

ПРИРОДА

№ 4, 2001 г.

Мельникова М.Н., Виноградов А.В.,
Медников Б.М., Чекановская Л.А.

Новый метод определения вирусной нагрузки

© “Природа”

Использование и распространение этого материала
в коммерческих целях
возможно лишь с разрешения редакции



Сетевая образовательная библиотека “VIVOS VOCO!”
(грант РФФИ 00-07-90172)

vivovoco.nns.ru
vivovoco.rsl.ru
www.ibmh.msk.su/vivovoco

Новый метод определения вирусной нагрузки

М.Н.Мельникова, А.В.Виноградов,
Б.М.Медников, Л.А.Чекановская
Москва

В отечественной медицине о течении болезни, вызванной, например, бактериями, микоплазмами, грибами, простейшими или вирусами, и об эффективности лечебных препаратов обычно судят по результатам биохимических и иммунологических анализов. Гораздо рациональнее было бы следить за развитием или угасанием численности болезнетворного начала непосредственно, т.е. прямо определяя его количество. В настоящее время такой способ интенсивно внедряется в клиническую практику.

Этот метод основан на полимеразной цепной реакции (ПЦР), за разработку которой К.Муллис в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии. ПЦР относительно проста в исполнении, чрезвычайно специфична и чувствительна — позволяет выявить в пробе единичный ген. Мы не будем приводить описание полимеразной цепной реакции, она подробно освещалась на страницах «Природы» [1]. Скажем лишь, что с помощью этого метода удается получить до миллиона копий нужного гена всего за несколько часов, используя при этом ничтожное количество исследуемого образца. Полученные копии затем можно «опознать», разде-

лив реакционную смесь, например, электрофорезом в геле. К настоящему времени разработаны модификации ПЦР, в числе которых та, что позволяет выявлять не ДНК, а РНК, что чрезвычайно важно для определения РНК-содержащих вирусов.

Используя первые модификации этого метода, можно было судить лишь о наличии вируса в пробе, но и они оказались весьма полезными, чтобы понять, есть ли в донорской крови вирусы СПИДа и гепатитов. Однако при терапии инфекционных болезней важно определить не только присутствие, но и количество болезнетворного агента.

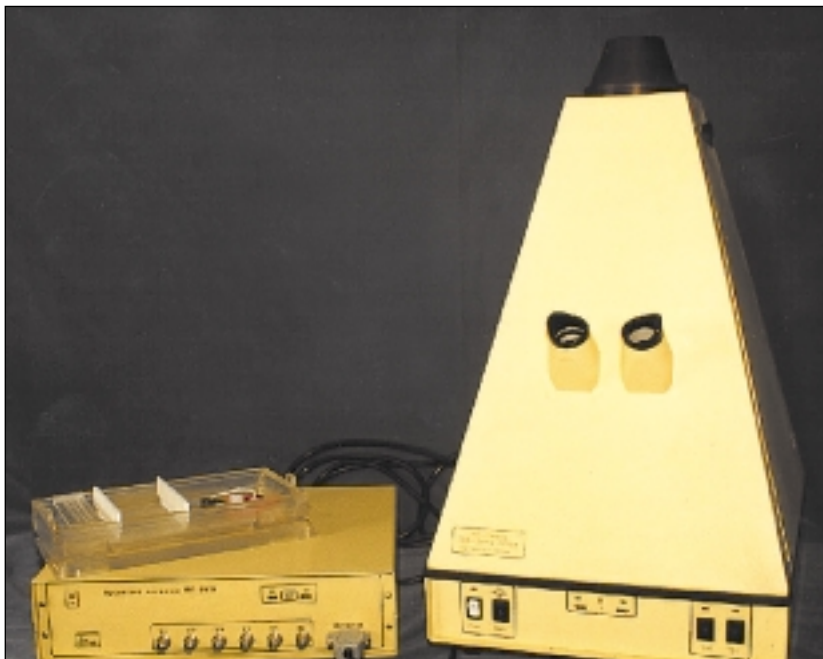
В первую очередь это необходимо, чтобы оценить терапевтическое действие применяемых препаратов. Если проследить за динамикой численности вируса в организме пациента, удастся установить, например, эффективны ли азотимидин в терапии ВИЧ-инфекции (ибо существуют и легко возникают штаммы вируса иммунодефицита человека, на которые это вещество не действует) или интерферон при лечении гепатитов. В повседневной клинической практике суточный ход вирусной нагрузки позволяет правильнее выбрать тактику лечения.

