

Jacek Bartkowiak

BADANIA MOLEKULARNE W ROZPOZNAWANIU I RÓŻNICOWANIU CHORÓB ZAKAŻNYCH

Zakład Biochemii Lekarskiej, Instytut Fizjologii i Biochemii,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Kierownik: Jacek Bartkowiak

Techniki molekularne odgrywają coraz większą rolę w diagnostyce chorób zakaźnych. Pozwalają one na szybkie wykrywanie i charakteryzowanie różnych patogenów oraz umożliwiają szerokie badania epidemiologiczne. Prowadzone są one w oparciu o dwa zasadnicze typy metod - techniki hybrydyzacyjne z wykorzystaniem swoistych sond molekularnych oraz amplifikację DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy PCR, połączone z szczegółowymi analizami różnic polimorficznych.

Słowa kluczowe: choroby zakaźne, diagnostyka molekularna, hybrydyzacja DNA, łańcuchowa reakcja polimerazy

Key words: infectious diseases, molecular diagnosis, DNA hybridization, polymerase chain reaction (PCR)

Metody biologii molekularnej bardzo szybko znalazły zastosowanie w szeroko rozumianej diagnostyce medycznej. Ich stosowanie w testach analitycznych staje się coraz większe, niekiedy wręcz nieodzowne. Można przypuszczać, iż w ciągu najbliższych lat nastąpi powszechne wprowadzenie metod molekularnych do standardowej, rutynowej praktyki diagnostycznej. Ich wykorzystanie jest najszersze, oprócz genetyki i onkologii, w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. Pozwalają one na szybkie wykrywanie i charakteryzowanie patogenów oraz umożliwiają szerokie badania epidemiologiczne. Należy podkreślić, iż diagnostyka molekularna nie zastępuje klasycznych metod bakteriologicznych, biochemicznych czy immunologicznych; ona je w istotny sposób uzupełnia i poszerza.

Oznaczenia molekularne prowadzone są w oparciu o zasadnicze dwa typy metod: techniki hybrydyzacyjne, łączące analizę restrykcyjną z wykorzystaniem swoistych sond molekularnych oraz amplifikację DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction - PCR*).

ANALIZA KWASÓW NUKLEINOWYCH PRZEZ HYBRYDYZACJĘ

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych jest bardzo szerokim pojęciem, opisującym wszystkie zjawiska, kiedy to powstają stabilne struktury dwuniciowe z cząsteczek pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych o wzajemnie komplementarnych sekwencjach. Hybrydyzacja może zachodzić pomiędzy dowolnymi dwoma jednoniciowymi łańcuchami kwasów nukleinowych (DNA:DNA, DNA:RNA lub RNA:RNA), także w sytuacji, kiedy krótkie odcinki oligonukleotydowe asocjują do długich łańcuchów rybo- lub deoksyrybonukleinowych. Dotyczy to również kwasów nukleinowych patogenów infekcyjnych. Test hybrydyzacyjny pozwala nie tylko na detekcję cząsteczek o komplementarnych sekwencjach (są, lub ich nie ma), ale także może być wykorzystywany jako pomiar ilości patogennych łańcuchów DNA lub RNA, zawierających odcinki o określonej sekwencji, w mieszaninie fragmentów o innych sekwencjach (na „tle” kwasów nukleinowych zainfekowanych komórek). W tym celu należy dysponować jednoniciowym fragmentem DNA, o dokładnie znanej kolejności nukleotydów. Powinien on być komplementarny do sekwencji występującej w kwasie nukleinowym patogenie (DNA lub RNA), który chcemy wykryć lub ocenić ilościowo. Taki wzorcowy fragment DNA można otrzymać na drodze określonych zabiegów molekularnych (np. klonowanie), ale też często bywa syntetyzowany chemicznie. Jeżeli omawiany fragment dodatkowo wyznakujemy, to będzie on mógł pełnić rolę tzw. sondy molekularnej. Znakowanie najczęściej wykonuje się poprzez wprowadzenie radioizotopu ^{32}P w miejsce nieradioaktywnych atomów fosforu. Przy stosowaniu tego typu sond metodą wykrywania sygnałów po hybrydyzacji jest bezpośrednia autoradiografia. Ostatnio coraz powszechniejszej znakuje się sondy technikami nieradioaktywnymi, polegającymi na dołączaniu do nich biotyny, digoksygeniny lub fluorochromów. Produkty hybrydyzacji wykrywane są wtedy w procesach dwustopniowych - w pierwszym etapie używa się skierowanych przeciwko biotynie czy digoksygeninie przeciwciał, dodatkowo skoniugowanych z enzymami takimi, jak peroksydaza chrzanowa lub alkaliczna fosfataza. W drugim etapie enzymy te, w obecności odpowiednich substratów, powodują reakcje barwne lub wywołują zjawisko chemiluminescencji.

