгенофлюорографических обследований в целях активного выявления больных туберкулезом.

Обнаружение микобактерий туберкулеза (МБТ) в биологических материалах (мокрота, моча, экссудат, спинномозговая жидкость, промывные воды бронхов) является, как известно, одним из основных критериев диагностики туберкулеза.

Однако традиционные микробиологические методы определения возбудителя туберкулеза малоэффективны. Бактериологическое исследование методом посева на плотные питательные среды чрезвычайно длительно (1—2 мес), а быстрая техника обнаружения МБТ в мазках при использовании люминесцентной микроскопии малочувствительна, т.к. позволяет выявить МБТ лишь при их концентрации более 1000 клеток в 1 мл мокроты. Чувствительность же столь длитель-

ного по времени метода посевов также невелика, составляя 100—1000 бактериальных клеток в 1 мл мокроты. В связи с этим возбудитель туберкулеза выявляется лишь у 50—60% больных активным туберкулезом легких.

Открытие и реализация в середине 80-х годов принципа умножения фрагментов ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7] положили начало бурному развитию этой технологии в диагностике различных инфекционных возбудителей [8].

Принцип метода ПЦР состоит в многократно повторяемом синтезе специфических нуклеотидных последовательностей ДНК. Начало синтеза одонитчатой цепи ДНК (разъединение цепей происходит при денатурации нагреванием до 90—94°C) осуществляется после прилипания (отжиг) специфических затравочных олигонуклеотидов — праймеров (50—60°C). Синтез цепи ДНК происходит с помощью термостабильной ДНК-полимеразы при температуре 72°C.

Таким образом, температурно-управляемый синтез специфических, определенного размера фрагментов ДНК идет циклично, позволяя их копировать на матрице вновь синтезированной цепи в геометрической прогрессии (2,4,8,16 и т.д.) до миллионов копий (30—40 циклов) в течение нескольких часов.

Умножение (амплификация) фрагментов ДНК осуществляют в специальном циклотермостате (ДНК-амплификатор) для микропробирок, который обеспечивает проведение реакции по заданной программе.

Результаты ПЦР анализируют после проведения агарозного гельэлектрофореза в плоском геле в течение 30—40 мин. Гель окрашивают бромистым этидием и полосы визуализируют с последующим фотографированием с помощью ультрафиолетового подсвечивания в трансиллюминаторе.

Положительный результат оценивают по расстоянию пробега визуализированной полосы, соответствующему полосе положительного контроля, что свидетельствует о синтезе фрагмента ДНК, равного по размеру положительному контролю.

Использование ПЦР позволяет определять инфекционный агент непосредственно в биологическом материале с исключительно высокой чувствительностью — порядка 1—10 микроорганизмов или вирусных частиц при высокой специфичности, обеспечиваемой последовательностью нуклеотидов синтезируемого фрагмента ДНК. Исходный материал для ПЦР может быть получен из любой ткани или жидкости, которые могут быть обеззаражены фенолом или нагреванием, а также храниться неограниченно долго, что не влияет на результаты исследования.

В нескольких опубликованных в последние годы работах были описаны нуклеотидные последовательности генов, кодирующих специфические белки микобактерий туберкулезного комплекса. На этой основе были синтезированы специфические олигонуклеотиды (праймеры), обеспечивающие начало синтеза соответствующих фрагментов ДНК микобактерий и проведение ПЦР. Была установлена высокая специфичность определения микобактерий туберкулеза методом ПЦР и чувствительность анализа [1—3,6,9], в том числе при исследовании клинических образцов, превышающая культуральный метод исследования.

Использование праймеров для синтеза повторяющихся в ДНК микобактерий туберкулеза участков [4,5] обеспечивает еще большую чувствительность анализа — до 0,1 pg ДНК, т.е. до 1 микроорганизма.