Определение количества вирусных частиц полимеразной цепной реакцией требует введе-

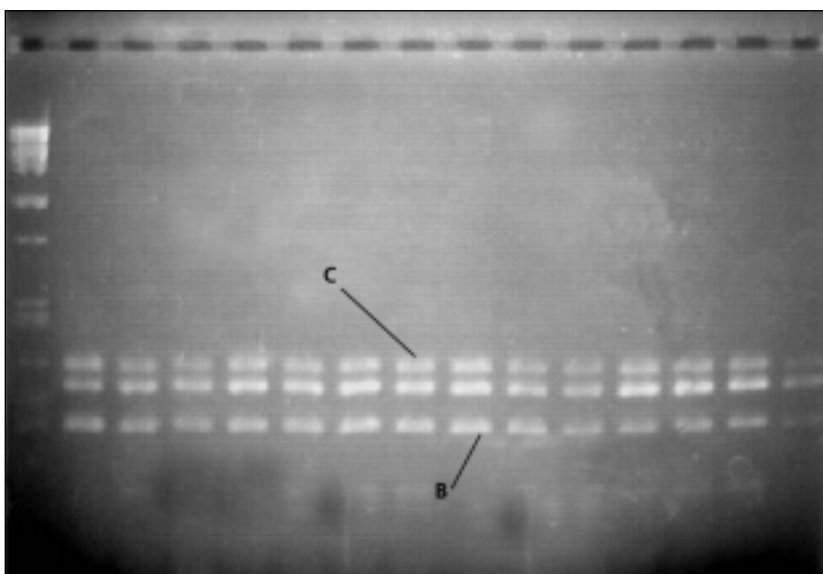
ния внутренних или внешних стандартов, а то и обоих сразу.

Известно, что одна из причин стремительного распространения ВИЧ-инфекции — способность вируса существовать в явной (исходной) РНК-форме и скрытой, ДНК-форме. В последнем случае геном вируса в виде ДНК встроен в геном хозяйских лимфоцитов, не имеет антигенов, и его нельзя выявить стандартными способами. Еще труднее определить его количество, поскольку оно связано с числом лимфоцитов в крови, а то в свою очередь зависит от состояния пробы и метода их выделения. В таком случае внутренним стандартом может служить ДНК самих лимфоцитов. Если сопоставить количество копий вирусного гена, полученных полимеразной реакцией, и фрагментов уникальной последовательности хозяйской ДНК, то по разнице можно найти, сколько зараженных вирусом клеток содержится в пробе, т.е. определить вирусную нагрузку.

В качестве наружного стандарта используют строго определенное количество хозяйской ДНК. Она одновременно с вирусной ДНК «размножается» (амплифицируется) в ходе ПЦР, образовавшиеся копии той и другой ДНК разделяют электрофорезом и по его результатам, сопоставив количество тех и других копий,



Установка «шатер» для полуавтоматического разделения смесей биополимеров — ДНК, РНК, белков. Прибор позволяет проводить компьютерную регистрацию результатов разделения и их количественную обработку. Камера для электрофореза показана отдельно — на процессоре.



Электрофореграмма, отражающая результат разделения в «шатре» копий вирусного гена, полученных полимеразной цепной реакцией. Это изображение — результат компьютерной регистрации. Буквой В отмечена полоса, содержащая копии вирусного гена, буквой С — наружного стандарта. По соотношению массы той и другой полосы, умноженному на число копий стандарта, компьютер вычисляет вирусную нагрузку.

судят о числе вирусных частиц в пробе. Заметим, амплификация хозяйской ДНК начинается с добавления в реакционную смесь специальных праймеров (затравок — синтетических нуклеотидных фрагментов), которые отличаются от праймеров для вирусной ДНК. Но возможен и другой вариант наружного стандарта, когда праймеры на вирусную и клеточную ДНК одни и те же. Тогда в контрольную последовательность интегрируют нуклеотидный фрагмент, который позволяет различить вирусную и стандартную ДНК после разделения смеси электрофорезом в геле. Этот метод разработан для вируса иммунодефицита человека и впоследствии применен для определения вирусной нагрузки при гепатите В [2].

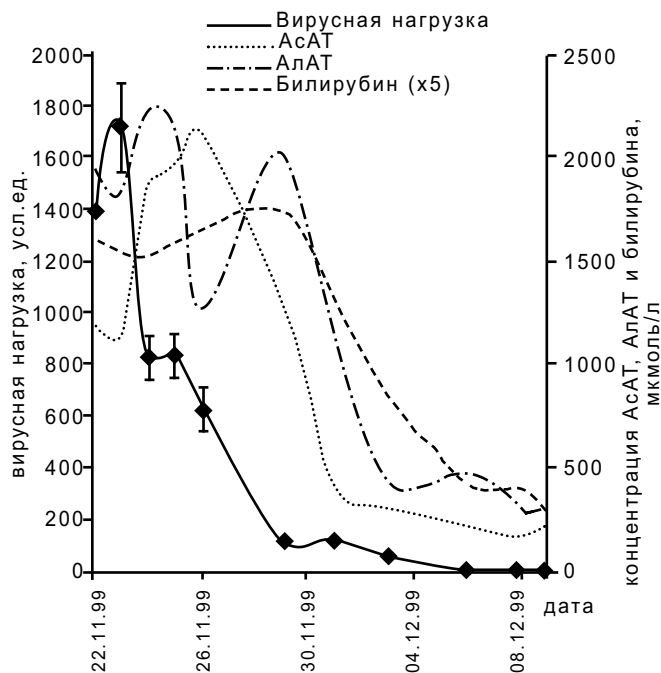
Следует заметить, что для точной оценки количества болезнетворного агента в пробе нужно правильно подобрать количество циклов амплификации. Достигается это опытным путем, потому время анализа увеличивается, а эксперимент усложняется. Мы разработали полуавтоматическую систему, в которой разделение биополимеров (ДНК, РНК, белков) электрофорезом сочетается с компьютерным считыванием информации с геля и количественной ее обработкой. Этот прибор, получивший название «шатер» и внедренный в производство, позволяет выявить 3—10 нг ДНК в полосе геля, если использовать традиционный флуоресцентный краситель (бромистый этидий). Но применив для окрашивания недавно разработанные более совершенные соединения, можно повысить чувствительность установки на три порядка. По предварительным данным, себестоимость анализа с помощью нашего «шатра» примерно в десять раз меньше, чем при выполнении на импортном оборудовании.

Сейчас в нашей стране широко распространена диагностика гепатита по концентрации билирубина, а также по выявлению вирусных маркеров — HbS Ag,

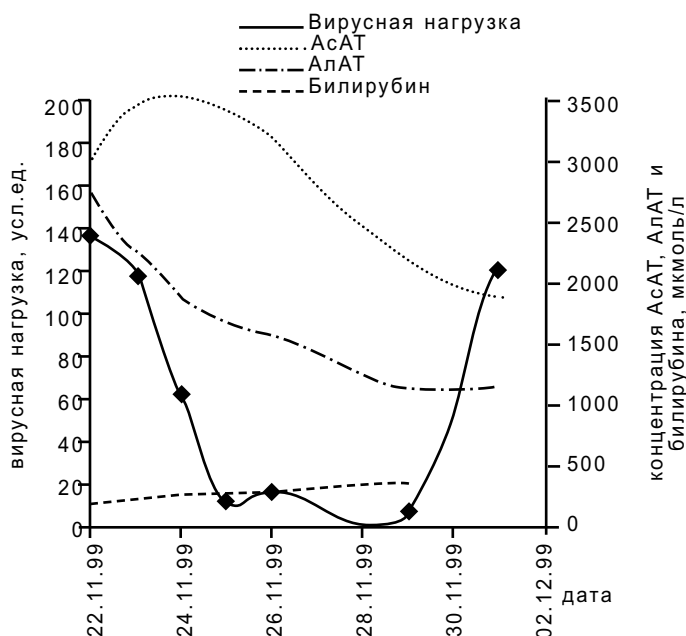
Hbe Ag с помощью антител. Самые точные результаты дает обнаружение Hbe Ag, но как указывает С.Соринсон, существуют штаммы вируса, которые утратили способность его синтезировать [3]. Кроме того, выработка антител в организме больного зависит от состояния иммунной системы пациента, к тому же отстает от развития болезни и характеризуется значительным последствием. Что касается билирубина, то его концентрация может варьироваться у больного, поэтому безжелтушная форма и преджелтушная фаза болезни у большинства пациентов остаются нераспознанными. Применяется также диагностика ферментными методами, когда определяют концентрацию аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Но и эти методы диагностики далеки от совершенства, поскольку дают ошибку при анализе хронической формы болезни.

Мы исследовали вирусную нагрузку крови двух пациентов Инфекционной клиники № 1. Судя по результатам анализа одного из них, изменение численности вируса гепатита В имеет затухающий колебательный характер. Концентрация ферментов тоже меняется в ходе болезни и лечения, но ее колебания отстают от всплесков вирусной нагрузки на три—пять дней. Вариации в содержании билирубина менее заметны по сравнению с двумя предыдущими показателями. Явное преимущество нашего метода, т.е. слежения за динамикой развития вируса гепатита В, проявилось при обследовании пациента, чья жизнь прервалась болезнью. За день до смерти количество вирусных частиц резко увеличилось, уровень же ферментов остался без изменений, а содержание билирубина было низким на всем протяжении заболевания. Ясно, что по двум последним показателям нельзя было предвидеть трагический конец.

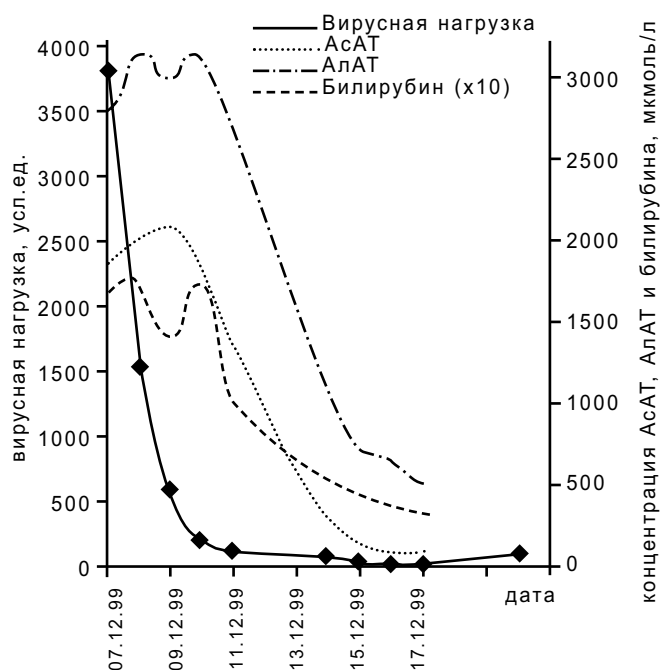
В другой серии опытов мы



Графики, построенные по результатам четырех методов анализа крови больного гепатитом В при традиционной терапии острой формы инфекции. Здесь и далее: АсАТ – аспартатаминотрансфераза, АлАТ – аланинаминотрансфераза.



Кривая, отражающая ход вирусной нагрузки крови больного, скончавшегося от гепатита В. Для сравнения приведены кривые анализа аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) и билирубина.



Кривая хода вирусной нагрузки в процессе лечения гепатита В у плантом. Уровни содержания ферментов и билирубина, приведенные здесь же, особенно расходятся с величиной вирусной нагрузки в первые дни лечения препаратом.

проследили по вирусной нагрузке эффективность стимулирующего иммунную систему γ-план-

та — нового препарата для терапии гепатита В. Предварительные результаты дали обнадеживающую картину: количество вируса резко снизилось уже на второй день лечения и через неделю он уже не обнаруживался в пробе. Концентрации ферментов (особенно аланинаминотран-

сферазы) и билирубина в течение первых четырех-пяти дней лечения оставались такими же высокими, как в день поступления больного в клинику, но к концу 10-дневного курса снизились. Следовательно и об эффективности терапии правильнее судить по результатам прямого определения вирусной нагрузки, чем по биохимическому анализу. Дальнейшие испытания препарата под контролем разных мето-

дов анализа были бы крайне полезными, особенно при лечении хронической формы болезни.

По нашему убеждению, определение вирусной нагрузки посредством полимеразной цепной реакции должно стать основным методом диагностики многих инфекционных заболеваний, а не арбитражным, как о том пишут М.Роггендорф и О.Калинина [4]. В числе таких болезней не только гепатиты, но и другие недуги, вызываемые вирусами и бактериями (папиллома, вирусные инфекции гениталий и др.), необходим количественный метод и в исследованиях патогенеза опухолей. ■

Литература

1. Лауреаты Нобелевской премии 1993 года. По химии — М.Смит и К.Муллис // Природа. 1994. № 1. С. 108—110.
2. Yolov A.A., Kozlova A.V., Jaroslavtseva N.G., Mednikov B.M., Karamov E.V. Quantitative PCR as a method for monitoring retroviral infection of the gene level // Virus Genes. 1995. V. 10. P. 45—51.
3. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. СПб., 1998.
4. Roggendorf M. New developments in diagnosis of viral hepatitis // Internist. 1995. V.36. № 2. P. 133—138; Калинина О., Рыжова Ю., Мукомолов С. Детекция генома гепатита В методом PCR // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями. СПб., 1995. С. 91.