Hybrydyzacji z sondami molekularnymi można poddawać całkowity DNA lub RNA, wyizolowany z badanego materiału, unieruchamiany na nylonowych lub nitrocelulozowych błonach w formie plam (ang. *dot blotting*). Detekcja sygnału świadczy o rozpoznaniu przez sondę komplementarnej sekwencji nukleotydowej, dowodząc istnienia w badanym materiale obcego gatunkowo, patogennego kwasu nukleinowego. W tym typie hybrydyzacji możliwa jest sytuacja odwrotna, kiedy to sonda jest unieruchomiona na trwałym podłożu, a badany materiał dodawany jest w roztworze hybrydyzacyjnym. Hybrydyzacja typu „dot blot” znajduje ograniczone zastosowanie, gdyż jej czułość może być niewystarczająca.

Inną metodę hybrydyzacji, pozwalającą na bardziej precyzyjną identyfikację określonego fragmentu DNA, opracował w 1975 r. E. Southern. Łączyła ona trawienie DNA przez wybrane nukleazy restrykcyjne (enzymy przecinające DNA w obrębie ściśle określonych kilkunukleotydowych sekwencji palindromowych), rozdział elektroforetyczny otrzymanych fragmentów w żelu agarozowym i przeniesienie ich - po denaturacji - z żelu na błonę nitrocelulozową (ang. *Southern blotting*) z klasyczną procedurą hybrydyzacyjną. Proces elektroforezy zapewniał „rozciągnięcie” pod

względem długości fragmentów DNA wytworzonych działaniem restryktaz, a tym samym w stały sposób porządkował analizowany materiał. Należy podkreślić, że przy zastosowaniu silnie wyznakowanych sond molekularnych, czułość omawianej techniki jest bardzo wysoka ($\sim 0,1$ pg DNA). Hybrydyzacja Southerna umożliwia ponadto badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA - RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Polimorfizm ten może mieć charakter naturalny, ale jego przyczyną mogą też być zmiany mutacyjne w DNA patogenu. W przypadku badania RNA procedura oparta jest o podobną zasadę (tzw. *Northern blot*).

Wymieniając różne techniki hybrydyzacji nie można pominąć metody, która w ostatnich latach zyskuje coraz większe uznanie. Chodzi tu o hybrydyzację *in situ*. Opracowane zostały takie procedury utrwalania skrawków tkankowych i rozmazów cytologicznych, że kwasy nukleinowe (głównie DNA, w tym także DNA patogenów), tkwiące w strukturze komórkowej, są zdolne do hybrydyzacji z sondami molekularnymi. Sondy te mogą być wyznakowane izotopowo lub fluorochromami, a obrazy po hybrydyzacji analizowane są autoradiograficznie lub oglądane są pod mikroskopem fluorescencyjnym. Stąd też w tym drugim przypadku nazwa metody - hybrydyzacja FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*).