Как правило, проведению ПЦР предшествует стадия выделения и преципитации ДНК из исследуемого материала. Это обеспечивает концентрирование обнаруживаемой ДНК инфекционного агента в минимальном объеме жидкости, используемой в ПЦР. В случаях, когда не требуется достижения высокой чувствительности анализа, например, при идентификации микобактерий после первичного культивирования, достаточна их обработка, позволяющая лишь разрушить микробную стенку: нагревание в лизирующем буфере, ультразвуковая обработка или использование ферментов (лизоцим) без последующего выделения ДНК.

Нашей задачей явилась разработка отечественного набора реагентов для определения МБТ методом ПЦР, испытание его специфичности и чувствительности, проведение клинических испытаний. Кроме того, существенным для перспективы передачи этой технологии в практические лаборатории является поиск технологических упрощений метода ПЦР при исследовании биологических материалов.

Изучение специфичности ПЦР было проведено при исследовании 38 штаммов микобактерий с помощью двух пар праймеров. 1-я пара — праймеры, специфичные в отношении фрагмента ДНК 418 н.п. — участка гена, кодирующего иммунодоминантный белок 38 кД *M.tuberculosis* [9]. 2-я пара праймеров служит для синтеза фрагмента ДНК в 240 н.п. — участка гена, кодирующего иммуногенный белок МРВ64 [6]. Бактериальную массу подвергали обработке ультразвуком при 50°C в трис-буфере (рН 8,0) и надосадочную жидкость после центрифугирования непосредственно использовали для проведения ПЦР.

Результаты проверки специфичности анализа представлены в табл.1.

Как следует из этих данных, все штаммы, принадлежащие к микобактериям туберкулезного комплекса (*M.tuberculosis* и *M.bovis*), давали положительную реакцию в ПЦР, в том числе 23 клинических изолята микобактерий туберкулеза человеческого вида. В то же время штаммы 10 атипичных видов микобактерий,

Т а б л и ц а 1

Специфичность полимеразной цепной реакции при исследовании различных штаммов микобактерий и неспецифической флоры

№ п/п	Наименование штаммов	Результаты реакции
1.	<i>M.tuberculosis</i> H37Rv	+
2.	<i>M.bovinus</i> — 8	+
3.	<i>M.bovis</i> (BCG)	+
4—26.	Клинические штаммы*, полученные от больных туберкулезом	+
27.	<i>M.intracellularae</i> # 23	—
28.	<i>M.scrofulaceum</i> N 526	—
29.	<i>M.smegmatis</i> ATCC # 607	—
30.	<i>M.kansasii</i> # 30	—
31.	<i>M.marinum</i> TMC 1218	—
32.	<i>M.simiae</i> N 29	—
33.	<i>M.gordonae</i> TMC 1324	—
34.	<i>M.avium</i> # 10	—
35.	<i>M.xenopi</i> AS TMC # 1480	—
36.	<i>M.fortuitum</i> # 389 N 122	—
37.	<i>Staph.aureus</i> ATCC 25923	—
38.	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	—

П р и м е ч а н и е. * — типирование штаммов по ниациновому и нитратредуктазному тесту подтвердило их принадлежность к человеческому виду микобактерий.

Т а б л и ц а 2

Эффективность метода ПЦР при определении
туберкулезного возбудителя в клинических материалах

Диагноз	Число больных	Число положительных результатов определения МБТ	
		Бактериологический метод (посевы)	ПЦР
Активный туберкулез легких	59	11	23
Неактивный туберкулез легких	9	—	1
Туберкулезный менингит	1	—	1
Экссудативный плеврит туберкулезной этиологии	2	—	1
Пневмония	13	—	1
Хронический бронхит	7	—	—
Рак легких	8	—	1
Саркоидоз	7	—	4

а также *S.aureus* и *Candida albicans* имели отрицательную реакцию. Таким образом, в данной серии экспериментов была подтверждена 100% специфичность метода ПЦР.

При исследовании разведенных суспензий МБТ, а также материалов, полученных от пациентов (мокрота, моча, плевральный экссудат, спинномозговая жидкость), осадки обрабатывали нагреванием в лизирующем буфере с 0,5% додецилсульфата натрия и затем выделяли ДНК с помощью фенол-хлороформенных экстракций с последующим осаждением ДНК спиртом. Для более эффективного осаждения ДНК использовали транспортную РНК.

