

Zbigniew Krzemiński

POSTĘPY W DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ CHOROÓB ZAKAŻNYCH

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: Zbigniew Krzemiński

W pracy opisano rozwój nowych metod diagnostyki chorób zakaźnych, głównie opartych o technikę mikromacierzy DNA, mikromacierzy białek i nanotechnologię.

Słowa kluczowe: diagnostyka, mikromacierz DNA, mikromacierz białek, nanotechnologia
Key words: diagnostics, DNA microarray, protein microarray, nanotechnology

Poszukiwania nowych metod w diagnostyce chorób zakaźnych kierują się, zarówno w przeszłości, jak i obecnie, zwykle ku tym samym celom. Jest to przede wszystkim zwiększenie wiarygodności wyniku, poprzez podniesienie czułości i swoistości metody, zmniejszenie czasu badania, zmniejszenie jego kosztów i wreszcie wprowadzenie na tyle prostych metod, aby badanie mogło być, np. przeprowadzone przez lekarza w jego gabinecie. Zazwyczaj nie udaje się osiągnąć wszystkich tych celów w jednej metodzie, dlatego w diagnostyce tej samej choroby stosowane są zwykle różne metody. W zależności od okresu choroby oraz rodzaju czynnika etiologicznego, możemy szukać zarazków w organizmie lub przeciwciał i innych białek, będących odpowiedzią organizmu na ich obecność.

Stosując tradycyjne metody diagnostyki mikrobiologicznej staramy się wyizolować zarazek i zidentyfikować go w oparciu o jego cechy fenotypowe, stosunkowo łatwo wykrywalne za pomocą różnych testów biochemicznych. Trwa to jednak stosunkowo długo (2-3 dni), a ze względu na częstą zmienność fenotypową zarazków i wykrywanie nowych gatunków, zmusza do stopniowego zwiększania liczby oznaczanych cech i rozbudowywania systemów diagnostycznych. Bardziej proste i szybsze sposoby identyfikowania zarazków, to metoda aglutynacji lateksowej, immunofluorescencji bezpośredniej lub immunoenzymatyczna. Poza niewątpliwymi zaletami, metody te mają też pewne wady. Wśród nich jest niska czułość; w badanym materiale musi być od 10 000 do 100 000 drobnoustrojów w 1 ml (1). Dlatego też, aby przyspieszyć uzyskiwanie wyników przy jednoczesnej wysokiej czułości, opracowano metody identyfikacji zarazków w oparciu o budowę ich genomu. Początkowo były to sondy genetyczne, potem również wprowadzono metody amplifikacji określonego fragmentu genomu za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy, łańcuchowej reakcji ligazy lub obu tych metod jednocześnie

(2, 3). Teraz do wykrycia zarazka wystarcza już od 10 do 100 drobnoustrojów w 1 ml. Ponadto możliwe stało się wykrywanie zarazków, które nie dają się hodować *in vitro* (np. *Tropheryma whippelii*, *Bartonella henselae*, *Borrelia* spp.). Metody te są ciągle udoskonalane i automatyzowane. Ich wadą jest przede wszystkim to, że musimy z góry ustalić jaki zarazek jest przez nas w danym materiale poszukiwany, gdyż od tego zależy dobór właściwych starterów. Wydaje się, że już w niedalekiej przyszłości będziemy mogli posługiwać się metodami, które nie będą obciążone wadami metod stosowanych obecnie.