ANALIZY KWASÓW NUKLEINOWYCH OPARTE O REAKCJĘ PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy - PCR jest jedną z najbardziej efektywnych i użytecznych metod biologii molekularnej opracowanych w ostatnich latach. W dużym stopniu wyparła ona wcześniejsze techniki molekularne, z powodu swej czułości, prostoty, małej czasochłonności i stosunkowo niskich kosztów. W 1993 roku K. Mullis otrzymał za technikę PCR nagrodę Nobla. Reakcja łańcuchowa polimerazy jest w pewnym sensie odzwierciedleniem *in vitro* procesu replikacji materiału genetycznego i umożliwia w trakcie kilkugodzinnego, pojedynczego procesu enzymatycznego namnożenie (amplifikację) do 10^6 - 10^9 razy wyjściowej liczby kopii odpowiedniego fragmentu DNA o długości od kilkudziesięciu do kilkunastu tysięcy (!) par zasad. Koniecznym warunkiem jest jedynie znajomość, przynajmniej częściowa, sekwencji nukleotydów obu końców powielanego odcinka DNA. Jest to niezbędne do zaprojektowania sekwencji tzw. starterów (ang. *primers*). One to, poprzez hybrydyzacje do właściwych im komplementarnych sekwencji zdenaturowanego (a więc jednoniciowego), wyjściowego DNA początkują proces syntezy jego ściśle zdefiniowanego odcinka. Syntezę prowadzą DNA polimerazy zależne od DNA, najczęściej pochodzące z termostabilnych bakterii (np. DNA Taq polimeraza izolowana z bakterii *Thermus aquaticus*), a więc odporne na wysokie temperatury panujące w mieszaninie reakcyjnej. Pojedyncza reakcja odbywa się w jednej probówce, w objętości 20-100 μ l. Generalnie reakcja PCR przebiega, przy użyciu termocyklera - bloku grzejnego, w którym elektronicznie zmieniane są precyzyjnie i szybko temperatury, właściwe dla poszczególnych etapów procesu PCR. Odbywa się to w trzech, cyklicznie powtarzających się etapach - denaturacji (temperatura 90-95°C), hybrydyzacji starterów (40-65°C) i syntezy (temperatura ok. 72°C). Po 30 cyklach wyjściowa ilość namnażanego materiału wzrasta milion razy. W praktyce oznacza to uzyskanie 0,2 - 2,0 μ g określonego fragmentu DNA.

Ponadto - w odróżnieniu od innych technik biologii molekularnej, np. analizy restrykcyjnej i hybrydyzacji metodą Southerna - materiał wyjściowy do analizy PCR

może zawierać DNA nawet w znacznym stopniu zdegradowany. Pozwala to na poddawanie badaniom śladowych ilości krwi, komórek hodowanych *in vitro*, śliny, moczu, próbek pobranych w trakcie biopsji cienkoigłowej czy skrawków histopatologicznych utrwalonych i zatopionych w parafinie.

Reakcję PCR stosuje się także do cDNA, uzyskanych przez przepisanie informacji z RNA (np. materiału z RNA wirusów) na komplementarne łańcuchy polideoksyrybonukleinowe na drodze reakcji katalizowanej przez odwrotną transkryptazę (RT). W tym drugim przypadku mówimy o reakcji RT-PCR. Aktualnie wprowadzana jest nowa technologia amplifikacji sterowanej transkrypcją TMA (ang. *transcription-mediated amplification*), wykorzystująca enzymy RT i T7 RNA polymerazę do generowania amplikonów RNA, identyfikowanych testem hybrydazyjnej protekcji w reakcji luminescencyjnej. Technika ta jest czulsza od RT-PCR o jeden rząd wielkości.

Opracowano rozliczne modyfikacje podstawowej procedury PCR, jak np. „gniazdowy - ang. *nested - PCR*” (po pierwotnej reakcji następuje kolejna, w której stosuje się startery zlokalizowane bliżej środka powielanego fragmentu DNA; uwiarygadnia to swoistość namnażanego produktu), RAPD-PCR (ang. *Rapid Amplification of Polymorphic DNA*; technika powielania polimorficznych fragmentów DNA z zastosowaniem losowo wybranych starterów; dostarcza to danych typu „odcisku palca” patogenu), czy „multiplex PCR”, gdzie reakcja prowadzona jest równocześnie z kilkoma parami starterów swoistych dla różnych genów.

Produkty otrzymane w reakcjach PCR/RT-PCR poddaje się ocenie elektroforetycznej w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. W termocyklarach najnowszej generacji ilość amplifikowanego produktu, wyznakowanego fluorescencyjnie, jest mierzona w czasie rzeczywistym przez specjalne systemy detekcyjne (tzw. *real-time PCR*).

Bezpośrednie wyniki reakcji PCR i RT-PCR mogą nieść istotną informację diagnostyczną - np. wskazują na obecność obcych kwasów nukleinowych - wirusów, bakterii, grzybów i innych pasożytów.

Reakcja PCR może być także przydatna do wykazania w powstałym produkcie subtelnych zmian, nie ujawniających się w prostym teście elektroforetycznym, np.: różnic polimorficznych lub mutacyjnych w określonych genach badanych patogenów. Sprzęga się wtedy proces amplifikacji z innymi technikami molekularnymi, jak analiza restrykcyjna - PCR-RFLP czy hybrydazyjacja - PCR-ASO (sonda swoista do określonej sekwencji; ang. *Allele Specific Oligonucleotide*). Stosuje się także swoiste metody elektroforetyczne - analiza PCR-SSCP (badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA; ang. *Single Stranded Conformational Polymorphism*), czy analiza w żelach z gradientem czynnika denaturującego - DGGE (ang. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

Najbardziej wiarygodne wyniki przynosi sekwencjonowanie - najczęściej automatyczne ustalanie kolejności nukleotydów w analizowanym fragmencie kwasu nukleinowego. Zwykle stosowana jest technika Sangera, polegająca na hamowaniu wydłużania nowych łańcuchów polideoksyrybonukleotydowych, syntetyzowanych na matrycy sekwencjonowanego DNA, przez dideoksyrybonukleotydy. Znaczącym przełomem było wprowadzenie w ostatnich latach tzw. cyklicznego sekwencjonowania DNA (ang. *cycle sequencing*). Technika ta pozwala bezpośrednio analizować produkt reakcji PCR. W metodach sekwencjonowania końcowy proces rozdziłu elektroforetycznego i de-

tekcja uzyskanego obrazu przeprowadzane są automatycznie, a wyniki opracowywane komputerowo.

Coraz częściej opracowywane są testy PCR/RT-PCR o charakterze ilościowym. Diagnostyczne znaczenie takich testów wynika z faktu, że umożliwiają one precyzyjne ustalanie, np. ilości danego wirusa przypadające na określoną ilość badanego materiału.

Wprowadzenie do medycyny nowoczesnych metod biologii molekularnej przyczyniło się nie tylko do ogromnego postępu w diagnostyce i terapii rozlicznych chorób, ale wniosło ze sobą także szereg zagrożeń. Paradoksalnie, jednym z nich jest niewiarygodna czułość stosowanych technik, jak np. reakcji PCR. Może bowiem dochodzić w trakcie przeprowadzania procesów amplifikacyjnych do licznych kontaminacji („zakażeń”), tj. dostania się wcześniej namnożonego materiału do prób, nie zawierających badanych sekwencji. Ryzyko fałszywie dodatnich wyników zmusza do specjalnej organizacji pracy w pracowniach PCR i do przestrzegania szczególnych zabezpieczeń w trakcie wykonywania czynności doświadczalnych.

INNE METODY AMPLIFIKACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH *IN VITRO*

Poza metodą PCR opracowane zostały inne techniki zwielokrotniania ilości DNA/RNA oraz metody wzmocnienia sygnału detekcji oznaczanego materiału, które powoli znajdują szersze zastosowanie w diagnostycznych oznaczeniach o charakterze rutynowym. Do tych pierwszych należą m. in.:

- reakcja łańcuchowa ligazy - LCR (ang. *Ligase Chain Reaction*), oraz
- reakcja amplifikacji jednoniciowego RNA, określana jako NASBA (ang. *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*).

Amplifikacja sygnału detekcji, zwiększająca czułość oznaczenia, to efekt wiązania znakujących sondy ligandów (barwniki fluorescencyjne, digoksygenina czy biotyna) ze swoistymi przeciwciałami skoniugowanymi z enzymem (np. fosfatazą alkaliczną czy peroksydazą), przy udziale którego, w obecności odpowiedniego substratu, zachodzi reakcja kolorymetryczna lub chemiluminescencyjna.

Do złożonych metod wzmocnienia sygnału zaliczyć można:

- cykliczną reakcję sondy molekularnej CPR (ang. *Cycle Probe Reaction*), oraz
- metodę bDNA (ang. *branched DNA*), gdzie stosuje się sondy molekularne wiążące hybrydizowane DNA z rozgałęzionym, wyznakowanym DNA, pozwalającym na detekcję minimalnych ilości oznaczanego materiału (komercyjne zestawy oznaczania DNA-HBV).

PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W CHOROBYCH INFEKCYJNYCH

Dopiero opracowanie metody PCR oraz szeregu technik sekwencjonowania DNA pozwoliło na takie poznanie genomów mikroorganizmów, że analizy molekularne w diagnostyce chorób infekcyjnych i inwazyjnych stały się badaniami z wyboru. Znalazły one szczególnie szerokie zastosowanie w szybkim wykrywaniu patogenów, szczególnie takich, których hodowla *in vitro* (w celu późniejszej identyfikacji i różnicowania) jest trudna lub długotrwała. I tak klasycznym przykładem zastosowań PCR w wirusologii jest wykrywanie patogenu przed wystąpieniem objawów klinicznych, i to z czułością 100 razy większą w porównaniu do metod hybrydizacyjnych. Reprezenta-

tywny jest tu HIV, wykrywany na wiele lat przed wystąpieniem objawów AIDS. Oczywiście zdarzają się przypadki, kiedy przy diagnozowaniu mikroorganizmu tradycyjne metody barwienia i obserwacji mikroskopowej są szybsze i tańsze od technik molekularnych. Ten typ analizy obarczony jest jednak licznymi wątpliwościami przy rozpoznawaniu określonych patogenów, a ponadto często nie sprawdza się w testach oceny lekowrażliwości/lekooporności mikroorganizmów. Przykładem może tu być diagnostyka malarii, gdzie klasyczne procedury hodowlane są trudne, kosztowne oraz długotrwałe (około 2 tygodni) i tym samym znacznie opóźniają rozpoczęcie leczenia.

W identyfikacji patogenów najczęściej podlegają analizie sekwencje DNA kodujące rybosomowy RNA obu podjednostek rybosomu, bądź też sam rRNA. Geny dla rRNA występują u wszystkich organizmów (z wyjątkiem wirusów), i chociaż mają regiony o znikomej zmienności gatunkowej (a nawet rodzajowej), to zawierają także sekwencje DNA swoiste dla poszczególnych gatunków. Wybrane fragmenty genów dla rRNA są nie tylko specyficznym i unikalnym znakiem rozpoznawczym danego mikroorganizmu, ale na ich podstawie można „odczytywać” historię ewolucyjnych przekształceń danego gatunku i określać przynależność klasyfikacyjną starych i nowoodkrytych patogenów. Do detekcji i klasyfikacji mikroorganizmów używa się niekiedy innych regionów ich genomu. Niełatwo bowiem znaleźć unikalne geny, kodujące niepowtarzalne, funkcjonalne białka dla poszczególnych drobnoustrojów. Natomiast specjalną uwagę poświęca się testom rozpoznającym swoiste dla danej bakterii plazmidy, wnioskując na ich podstawie nie tylko o identyfikacji patogenu, ale także o jego oporności na określone leki.

Do identyfikacji materiału genetycznego mikroorganizmów, w próbach pobranych od pacjentów, najczęściej wystarcza przeprowadzenie prostej reakcji PCR/RT-PCR. Aktualnie do diagnostyki określonych patogenów opracowane jest po kilka procedur molekularnych. Na przykład oznaczanie bakterii *Chlamydia trachomatis*, jednego z częstszych czynników etiologicznych chorób rozpowszechnianych na drodze płciowej, obejmuje test hybrydyzacyjny wykrywający rybosomowy RNA (o czułości 64-93%) i wykrywanie techniką PCR specyficznego plazmidu obecnego w tych bakteriach (jego czułość sięga 97-100%). W niektórych jednak przypadkach produkt łańcuchowej reakcji polimerazy poddawany bywa dodatkowym testom - analizie RFLP, hybrydyzacyjnej ASO lub technikom przesiewowym SSCP i DGGE. Badania te, uzupełnione sekwencjonowaniem, pozwalają na wykrycie jednonukleotydowych polimorfizmów SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) lub mutacji, a więc umożliwiają analizę wariantów danych patogenów.

Wraz z szybkim rozwojem nowych technik diagnostyki chorób infekcyjnych i inwazyjnych zwiększa się również lista organizmów (wirusów, bakterii, grzybów i pasożytów), dla których są dostępne komercyjne molekularne testy diagnostyczne. Zestawienia to aktualnie obejmuje blisko dwieście pozycji, w tym ponad 100 szczepów bakteryjnych.

Pomimo znaczących sukcesów w terapii prawie co rok pojawiają się nowe choroby infekcyjne. Nowe czynniki infekcyjne są bardzo zróżnicowane i wiele z nich należy do mało znanych lub zupełnie nowych grup systemetycznych. Metody molekularne stały się w tym przypadku niezastąpionym narzędziem badawczym i diagnostycznym. Przykładem może być powiązanie infekcji wirusem *Herpes 8* z mięsakiem Kaposiego. Wykazano, że wirus przekazuje się przez ślinę i wyjaśniono, dlaczego ten nowotwór

rozwijają się u różnych grup zakażonych HIV z odmienną częstością. Przy okazji tego typu ustaleń opracowuje się odpowiednie zalecenia sanitarne i medyczne, zapobiegające szerzeniu się choroby, a w szeregu innych przypadków pozwalające na jej skuteczne leczenie.

Metodami molekularnymi uzyskuje się także wiarygodne dane o lekooporności mikroorganizmów. Nadto, testy te są wielokrotnie szybsze od klasycznych oznaczeń. Reakcja typu „multipleks” PCR, kiedy to w jednej próbie materiału oznacza się jednocześnie szereg patogenów, posiada szczególne znaczenie w badaniach epidemiologicznych. W chwili obecnej można mówić o istnieniu epidemiologii molekularnej. Bada ona genetyczną zmienność patogenów. Możliwość szybkiego zebrania danych o materiale infekcyjnym z rozmaitych miejsc i od licznych pacjentów pozwala wykorzystać wyniki tych analiz do ustalenia źródeł i dróg szerzenia się zakażeń (np. wewnątrzszpitalnych), podjęcia przeciwdziałań i sprawdzenia ich skuteczności. Epidemiologia molekularna może ustalić, czy masowe szczepienia prowadzą do eliminacji patogenu, czy też zostaje on zastąpiony przez inny szczep, niewrażliwy na szczepionkę. Najbardziej znane są osiągnięcia epidemiologii molekularnej HIV, co wiąże się z wprowadzeniem ogólnoswiatowego systemu monitorowania zmienności i rozmieszczenia geograficznego szczepów HIV. Występujące najczęściej podtypy wirusa zostały wybrane do prac nad szczepionką. Natychmiastowa identyfikacja nowych izolatów HIV pozwala na kontrolowanie bezpieczeństwa systemu krwiodawstwa. Innym przykładem z tego zakresu jest tworzenie internetowych baz danych dotyczących charakterystyk genetycznych, tzw. profili genomowych różnych patogenów oraz tworzenie w sieci laboratoriów wyspecjalizowanych w interpretacji przesyłanych im danych o tych profilach.