Использование 2-й пары праймеров (МПВ-64) выявило более высокую чувствительность анализа, что позволило получить положительные результаты при исследовании суспензии МБТ в концентрации 10 кл/мл, тогда как посевы на плотную питательную среду Левенштейна давали рост в 2—3 колонии лишь при концентрации 100 кл/мл.

Клинические испытания метода ПЦР проведены на материалах, полученных от 106 больных. Среди них 71 больной туберкулезом легких и 28 больных неспецифическими заболеваниями легких (табл.2) [2] и 7 больных саркоидозом легких.

Мокрота больных туберкулезом и неспецифическими заболеваниями легких исследовалась из одной пробы одновременно тремя методами: посев для выявления МБТ, люминесцентная микроскопия мазка, изучение с помощью ПЦР. Из 59 больных активным туберкулезом легких у 45 был инфильтративный туберкулез; в 1 случае — диссеминированная форма, у 5 больных — фиброзно-кавернозный туберкулез; у 8 — туберкулемы и очаговый туберкулез легких. Большая часть больных к моменту исследования лечилась в стационаре в течение 2—4 мес. (42 пациента) или 4—6 мес. (10 пациентов).

Бактериологическое исследование мокроты выявило 11 положительных определений МБТ, тогда как методом ПЦР было установлено 23 положительных определения. 12 дополнительных находок МБТ были получены у больных инфильтративным туберкулезом легких органической протяженности, в том числе у 10 больных через 2—4 мес. химиотерапии, когда по данным бактериологического исследования бактериовыделение прекращалось. Из 9 пациентов с неактивным туберкулезом легких (в 8 случаях — очаговый туберкулез; у 1 больного — цирротический туберкулез) возбудитель туберкулеза был обнаружен методом ПЦР при отрицательном результате посева. Дополнительные положительные находки методом ПЦР были установлены при исследовании спинномозговой жидкости от больного туберкулезным менингитом и плеврального экссудата от больного экссудативным плевритом. Диагноз у этих больных устанавливался на основании цитологических, лабораторных и клинических данных.

Из 28 больных нетуберкулезными заболеваниями легких при отрицательных бактериологических исследованиях с помощью ПЦР были получены положительные результаты в двух случаях: у 1 больного с абсцедирующей пневмонией и у 1 больного раком легких с деструкцией легочной ткани. В обоих случаях определялись старые туберкулезные очаги. В 4 из 7 случаев саркоидоза легких (у 2 больных были обнаружены туберкулезные очаги и МБТ выявлялись у них в близкие интервалы времени при бактериологическом анализе) также определяли положительную ПЦР при исследовании мокроты.

По данным *A.Lassense и соавт.* [5], при исследовании методом ПЦР промывных вод бронхов от больных саркоидозом также обнаруживается почти в 50% случаев микобактериальная ДНК. В связи с этим обсуждается известная гипотеза о микобактериальной этиологии саркоидоза.

Одним из важных препятствий широкому использованию ПЦР в практических лабораторных фтизиатрических учреждениях для выявления МБТ в мокроте является трудоемкость предварительного выявления ДНК.

Мы предложили и показали принципиальную возможность упростить предварительную стадию работы, освободившись от процедуры выделения ДНК. Это было достигнуто путем концентрирования МБТ из разведенной суспензии 10 кл/мл на специальном иммуномагнитном сорбенте (мелкодисперсные феррочастицы, связанные с антителами к МБТ). Применение феррочастиц для связывания МБТ было показано нами ранее [11]. Концентрирование МБТ после удаления микробных клеток с сорбента в щелочном буфере происходит путем центрифугирования в микропробирках. Уровень чувствительности ПЦР при такой подготовке — 10 МБТ/мл.

Эти результаты позволяют создавать отечественные наборы для быстрого и высокочувствительного определения туберкулезного возбудителя методом ПЦР и использовать новую технологию для диагностики

туберкулеза в практических лабораториях после проведения соответствующих государственных испытаний.

Весьма важной будет отработка технологии ПЦР для определения туберкулезного возбудителя в биопсийных материалах, что позволит значительно улучшить достоверность диагностики внелегочных форм туберкулеза. Развитие технологии ПЦР без выделения ДНК, а также разработка мер, предупреждающих загрязнение образцов продуктами амплификации в процессе исследования, откроют по-настоящему новые возможности в диагностике туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирский М.А., Шипина Л.К., Калинина М.В. и др. Быстрое и высокочувствительное определение микобактерий туберкулеза в диагностических материалах с помощью полимеразной цепной реакции // Состояние и перспективы разработки препарата для диагностики вирусных гепатитов и инфекций, управляемых специфическими средствами профилактики. — Пермь, 1993. — С.33.
2. Приймак А.А., Калюк А.Н., Владимирский М.А. и др. Современные методы выявления туберкулеза // Пульмонология. — 1992. — № 4, приложение. — С.975.
3. Brisson-Noel A., Lecossier D., Nassif X. et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples // Lancet. — 1989. — Vol.2. — P.1069—1071.
4. Hermans P.W.M., Soolingen V., Dole D. et al. Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol.28. — P.2051—2052.
5. Lassence A., Lecossier D. et al. Detection of mycobacterial DNA from patients with tuberculosis plewry by means of the polymerase chain reaction: comparison or two protocols // Thorax. — 1992. — Vol.47. — P.265—269.
6. Manjunath N., Shankar P., Rajan L. et al. Evaluation a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis // Tubercle. — 1991. — Vol.72. — P.21—27.
7. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction // Meth. Enzymol. — 1987. — Vol.155. — P.335—350.
8. Peter J. Polymerase chain reaction - improvement our potentials // Rev. Infect. Dis. — 1991. — Vol.13. — P.166—171.
9. Sjobring U., Macklenburg M., Andersen A. et al. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol.28. — P.2200—2204.
10. Shankar R.N., Manjunath K.K., Mohan K. et al. Rapid diagnosis of tuberculosis meningites by polimerase chain reaction // Lancet. — 1991. — Vol.387. — P.5—7.
11. Vladimirovsky M.A., Kuznetsov A.A., Philippov V.I. A magnetic concentration method using hydrosol of ferric particles for diagnosing tuberculosis // J. Magnetism Magnetic Materials. — 1993. — № 122. — P.371—373.

Поступила 11.04.94.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.248-085.234+616.24-008.8-073

С.В.Шарапов, Т.А.Червинская, А.К.Углицких, Л.Ф.Плиско

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА "МУКОСОЛЬВИН-ОРАЛ" НА ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОКРОТЫ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Институт иммунологии МЗ РФ, Московский медико-генетический научный центр РАМН, Российский Государственный медицинский университет

THE MUCOSOLVIN-ORAL EFFECT ON PHYSICAL FEATURES OF SPUTUM IN BRONCHIAL ASTHMA

S.V.Sharapov, T.A.Chervinskaya, A.K.Uglitskih, L.F.Plisko

Summary

The aim of the study was to estimate what physical properties of bronchial secretion are changed under influence of "Mucosolvin-Oral" (acetylcystein). 18 patients with various entities of bronchial asthma were examined. Viscose and adhesive properties of sputum were studied with the standard methods use before and after medication. It was found, that after the first day of medication the adhesion, elastance and viscosity decreased in general in 30%, and after the fourth day they decreased in 36.52%, 58.75% and 56.57% respectively.

Thus, mucosolvin improves significantly sputum excretion during bronchial asthma.

Резюме

Цель настоящего исследования состояла в определении какие именно физические свойства бронхиального отделяемого изменяются под воздействием "Мукосольвина-Орал" (ацетилцистеина). Было обследовано 18 больных с различными формами бронхиальной астмы. Изучались вязкостные и адгезивные свойства мокроты по стандартным методикам до и после приема препарата. Было обнаружено, что в первые