W roku 1966 wprowadzono do nauki nowy przyrząd, zwany mikromacierzą lub czujnikiem (chipem) DNA, wykorzystujący znany fakt łączenia się ze sobą (hybrydyzacji) pojedynczych nici kwasów nukleinowych, jeżeli odpowiadają sobie sekwencje zasad w tych niciach. Mikromacierz składa się z płytki o bokach długości kilku centymetrów, na której umocowane są, w ściśle określonych miejscach (plamkach), zestawy jednoniciowych cząsteczek DNA (sond). Cząsteczki DNA obecne w badanej przez nas próbce znakujemy, np. fluoroforami, i nanosimy na mikromacierz. Zachodzą reakcje łączenia się komplementarnych nici, a wynik tych reakcji odczytywany jest w odpowiednim detektorze fluorescencji i przekształcany komputerowo w barwny obraz. Pierwotnie mikromacierze służyły do wykrywania obecności określonych genów w badanej próbce tkanki lub określania ekspresji tych genów; w tym ostatnim przypadku macierz tworzą cząsteczki mRNA będące transkryptami tych genów (4, 5). Jeżeli skonstruujemy mikromacierz zawierającą sondy DNA reagujące z odpowiednio dobranymi genami zarazków, wtedy wykrywając obecność tych genów w badanym materiale klinicznym, wykrywamy obecność tych zarazków w organizmie w czasie mniejszym niż jedna godzina. Jeżeli mikromacierz będzie zawierała także sondy reagujące z genami warunkującymi oporność na leki oraz genami kodującymi czynniki wirulencji, ustalamy jednocześnie właściwości chorobotwórcze tych zarazków (np. wytwarzanie określonych toksyn) oraz ich wrażliwość na leki. Byłoby to szczególnie pomocne, np. w monitorowaniu leczenia nosicieli HIV, u którego bardzo szybko dochodzi do mutacji skutkujących opornością na leki antyretrowirusowe (6, 7). Obecnie prowadzone są intensywne badania nad przystosowaniem techniki mikromacierzy do celów diagnostycznych (8, 9, 10, 11, 12).

Jest kilka typów mikromacierzy; głównie używane są cztery z nich - mikromacierze o wysokiej gęstości, mikromacierze nakrapiane, mikromacierze kuleczkowe i mikromacierze elektroniczne (12). W mikromacierzy o wysokiej gęstości, stosowane są sondy w postaci oligomerów DNA o długości 10-30 zasad. Tworzą one na podłożu skupiska o gęstości $> 10^6/\text{cm}^2$. Mikromacierze nakrapiane posiadają na swojej powierzchni plamki o średnicy 50-200 μm z naniesionymi oligomerami o długości 20-100 zasad ($\sim 10^4/\text{cm}^2$). Mikromacierze kuleczkowe składają się z populacji mikroskopijnych kuleczek z polimeru (średnica $\sim 1-5 \mu\text{m}$) zawierających różne fluorofory. Każdy typ kuleczek posiada na swojej powierzchni odpowiedni fragment DNA. Odczyt odbywa się w cytometrze przepływowym lub optycznie przez pomiar względnej fluorescencji wykazywanej przez każdy fluofofor. W mikromacierzach elektronicznych sondy oligonukleotydowe upakowane są stosunkowo rzadko ($< 10^2/\text{cm}^2$) na mikroelektrodach. Hybrydyzacja DNA z sondą wywołuje mierzalne zmiany voltametryczne. Mikroelektrody

mogą również być stosowane w celu elektrostatycznego związania sondy i późniejszej detekcji fluorescencyjnej ewentualnego połączenia z docelowym DNA.

Dalszy rozwój tej metody badawczej doprowadził do powstania mikromacierzy białkowych. Mikromacierze te pozwalają bardzo dokładnie określić typ, a także ilość białek w badanej próbce. W odróżnieniu od mikromacierzy DNA, tutaj na płycie umieszcza się cząsteczki białek, które najczęściej są przeciwciałami dla wykrywanych przez nas białek. Po związaniu się tych białek z przeciwciałami, nakraplamy na mikromacierz przeciwciała sprzęgnięte z fluoroforami, które wiążą się z kolei z białkami związanym uprzednio przez przeciwciała mikromacierzy. Jeżeli mikromacierz będzie utworzona z antygenów, możemy wykrywać obecne przeciwciała. Podobnie jak w przypadku mikromacierzy DNA, wyniki odczytuje detektor fluorescencji komunikując nam, jakie białka są obecne w badanej surowicy (13). Dostępne są już mikromacierze białkowe pozwalające na szybkie, jednoczesne wykrywanie przeciwciał przeciwko różnym antygenom HIV-1 i HIV-2 oraz wirusów zapalenia wątroby. Prowadzone są również prace nad skonstruowaniem mikromacierzy mieszanych - zawierających zarówno czujniki DNA jak i czujniki białkowe.