W badaniach diagnostycznych mikroorganizmów metodami molekularnymi nie jest konieczny materiał świeżo pobrany (z wyjątkiem RNA wirusów). Pozwala to na zwiększenie wiarygodności uzyskiwanych wyników, zwiększa bezpieczeństwo pracy i ogranicza wymagania stawiane laboratoriom, w których wykonuje się testy z próbami patogennymi.

W przypadkach, gdy znani są pośredni gospodarze infekcyjnych mikroorganizmów (np. kleszcz dla *B. burgdorferi*, moskity dla malarii czy mucha Tse-tse dla *P. falciparum*), badania molekularne umożliwiają oznaczanie patogenów także w ich organizmach, co pozwala na określenie regionów geograficznych rozprzestrzeniania się choroby.

Choroby wirusowe mają bardzo często długie okresy latencji, stąd też powszechnie stosowane badania serologiczne nie pozwalają na rzeczywistą ocenę aktywności wirusów w organizmie pacjenta. Są one zresztą zbyt mało czułe w porównaniu z molekularnymi technikami amplifikacji i detekcji wirusowego materiału genetycznego. Stosując techniki molekularne można różnicować fazy replikacyjne wirusów i stany zahamowania ich namnażania. Wiremia, np. wirusów hepatotropowych HBV i HCV identyfikowana jest poprzez detekcje materiału genetycznego wirusów w próbkach surowicy lub osocza krwi obwodowej. Obecność HBV-DNA i HCV-RNA jest jedynym bezwzględnym znakiem zakaźności. Dzięki metodzie PCR uzyskuje się wiele istotnych informacji na temat dynamiki zakażenia organizmu HBV. Można nią wykryć już 10-100 genomów HBV w 1 ml surowicy. Przy pomocy techniki PCR możliwe jest stwierdzenie zakażeń HBV przy nieobecności serologicznych markerów tego wirusa we krwi obwodowej, a także wczesne wykrywanie, bez innych objawów klinicznych, nawrotu procesu repli-

kacji. Podobnie pośrednia detekcja HCV RNA oparta o reakcję RT-PCR lub metodę TMA umożliwia wykrycie patogenu we wczesnym okresie ostrej infekcji i u pacjentów niezdolnych do odpowiedzi immunologicznej. Genotypowanie wirusa HCV, prowadzone poprzez analizy ograniczonych sekwencji wirusowego genomu, praktycznie dostarcza danych pozwalających na rozróżnienie głównych genotypów, aczkolwiek dyskryminacja między subtypami ciągle stanowi wyzwanie. Jednakże postęp w technikach charakteryzacji wirusowych kwasów nukleinowych pozwala na wiarygodne decyzje diagnostyczne i jest istotnym narzędziem w planowaniu procesu leczenia.

PODSUMOWANIE

Zakres stosowania diagnostyki molekularnej w chorobach zakaźnych rozszerza się coraz szybciej. Postęp obejmuje zarówno liczbę oznaczanych patogenów i dobór materiału badawczego, jak również doskonalenie procedur analitycznych, w tym ich automatyzację. Wiarygodność wyników wymaga jednak zwrócenia szczególnej uwagi na sposób przygotowania próbek do badań, na zindywidualizowany system wzorców wewnętrznych stosowanych w prowadzonych oznaczeniach, a przede wszystkim na standaryzację analiz wykonywanych przez różne placówki.

J Bartkowiak

MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES

SUMMARY

In the long term, many of the conventional diagnostic approaches to detection and characterisation of infectious diseases is complemented or even replaced by recognition of DNA/RNA specific sequences. The molecular procedures are based on two distinct types of methods - nucleic acid hybridization techniques with specific molecular probes, and DNA amplification by the polymerase chain reaction PCR. In the first method DNA fragments generated by restriction endonucleases are separated by electrophoresis, transferred to proper membranę and annealed with specific oligonucleotides which are labelled with ^{32}P or with a non-radioactive marker. PCR reaction utilizes a DNA extension enzyme (polymerase) which can add nucleotide bases to primers once a template is provided. Oligonucleotides primers have to recognize target molecule. The single cycle is then repeated and each time DNA segments are doubled. Multiplex polymerase chain reactions have been designed to identify an organism as well as its virulence-specific sequences or antibiotic resistance plasmids simultaneously. The major drawback of PCR procedure which result from its exquisite sensitivity have to be consider. The problem is contamination and many strategies have been developed to avoid it. To these research tools were added probes for in situ hybridization. Advantages provided by this technique include the ability to detect latent (non-replicating) viruses and to localize their genomes to nuclear or cytoplasmic regions within cells. Nucleic acid probes or the hybridization conditions can be manipulated so that a broad spectrum of genotypes could be detectable. This is particularly valuable in those emerging infections where the individual serotypes are unknown. Recombinant DNA approaches have now been described for detection of a wide range of infectious agents. Some remain research activities, others are more appropriate to the routine diagnostic laboratory. An understanding of a pathogen's life cycle and the host's responses to the infectious agent is enhanced by characterisation of the former's genome using molecular technology. The spread of epidemics or hospital-acquired (nonsocomial) infections is followed and characterised with more accuracy by the identification of unique DNA fingerprints for individual pathogens. The

prospects for molecular medicine in microbiology are vast and will have profound effects in laboratory and clinical practice.

PIŚMIENNICTWO

1. Bartkowiak J. Zastosowanie metod biologii molekularnej w medycynie. W: Wierzbicki R, edytor. Wybrane zagadnienia biologii molekularnej. Łódź: Akademia Medyczna w Łodzi;2000:112-36.
2. Blumm HE, Wu CH, Wu GY, editors. Molecular diagnosis and therapy. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1996.
3. Germier JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implication. Mayo Clin Proc 2001;76:911-20.
4. Hopkin JM, Wakefield AE. DNA hybridization for the diagnosis of microbial diseases. Quart J Med 1990;75:415-21.
5. Jameson JL, Collins FS, editors. Principles of molecular medicine. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
6. Juszczak J. Wirusowe zapalenia wątroby. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1999.
7. Materiały Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Nowopojawiające się, nawracające i bioterrorystyczne zagrożenia ze strony zakaźnych chorób odzwierzęcych”. Przegl Epidemiol 2001;supl 2/2001.
8. Monjardino J. Molecular biology of human hepatitis viruses. Imperial College Press, London, 1998.
9. Pieniążek NJ. Diagnostyka chorób infekcyjnych i inwazyjnych. W: Bal J, edytor. Biologia molekularna w medycynie. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN;2001:342-56.
10. Rapley R, editor. The nucleic acid protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999.
11. Słomski R, edytor. Postępy biologii molekularnej. Post Biol Kom 1998; 25, supl 10.
12. Trent RJ. Molecular medicine. Churchill Livingstone, New York, 1993.
13. Tiller FW, Diagnostic gene amplification in infectious diseases - present issues and future challenges. Clin Lab 1995;41:643-9.
14. Wilson SM. Nucleic acid techniques and the detection of parasitic diseases. Parasitol Today 1991;7:255-9.

Adres autora:

Jacek Bartkowiak

Zakład Biochemii Lekarskiej, Instytut Fizjologii i Biochemii

Uniwersytet Medyczny

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

tel. (0-prefiks-42) 678-24-65

e-mail: j.bartkowiak@pro.onet.pl