Głównymi zaletami stosowania mikromacierzy w diagnostyce zakażeń jest miniaturyzacja procesu analitycznego, jego przyspieszenie i synchronizacja. Miniaturyzacja pozwala na minimalizowanie ilości materiału klinicznego koniecznego do badania, a także zmniejsza koszt odczynników. Przyspieszenie procesu analitycznego umożliwia uzyskanie wyniku w czasie mniejszym niż jedna godzina. Synchronizacja oznacza, iż mamy wgląd w bardzo wiele danych i procesów, które miały miejsce w organizmie chorego w tym samym czasie, np. jakie drobnoustroje wywołały zakażenie, jakimi charakteryzują się cechami chorobotwórczości, na jakie leki wykazują oporność, jakie w organizmie chorego są przeciwciała, jakie geny wykazują ekspresję, itp.

Trwają również prace nad innym systemem wykrywania materiału genetycznego zarazków, opartym o rozwijające się od niedawna w szybkim tempie nanotechnologie i przypominającym nieco metodę aglutynacji lateksowej (14, 15). Sondy DNA nie są tu nanoszone na płytki, lecz przytwierdzone do mikroskopijnych cząsteczek złota o średnicy 13 nanometrów. W tej postaci zawiesina taka ma barwę czerwoną. Jeżeli w badanym materiale znajdują się cząsteczki DNA zarazków, komplementarne do sond osadzonych na złocie, cząsteczki złota wiążą się ze sobą tworząc rodzaj sieci i barwa zawiesiny zmienia się na niebieską. Metoda jest bardzo czuła, ponieważ najmniejsza zmiana zabarwienia zawiesiny może być odczytywana przez odpowiednio zaprogramowany kolorometr. Możliwe jest również wykorzystanie tej metody w połączeniu z techniką mikromacierzy.

Z Krzemiński

ADVANCES IN MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

SUMMARY

Development of new methods in microbiological diagnosis of infectious diseases is described. Particularly methods which are based on techniques DNA microarray, protein microarray and nanotechnology.

PIŚMIENNICTWO

1. Richardson H, Smail F. Medical microbiology - recent advances. *Brit Med J* 1998;317:1060-2.
2. Blum HE. Molecular diagnosis of microbial infections. *Biologicals* 1996;24:193-5.
3. Germann D, Telenti A. Nucleic acid amplification methods in diagnostic virology. *J Microbiol Meth* 1995;23:31-9.
4. Lockhart D, Winzeler W. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000;405:827-36.
5. Shoemaker DD. Experimental annotation of human genome using microarray technology. *Nature* 2001;409:922-7.
6. Shafer RW. Genotyping testing for Human Immunodeficiency Virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:247-77.
7. Cingolani A, Antinori A. Usefulness of monitoring antiretroviral genotypic resistance and adherence in HIV-1 infected individuals failing HAART. *AIDS* 2002;16:369-79.
8. Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, i in. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3258-63.
9. Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, i in. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40:2398-407.
10. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, i in. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4720-8.
11. Wang D, Coscoy L, Zylberger M, i in. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15687-92.
12. Stenger DA, Andreadis JD, Vora GJ, i in. Potential applications of DNA microarrays in biodefense-related diagnostics. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:208-12.
13. Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001;2:1-13.
14. Demers LM, Ostblom M, Zhang H, i in. Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold. *J Am Chem Soc* 2002;124:11248-9.
15. Nam JM, Park SJ, Mirkin CA. Bio-barcode based on oligonucleotide-modified nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2002;124:3820-1.

Adres autora:

Zbigniew Krzemiński
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź