

**UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
NICOLAE TESTEMIȚANU**

CENTRUL REPUBLICAN DE DIAGNOSTICARE MEDICALĂ

**METODE MOLECULAR-GENETICE
DE CERCETARE (PCR) ÎN
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR
AL INFECȚIILOR
(Recomandări metodice)**

**Chișinău
Centrul Editorial-Poligrafic *Medicina*
2009**

CZU 616.97(076.5)

M 61

Aprobat la ședința Comisiei metodice departamentale de profil, de
Consiliul metodic central al USMF *Nicolae Testemițanu* la 29.05.08.

Autori: *Vladimir Nahaba*, dr. med., conferențiar universitar la catedra
Microbiologie, Virusologie și Imunologie
Greta Balan, dr. med., asistent universitar la catedra
Microbiologie, Virusologie și Imunologie
Mariana Popa, medic laborant, categorie superioară, Centrul
Republican de Diagnosticare Medicală
Victor Popescu, dr. biol., cercetător științific superior,
Laboratorul de Genetică al USMF
„Nicolae Testemițanu”

Recenzenți: *Radu Cojocaru* – dr. med., colaborator științific principal al
CNSPMP

Ludmila Mutoi – șef al Laboratorului de bacteriologie
generală al CNSPMP

Redactor științific: *Ștefan Plugaru*, dr. med., profesor universitar, șef
catedră Microbiologie,
Virusologie și Imunologie

Redactor: *Lidia Căssa*

Machetare computerizată: *Ala Livădar*

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAȚIONALE A CĂRȚII

Metode molecular-genetice de cercetare (PCR) în diagnosticul de
laborator al infecțiilor: (Recomandări metodice) / Vladimir Nahaba,
Greta Balan, Mariana Popa [et al.] ; red. șt.: Ștefan Plugaru ; Univ. de
Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Centrul Republi-
can de Diagnosticare Medicală. - Ch. : CEP „Medicina”, 2009. – 28 p.
Bibliogr.: p. 22 (10 tit.), 50 ex.

ISBN 978-9975-915-95-3

CZU 616.97(076.5)

M 61

ISBN 978-9975-915-95-3

© CEP *Medicina*, 2009

© V. Nahaba, G. Balan și alții, 2009

CUPRINS

1. Introducere, destinația și domeniul de aplicare.....	4
2. Organizarea materialului genetic la procariote.....	5
3. Principiile PCR.....	7
4. Avantajele metodei real time PCR.....	14
5. Utilizarea PCR în diagnosticul infecțiilor sexual transmise- bile.....	15
6. Reguli de recoltare a materialului biologic pentru investi- gațiile PCR în infecțiile urogenitale.....	18
7. Bibliografie selectivă.....	22
8. Anexe.....	23

ABREVIERI

ADN – acidul dezoxiribonucleic

ARN – acidul ribonucleic

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

IS – segmente insertante

kDa – kilodaltoni, unitate de măsură a masei moleculare

RT-PCR – *engl. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, rom. Reacție de Reverstranscripție și Polimerizare în Lanț*

RT – reverstranscriptaza

Taq-polimeraza – ADN polimerază – o enzimă termostabilă extrasă din bacteriile *Thermus aquaticus* (microorganism termofil)

REAL TIME PCR – metoda de determinare cantitativă a produselor PCR nemijlocit în timpul amplificării

1. INTRODUCERE, DESTINAȚIA ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Prezentul document este destinat ridicării nivelului de cunoștințe al medicilor de familie și al medicilor specialiști la compartimentul Diagnosticul molecular-genetic al infecțiilor sexual transmissibile.

Decelarea și identificarea agenților maladiilor infecțioase este una din problemele fundamentale ale microbiologiei medicale contemporane. În timpul examinărilor microbiologice apar situații când utilizarea metodelor tradiționale de cultivare și metodelor imunochimice contemporane de diagnostic nu sunt suficiente pentru identificarea germenilor, ceea ce impune crearea și implementarea metodelor noi de izolare și identificare a microorganismelor.

În ultimele decenii are loc dezvoltarea intensă a metodelor genetice de diagnostic al maladiilor infecțioase, bazate pe detectarea succesivității nucleotidelor specifice din ADN-ul agenților infecțioși. Lider printre aceste metode este reacția de polimerizare în lanț sau în limba engleză *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

La finele anilor 80 ai secolului XX a fost elaborată metoda de amplificare ciclică (multiplicare) a fragmentelor genomice din ADN. Implementarea lor în diagnosticul microbiologic clinic a permis simplificarea și accelerarea identificării microorganismelor după markerii genetici. Aceasta oferă posibilitatea de a mări considerabil eficacitatea depistării agenților patogeni, astfel majorând posibilitățile potențiale ale diagnosticului de laborator și stabilirea diagnosticului clinic corect.

Unul din motivele de reținere a implementării mai ample a metodei PCR în practica de laborator este nivelul insuficient de informare a lucrătorilor medicali despre abordarea metodică și utilizarea acestei metode. Aceasta este determinată, într-o oarecare măsură, de perioada scurtă a utilizării PCR în diagnosticul clinic, limitarea informației despre posibilitățile ei potențiale și particularitățile utilizării. Recomandarea metodică propusă are domeniul de aplicare în sistematizarea informației despre unele baze teoretice și

practice a utilizării PCR în diagnosticul de laborator și de a vizualiza spectrul posibilității metodei în practica clinică.

2. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC LA PROCARIOTE

Baza materială a eredității, ce determină particularitățile genotipice și fenotipice ale microorganismelor, este acidul dezoxiribonucleic (ADN) la bacterii și ADN sau ARN (acidul ribonucleic) la virusuri. Fragmentele ADN-ului constituie gene aparte. Specificul construcției chimice a moleculei de ADN depinde de amplasarea reciprocă a patru baze azotate – două purinice (adenină și guanină) și două pirimidinice (citozină și timină sau uracilul în ARN). În afară de bazele azotate în componența acizilor nucleici intră glucide, ce au câte 5 atomi de carbon. Una din zaharuri este dezoxiriboza (ce intră în componența ADN), a doua este riboza (ce intră în componența ARN). Fiecare bază azotată, legată de riboză sau dezoxiriboză, se numește nucleozidă. La fixarea nucleozidelor cu rămășițele acidului fosforic se formează nucleotide, care în funcție de baza azotată se numesc nucleotide cu adenină, guanină, citozină, timină sau uracil. Nucleotidele sunt monomerii din care se formează catenele polinucleotidice ale ADN sau ARN.

Molecula de ADN are o structură bicatenară, menținută cu ajutorul legăturilor de hidrogen dintre bazele azotate complementare (timină-adenină și citozină-guanină). La încălzire și răcire bruscă sau prelucrarea cu hidroxizi și alți agenți are loc denaturarea ADN-ului, cu ruperea legăturilor de hidrogen mai slabe. Drept consecință, se obțin două monocatene separate, complementare care pot fi utilizate în calitate de matriță pentru sinteza catenelor noi de ADN. Sinteza catenelor noi de ADN are loc cu participarea unui șir de enzime, printre care un rol important îi revine ADN-polimerazei. Acțiunea ei determină creșterea moleculei noi în direcția de la 5' la 3'-dezoxiriboză pe o matriță monocatenară. Procesul de sinteză a ADN-ului are loc foarte intensiv – timp de 1 sec. La matrița ADN se alătură aproximativ 500 nucleotide.



Fig. 1. ADN – 2 catene compuse din nucleotide cu o anumită consecutivitate.

Cromozomul bacterian, spre deosebire de cromozomii eucariotelor, reprezintă o moleculă de ADN circulară. ADN-ul (nucleoidul) bacterian are masa moleculară de circa 2×10^9 kDa și conține până la 4 mii gene necesare pentru menținerea viabilității bacteriilor și multiplicării lor. Pe lângă cromozomul (nucleoidul) bacterian, unele bacterii posedă elemente genetice extracromozomiale – plasmide, transpozoni și IS (segmente insertante) succesivități, care la fel sunt reprezentate de molecule ADN, deosebindu-se unele de altele prin masa moleculară, volumul informației codificate, capacitatea replicării autonome și alte particularități. Elementele genetice extracromozomiale nu au importanță vitală pentru celulă, deoarece nu conțin informație despre sinteza enzimelor ce participă în metabolismul plastic și energetic. Cu toate acestea, ele pot conferi bacteriilor unele proprietăți selective, cum ar fi rezistența la antibiotice sau factorii de patogenitate.

Plasmidele – fragmente de ADN cu masa moleculară 10^6 – 10^8 kDa, poartă până la 40–50 gene cu funcție reglatorie (compensarea defectelor metabolice) și de codare (informație despre noile particularități). Ele pot fi integrate în nucleoid sau se află în stare liberă sub formă de inel închis, cu toate acestea, plasmidele sunt capabile de replicare autonomă. Sunt cunoscute aproximativ 30 varietăți de plasmide (rezistența la antibiotice, bacteriocinogeneză, toxinogeneză), unele dintre care pot servi țintă în diagnosticul PCR.

Transpozonii – elemente genetice migratoare, reprezentând fragmente de ADN cu lungimea de până la 25000 perechi de nucleotide ce poartă informația necesară pentru transpoziția proprie. Transpozonii sunt lipsiți de proprietatea de replicare autonomă, dar se replică în stare integrată în moleculele de ADN. La replica-

rea transpozoniilor, în componența genomului bacterian, copiile lor noi se pot integra, ulterior, în plasmide, conducând astfel la deleții sau inserții în genomul bacterian sau chiar se integrează în genomul fagilor având capacitatea de a răspândi această informație printre alte microorganisme. Transpozonii pot deține informația despre sinteza toxinelor microbiene, despre sinteza enzimelor ce modifică sau degradează antibioticele.

Succesivitățile insertante (*elementele – IS*) sunt elemente migratoare la nivelul genomului cu mărimea de până la 1500 perechi de nucleotide, ce codifică sinteza enzimelor necesare pentru transpoziția proprie. Acestea nu se întâlnesc în stare liberă. În timpul migrării ele provoacă inactivarea (deconectarea) sau activarea (conectarea) genelor, deleții sau inversii la integrarea în cromozomul bacteriei. Pe lângă aceasta, elementele *IS* coordonează interacțiunea plasmidelor, fagilor moderați și transpozoniilor cu cromozomul bacterian și determină recombinarea lor.

Genomul viral este format din acizi nucleici, reprezentând molecule monocatenare (ADN sau ARN) sau dublucatenare (ADN sau ARN). Virusurile ARN constau din molecule mono- sau dublucatenare, iar la unele virusuri catenele pot fi segmentate. Fragmentarea genomului amintește cromozomii eucariotelor, deoarece ARN-ul fragmentat poartă mai multă informație decât molecula obișnuită de ARN.

3. PRINCIPIILE PCR

Reacția de polimerizare, deci sinteza cu ajutorul enzimei ADN-polimeraza a moleculelor noi de ADN (replicarea), în celulă a fost descoperită mai mult de 30 ani în urmă de A. Cornberg, care împreună cu alt laureat al premiului Nobel – Dj. Lederberg au expus ideea, că cu ajutorul acestei reacții se pot obține cantități mari de ADN. Această idee a fost realizată peste mai mult de 20 ani de către Carry Mullis, laureat al premiului Nobel în chimie, anul 1993. Astfel, C. Mullis, bazându-se pe procesul natural al replicării ADN-ului, a elaborat metoda cu ajutorul căreia se pot

obține copii ale anumitor porțiuni ale genelor în cantități nelimitate într-un tub (in vitro). Această metodă a fost numită reacția de polimerizare în lanț, ea a devenit una dintre cele mai comode și utilizate metode de diagnosticare a ADN-ului.

Prima publicație despre aplicarea practică a PCR a apărut în anul 1985. De atunci tehnologia PCR a suportat multiple modificări.

Utilizarea metodei PCR oferă posibilitatea de determinare rapidă, cu specificitate înaltă a particularităților construcției genetice a organismului viu. În baza metodei propuse de C. Mullis, au apărut procedee, ce permit majorarea semnificativă a posibilităților metodei PCR propuse inițial și diminuarea neajunsurilor ei. Actualmente, identificarea ADN/ARN-ului și determinarea genotipului microorganismelor, deci genotipizarea poate fi realizată cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț.

Modificările metodei PCR: multiplex PCR, PCR în cuib, LCR (*Ligase chain reaction*), SDA (*Stand displacement amplification*), PCR în regimul timpului real etc.

La baza metodei PCR este procesul de sinteză *in vitro* a unui anumit segment-țintă din catena ADN, sub acțiunea enzimei ADN dependente numită *Taq-polimeraza* care exercită citirea și consecutiv legarea nucleotidelor, complementare cu catena ADN matriță (maternă) și formarea catenei noi de ADN (fiică). Sinteza catenei noi se inițiază în anumite puncte stabilite de-a lungul ADN – *situsuri de inițiere PCR*. Pentru inițierea sintezei, alături de ADN-ul matriță, se folosesc două porțiuni polinucleotidice, monocatenare, de dimensiuni relativ mici, complementare cu *situsurile de inițiere PCR* din ADN-ul matriță, numite *amorse (praimer)*. În primul ciclu PCR se inițiază sinteza polinucleotidului de la amorse spre capetele moleculei de ADN, iar în ciclurile următoare – de la amorse spre capetele generate în primul ciclu PCR (corespund *situsurilor de inițiere PCR*). Cu cât mai mari sunt dimensiunile amorsoarelor, cu atât mai înaltă este specificitatea cu care ele se hibridizează cu segmentul ADN (probabilitatea întâlnirii unei anumite succesivități din cinci nucleotide este mai mare, decât din zece).

Însă secvențele foarte lungi pot să nu se întâlnească în segmentul de genom examinat, de aceea de obicei lungimea amorselor constituie 20–30 nucleotide.

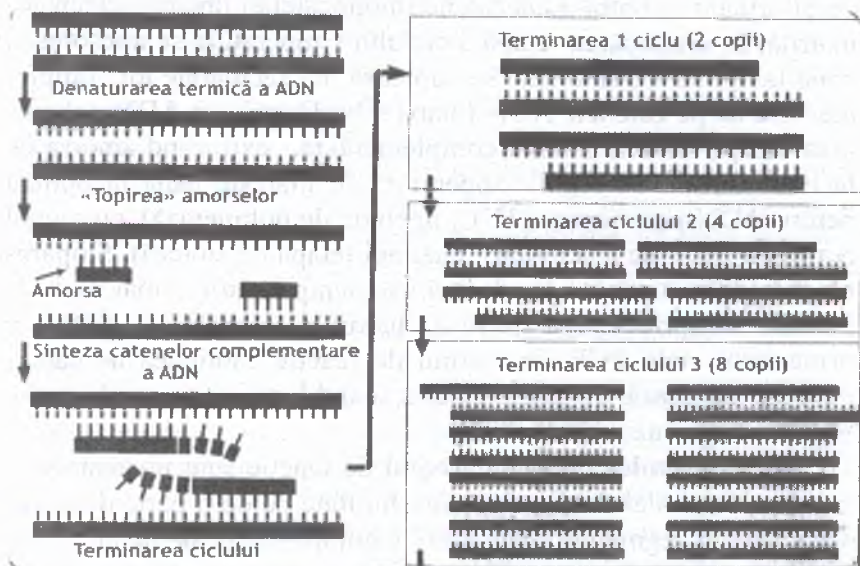


Fig. 2. Schema PCR.

Amorsele sunt complementare secvențelor ADN-ului pe un sector determinat al spiralei duble de ADN. Acest sector este situat între amorse care limitează construirea catenei noi de ADN. După cuplarea amorselor cu matricea ADN, Taq-polimeraza extinde extremitatea 3' a amorsei, construind catena nouă (fiică) complementară, ea fiind o copie a catenei inițiale de ADN.

Reacția de polimerizare în lanț este un proces ciclic de sinteză a copiilor noi ale unui fragment de ADN selectat, care are loc sub formă de alternare a parametrilor temperaturii mediului de reacție. Mediul de reacție trebuie să conțină: matricea-ADN, dezoxinucleozidtrifosfați, ADN-polimerază, amorse, la fel adaosuri suplimentare care optimizează procesul de polimerizare, $MgCl_2$, soluție tampon pentru Taq-polimerază.

Ciclul PCR începe cu denaturarea catenelor de ADN prezente în mediul de reacție. Aceasta are loc la temperatura de $\approx 92-95^{\circ}\text{C}$, legăturile de hidrogen dintre catene se rup (etapa de denaturare), drept urmare se obțin două catene (monocatene) liniare – catenele-matriță. În următoarea etapă a ciclului temperatura se micșorează până la $45-70^{\circ}\text{C}$, amorsele se cuplează cu sectoarele lor complementare de pe catenele ADN (etapa hibridizare), iar ADN-polimeraza începe sinteza catenei complementare, extinzând amorsa de la extremitatea 3'. Apoi temperatura se mărește până la optimă pentru ADN-polimerază (72°C , depinde de polimerază), cu scopul realizării maxime a activității enzimei (etapa de sinteză). Stoparea reacției de sinteză are loc la mărirea temperaturii – mai mult de 92°C , ADN-polimeraza finisează lucrul cu catenele de ADN. În urma unui ciclu PCR, în mediul de reacție cantitatea de catene ADN se dublează, pe lângă aceasta se dublează și numărul sectoarelor recunoscute de amorse.

După al doilea ciclu, în mediul de reacție sunt prezente segmente ale spiralei duble, care sunt limitate pe de o parte de prima amorsă (sau segmentul de cuplare a amorsei doi), pe de altă parte – de segmentul de cuplare a amorsei doi (sau de prima amorsă), mai departe de această extremitate dublă polimeraza nu mai acționează. După despărțirea catenelor și termodenaturarea amorsoarelor corespunzătoare, limitate de ambele părți, fragmentele de ADN se vor acumula în progresie geometrică.

După 35–40 de cicluri, cantitatea fragmentelor ADN sintetizate (ampliconi) atinge câteva milioane de copii și este ușor de detectat cu ajutorul metodelor de electroforeză în gel, în prezența colorantului fluorescent, care se cuplează nespecific cu moleculele acizilor nucleici.

În comparație cu metodele tradiționale de identificare a agenților maladiilor infecțioase (izolarea culturii pure și identificarea ei după semnele-cheie, diagnosticul imunofluorescent, imunofermenativ cu utilizarea anticorpilor policlonali și monoclonali etc.), metoda PCR cu utilizarea amorsoarelor specifice posedă avantaje evidente (*tab.*).

Avantajele metodei PCR

Parametrii	Caracterizarea
Sensibilitate înaltă	Metoda este bazată pe principiul exponențial de acumulare a produsului amplificat, pentru identificare este suficientă prezența în proba testată a unui număr limitat de agenți.
Specificitate înaltă	Bazătă pe identificarea secvențelor de material genetic unice pentru microorganism, ce determină particularitățile de clasă, toxicitate și alte particularități specifice ale agentului patogen.
Timp scurt de efectuare	2-6 ore de la începutul examinării.
Procedură universală de executare	Procedura de efectuare a reacției este aplicabilă practic pentru toți agenții patogeni.
Materialul biologic	Agentul patogen poate fi identificat în orice lichid biologic al organismului uman și de asemenea în materialele obținute în urma biopsiei. Nu este necesară creșterea culturii pe medii sau izolarea culturii curate de agent patogen.
Diagnosticul diferitor procese patologice	Este posibil diagnosticul formelor acute, cronice, trenante, seronegative.
Diagnosticul microorganismelor cu posibilități reduse de cultivare	Identificarea microorganismelor ce pot fi cultivate, microorganisme ce nu pot fi cultivate, forme persistente.
Perioada bolii	Este posibilă identificarea agentului patogen nu numai în perioada de stare sau cronică, dar și în perioada de incubare a bolii - „fereastra imunologică”, perioada dintre momentul infectării și apariția anticorpilor sau antigenelor specifice (depistarea ADN-ului,
	ARN-ului după o săptămână sau două de la momentul infectării).

Metoda	Este metodă directă de identificare a agentului patogen, bazată pe modalitatea universală de păstrare și transmitere a informației genetice la materia vie.
--------	---

Pentru cele mai sensibile metode microbiologice de diagnostic este necesară izolarea culturii pure și identificarea lor după particularitățile fenotipice, numărul de celule trebuie să constituie 10^3 – 10^5 . Examenul PCR poate fi efectuat atât cu cultură pură, cât și cu prelevatele clinice (lichid biologic, lavaje faringiene, mucoasa nazală, apa, solul etc.), determinând câțiva germeni concomitent.

În afară de metoda PCR expusă, bazată pe decelarea fragmentului specific de ADN, este propusă metoda PCR cu utilizarea amorselor nespecifice, aleatorii, ce conțin 6–15 nucleotide care se cuplează cu fragmente de ADN nedeterminate din timp, dar repartizate pe ADN întâmplător. Cu toate acestea, are loc amplificarea unor fragmente, locul cărora nu este cunoscut, însă setul de fragmente amplificate obținut este unic pentru microorganismul în cauză. Astfel de procedură se utilizează, de exemplu, la determinarea poziției taxonomice a speciilor înrudite, la deosebirile dintre tulpinile izolate ale unei specii de microorganisme și alte cazuri asemănătoare. În utilizarea amorselor aleatorii, lungimea cărora poate fi mai scurtă decât a celor specifice și la care lipsesc criteriile de specificitate apare problema izolării prealabile a culturii pure de microorganisme comparabile, deoarece prezența diferitor genoame în concentrații comparabile conduce la nedeterminarea rezultatelor obținute la compararea genoamelor înrudite. Prezența ADN plasmidic sau fagic extracromozomial la fel va complica interpretarea rezultatelor.

Pentru amplificarea simultană a două sau mai multe secvențe ADN-țintă, pe larg se utilizează multiplex PCR. Este un proces de coamplificare a câtorva matrice ADN într-un mediu de reacție cu utilizarea diverselor perechi specifice de amorse, ce permit deter-

minarea concomitentă a prezenței factorilor de virulență și de rezistență la preparatele antibacteriene și antivirale.

Una dintre cele mai răspândite variante ale PCR este PCR în cuib (nested PCR), care se efectuează cu utilizarea a două seturi de amorse pentru amplificare, unul direcționat către produsul de amplificare al celuilalt set și două runde de amplificare. Acest procedeu are drept scop creșterea sensibilității PCR prin reamplificarea directă a produsului primei reacții. În prezent sunt folosite două tipuri de PCR în cuib: cu două tuburi și cu un tub. În prima variantă, primul set de amorse este introdus în amestecul PCR și amplificată 15–30 cicluri. Apoi tubul este deschis și produsul transferat în al doilea tub, care conține celălalt set de amorse, complementar produsului primei reacții și care se leagă de capătul intern 3' al setului 1. A doua rundă de amplificare comportă 25–30 cicluri. În varianta a doua, amestecul de reacție conține ambele seturi de amorse. Seturile de amorse sunt proiectate astfel încât setul 1 hibridează la o temperatură semnificativ mai scăzută comparativ cu setul 2. PCR este inițial pornită la temperatura optimă a setului 1, din care rezultă un amestec de produși obținut din primul și al 2-lea set de amorse. O modificare a temperaturii optime superioare pentru setul 2 favorizează amplificarea produsului intern (încubat) al setului 2 de amorse. Avantajele PCR în cuib derivă din marea putere de amplificare a acestei metode. Deși avantajele sunt evidente, PCR în cuib are și unele dezavantaje. Cea mai serioasă problemă este de ordin tehnic și se asociază sistemului cu două tuburi. Deoarece acest procedeu implică deschiderea primului tub și transferul în al doilea, apare riscul contaminării mediului cu aerosoli. Altă latură care complică reacția este faptul că produsul primei runde de amplificare nu poate fi inactivat și este disponibil pentru a doua etapă.

Pentru identificarea ARN se aplică metoda RT-PCR (*engl. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, rom. Reacție de Reverstranscripție și Polimerizare în Lanț*). În acest caz, datorită activității unei enzime suplimentare – reverstranscriptaza (RT) – prima etapă a reacției este formarea fragmentelor monocatenare de

ADN pe ARN-matriță, care apoi servesc drept matriță pentru amplificare cu ajutorul enzimei *Taq-polimeraza*. De regulă, RT este izolată din virusurile – *Avian Myeloblastosis Virus* sau *Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV RT)*. M-MuLV RT este o ADN-polimerază dependentă de ARN sau ADN. Deci această enzimă poate utiliza molecule de ARD sau ADN pentru a iniția sinteza de ADN. Totodată, ea posedă activitate ribonucleazică H orientată spre ARN-ul din moleculele hibride ARN-ADN. Pentru a realiza practic anumite reacții de reverstrascriptie, se pot utiliza diverse protocoale de operare (de exemplu, *anexa 2*).

La efectuarea reacției RT-PCR se cere ca în mediul de reacție să fie prezente amorse, dar și amestecul dezoxinucleozidtrifosfatic (*dNTP*). După efectuarea reacției RT-PCR, moleculele obținute de ADN pot servi drept țintă pentru efectuarea PCR, unde în calitate de ADN polimerază se utilizează o enzimă termostabilă extrasă din bacteriile *Thermus aquaticus* (microorganism termofil). Pentru a realiza practic anumite reacții PCR, se pot utiliza diverse protocoale de operare (de exemplu, *anexa 3*).

4. AVANTAJELE METODEI REAL TIME PCR

Metoda de determinare cantitativă a produselor PCR nemijlocit în timpul amplificării (*engl. Real Time*) devine una dintre cele mai populare metode atât în diagnosticul clinic, cât și în cercetările științifice. Omiterea în acest caz a etapei detecției prin electroforeză, permite excluderea totală a contaminării cu produsele de reacție. Aceasta face posibilă amplasarea laboratorului PCR într-o singură încăpere, practic pe o masă. Pe lângă acestea, metoda mai deține un șir de avantaje, cum ar fi posibilitatea determinării cantitative a materialului inițial, detectarea paralelă a mai multor infecții într-o singură mostră.

Succesele tehnologiilor fluorometrice, la fel elaborarea utilajului, ce permite determinarea concentrației ampliconilor nemijlocit în timpul reacției, au condus la elaborarea metodei *Real Time*

PCR. Implementarea acestei metode în practica de laborator a permis de a se renunța total la etapa de înregistrare:

- ✓ de a înlătura posibilitatea contaminării cu produsele de reacție;
- ✓ de a micșora cerințele față de organizarea procesului de laborator, de a efectua metoda PCR într-o încăpere;
- ✓ de a micșora cheltuielile și timpul analizei.

Metoda se bazează pe măsurarea semnalului fluorescent în fiecare ciclu de amplificare. Intensitatea semnalului este proporțională cu concentrația produsului final al PCR. O particularitate importantă a metodei este sincronizarea înregistrării și amplificării. Aceasta oferă posibilitatea determinării cinetice a procesului, care depinde de cantitatea inițială a materialului examinat.

Datorită posibilităților determinării cantitative și analizei concomitente a câtorva parametri, metoda oferă examinatorului posibilități noi în diagnosticul genetic.

5. UTILIZAREA PCR ÎN DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR SEXUAL TRANSMISIBILE

Actualmente se cunosc peste 20 de infecții sexual transmisibile.

Tradiționale sau clasice sunt: sifilisul, gonoreea, șancrul moale, limfogranulomatoza venerică (limfogranuloma inghinală, a 4-a maladie venerică), granuloma venerică (donovanoza, granuloma inghinală, a 5-a maladie venerică).

Conform clasificăției OMS, într-o grupă aparte sunt incluse maladiile ce se transmit preponderent pe cale sexuală și afectează organele genitale: hlamidioza, trihomonioza, vulvovaginitele candidozice și balanopostitele, micoplasmoza, herpesul genital.

Clasificarea germenilor infecțiilor sexual transmisibile.

A. Bacterii: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Shigella species*, *Gardnerella vaginalis*.

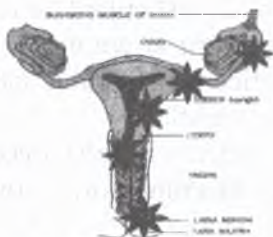
B. Virusuri: *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus hominis*, *Hepatitis B virus*, *Papillomovirus hominis*, *Molluscovirus hominis*, *Human immunodeficiency virus*.

C. Protozoare: *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Lambliia intestinalis*.

D. Levuri: *Candida albicans*.

E. Ectoparaziți: *Phthirus pubis*, *Sarcoptes scabiei*.

Localizarea agenților infecțiilor sexual transmisibile



Regiunea urogenitală:
Toate infecțiile sexual
transmisibile



Regiunea anală:
C.trachomatis, *N.gonorrhoeae*,
T.pallidum, *HSV*



Regiunea naso-faringeală:
C.trachomatis, *N.gonorrhoeae*,
Mollicutes, *T.pallidum*, *C.albicans*, *HSV*

Simptome sistemice:
C.trachomatis, *N.gonorrhoeae*,
Mollicutes, *T.pallidum*, *C.albicans*, *HSV*,
CMV, *HIV etc.*

Agentul patogen al gonoreei – *Neisseria gonorrhoeae*

Diagnosticul gonoreei se baza pe metoda microscopică și bacteriologică. Metoda microscopică este economă, însă sensibilitatea

metodei se micșorează până la 40–70% la examinarea frotiurilor de la bolnavii cu infecție asimptomatică. Metoda bacteriologică este înalt specifică și sensibilă, însă posedă un șir de dezavantaje.

Actualmente, trusele pentru diagnosticul PCR al gonoreei depășesc metoda bacteriologică după specificitate și sensibilitate. Nivelul înalt al eficacității diagnosticului este realizat chiar și la utilizarea probelor recoltate prin metode neinvazive (de exemplu, urina).

Importanța metodelor molecular-genetice în diagnosticul gonoreei la fel se mărește datorită posibilităților PCR de a identifica gene și mutații ce răspund de antibioticorezistență.

Agenții etiologici ai micoplasmozelor și ureaplasmozelor – genurile *Mycoplasma* și *Ureaplasma*

Micoplasmatele pot provoca infecții respiratorii acute și cronice, pneumonii, artrite, pielonefrite, afectarea organelor reproductivă, în cazul portajului asimptomatic pot fi cauza infertilității sau patologiei înăscute la făt.

Diagnosticul bacteriologic și serologic al micoplasmelor și ureaplasmelor, luând în considerare cerințele germenilor față de mediile nutritive și schimbările antigenice ale structurilor superficiale, este dificil, iar utilizarea metodei PCR permite rezolvarea acestor probleme.

U. urealyticum se decelează aproximativ la 50% dintre femeile examinate cu maladii inflamatorii ale organelor bazinului mic. Este demonstrat că *U. urealyticum* poate fi cauza horioamnionitelor, nașterilor înainte de termen, patologiei nou-născuților.

Examinările comparative au demonstrat, că metoda PCR este de 1,5–2 ori mai informativă decât metoda bacteriologică și serologică. Au fost elaborate amorse ce permit determinarea concomitentă (*multiplex PCR*) a câtorva germeni – **complexul TORCH** – *M. genitalium*, *U. urealyticum* și *C. trachomatis*, la fel mostrele *M. genitalium*, *U. urealyticum* și *M. hominis* într-un singur prelevat clinic.

Agenții etiologici ai hlamidiozei – genul *Chlamydia*

Un timp îndelungat, metoda bacteriologică era considerată „standard de aur” în diagnosticul hlamidiozei urogenitale. Însă această metodă nu și-a găsit o aplicare largă, deoarece necesită:

- ✓ un timp îndelungat (de la 3 până la 7 zile);
- ✓ respectarea strictă a regimului de temperatură la transportarea și păstrarea prelevatelor;
- ✓ decelarea numai a germeilor viabili.

Actualmente „standard de aur” poate fi considerată combinarea metodelor bacteriologice și molecular-genetice.

Metoda serologică de diagnostic al infecției cu hlamidii (*AIF* și *RIF directă*) posedă o sensibilitate scăzută la bolnavii cu infecție asimptomatică, la fel se înregistrează un număr considerabil de rezultate fals-pozitive din cauza reacțiilor încrucișate dintre anticorpi și lipopolizaharidele altor bacterii gram-negative.

Metoda PCR de diagnostic al hlamidiozelor este de informativitate sporită. Ea se bazează pe decelarea fragmentelor cromozomice caracteristice genomului hlamidiilor – 16S ARN ribosomală, o proteină a membranei externe specifică de gen (*MOMP*) și fragmentele plasmidei criptice.

6. REGULI DE RECOLTARE A MATERIALULUI BIOLOGIC PENTRU INVESTIGAȚIILE PCR ÎN INFECȚIILE UROGENITALE

Materialul biologic

În infecțiile urogenitale, drept material biologic pentru investigațiile PCR se utilizează:

- sânge;
- raclaj din uretră;
- raclaj din canalul cervical;
- secretul prostatic;
- sedimentul urinar.

La noi-născuți în calitate de material biologic se utilizează material de pe conjunctivă și faringe, la fetițe – raclaj de pe vulvă, la băieței – urină.

Pregătirea pacientului

Pacientul nu trebuie să primească preparate chimice (antibiotice) zece zile înainte de recoltarea materialului biologic, să nu efectueze proceduri medicale, cum ar fi: instilații, spălături vaginale.

Majoritatea agenților patogeni în infecțiile urogenitale sunt microorganisme intracelulare și se multiplică numai în celulele epitelului cilindric al uretrei sau al canalului cervical. Pentru a obține rezultate veridice este necesar ca materialul examinat să conțină maximum de epitelii și minimum de mucozități și sânge. Prezența cantităților mari de mucozități și sânge în prelevate poate conduce la obținerea rezultatelor fals-pozitive sau fals-negative.

Recoltarea materialului biologic

Criteriile obligatorii atât pentru recoltarea materialului biologic (de orice fel) pentru analizarea prin PCR, cât și pentru procesarea ulterioară a acestuia sunt:

- 1) utilizarea **instrumentarului de unică folosință sau steril**;
- 2) **marcarea** sau etichetarea corespunzătoare a conținutului eprubetelor.

Recoltarea sângelui:

Recoltarea sângelui pentru PCR se efectuează în eprubete: de plastic, de uz unic, ce conțin soluție de EDTA.

Materialul biologic din uretră:

- înainte de recoltarea materialului biologic pacientul trebuie să nu urineze 1,5–2 ore;
- înainte de recoltarea materialului biologic se prelucrează orificiul uretrei cu un tampon de vată înmuiat în soluție fiziologică sterilă;
- la prezența eliminărilor purulente se recomandă de recoltat raclajul peste 15–20 minute după urinare, în lipsa eliminărilor este necesar de efectuat masajul uretrei cu sonda de recoltare a materialului biologic;
- la femei sonda se introduce în uretră la 1,0–1,5 cm, la bărbați – la 3–4 cm și apoi se fac câteva mișcări rotative ale sondei.

La copii materialul biologic se ia numai de pe orificiul extern al uretrei;

- după recoltarea materialului sonda se introduce în eprubeta cu mediu pentru transportare. După introducerea sondei în mediul de transport sonda se rotește de câteva ori, apoi se înlătură din eprubetă;

- eprubeta se închide etanș și se marchează.

Materialul biologic din canalul cervical:

- înainte de recoltare trebuie de înlăturat mucozitatea și de prelucrat colul uterin cu un tampon de vată înmuiat în soluție fiziologică sterilă;

- sonda se introduce în canalul cervical la 0,5–1,5 cm;

- în caz de prezență a eroziilor canalului cervical, ele trebuie prelucrate cu soluție fiziologică sterilă, iar materialul e necesar să fie recoltat la hotarul dintre țesutul sănătos și cel cu patologie;

- la înlăturarea sondei trebuie evitată atingerea ei de pereții vaginului;

- după recoltarea materialului sonda se introduce în eprubeta cu mediu de transport; ulterior se rotește de câteva ori, apoi se înlătură din eprubetă;

- eprubeta se închide etanș și se marchează.

Secretul prostatei:

- înainte de recoltarea materialului biologic se prelucrează orificiul uretrei cu un tampon de vată înmuiat în soluție fiziologică sterilă;

- secretul prostatei se recoltează după masajul prealabil al prostatei;

- secretul prostatei se recoltează în eprubetă cu mediu de transport;

- eprubeta se închide etanș și se marchează.

Urina:

- se recoltează dimineața, în vas steril și chimic curat, pe nemâncate, după somn sau nu mai devreme de 2–3 ore după prima urinare;

- urina de dimineață se lasă timp de o oră, apoi se înlătură atent partea de deasupra lăsând numai aproximativ 10 ml de la fundul vasului, acest sediment se centrifughează;
- după centrifugare se înlătură urina de deasupra, iar sedimentul se transferă în eprubetă pentru PCR;
- eprubeta se închide etanș și se marchează.

Materialul biologic de pe peretele posterior al faringelui (la copii):

- sonda de unică folosință se introduce după palatul moale în nazofaringe, se șterge de câteva ori peretele posterior al faringelui;
- după recoltarea materialului sonda se introduce în eprubeta cu mediu de transport; ulterior se rotește de câteva ori, apoi se înlătură din eprubetă;
- eprubeta se închide etanș și se marchează.

Materialul biologic de pe conjunctivă (la copii):

- la prezența eliminărilor abundente acestea se înlătură cu un tampon de vată steril înmuiat în soluție fiziologică;
- materialul biologic se recoltează cu sondă sterilă de pe partea internă a pleoapei de jos;
- sonda se mișcă din colțul extern al ochiului spre colțul intern;
- în timpul recoltării trebuie de menținut pleoapa ca genele să nu se atingă de sondă;
- după recoltarea materialului sonda se introduce în eprubeta cu mediu de transport; ulterior se rotește de câteva ori, apoi se înlătură din eprubetă;
- eprubeta se închide etanș și se marchează.

Păstrarea probelor

- Probele se păstrează la temperatura dintre 4 și 8°C timp de 24 h.
- La temperatura -18°C, -20°C timp de 30 zile.
- La temperatura -70°C un timp îndelungat (ani de zile).
- Probele destinate investigațiilor cantitative pot fi păstrate (la 4 până la 8°C) timp de șase ore de la colectarea materialului biologic.

- Nu se permite congelarea repetată a materialului biologic.

Transportarea probelor

- Transportarea materialului biologic se efectuează în containere cu elemente de răcire sau în termos cu gheață.
- Containerelor trebuie să fie închise etanș, impermeabile pentru lichide.
- Containerelor trebuie etichetate corespunzător conținutului.
- Containerelor trebuie să fie produse din material rezistent la dezinfectanți, să fie autoclavabile.
- Trebuie să fie decontaminate după fiecare utilizare.

7. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Infecția cu Herpes simplex – particularități clinico-epidemiologice, de evoluție, diagnostic, tratament, profilaxie: Ghid practic / Min. Sănătății al Rep. Moldova; aut.: C. Spănu, Ludmila Bârca, Galina Rusu. - Ch.: F.E.-R „Tipogr. Centrală”, 2006, p. 15–19.

2. Ghid de diagnostic și tratament al infecțiilor cu transmitere sexuală: Elab. în baza ghidului european de management al infecțiilor cu transmitere sexuală / Asoc. Medicilor „Dermato-cosmed” din Rep. Moldova. - Ch.: „Pontos”, 2005 (Î.S.F.E.-R „Tipogr. Centrală”), p. 44, 52, 75.

3. Dumitru Buiuc, Marian Neguț. Tratat de microbiologie clinică. București, Editura Medicală, 1999, p. 550–570.

4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов / Под. ред. А. А. Воробьева. — 2-е изд., испр. и доп.— М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006, с. 114–115.

5. Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путем. М.: Мед. лит., 2004, с. 37–38, 91–92, 104–106, 139–150.

6. В.И Козлова, А.Ф. Пухнер. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. Руководство для врачей, издание 6-е, обновленное и дополненное. М., «Триада-Х», 2003, с. 142, 193, 219, 281, 349.

7. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, М.: Медицинское информационное агентство, 2003, с. 95.

8. Медицинская микробиология. Часть первая./Под ред. А.М. Королюка и В.Б. Сбойчакова, СПб, 2002, с. 118–121.

9. Медицинская вирусология. Часть вторая./Под ред. А.М. Королюка и В.Б. Сбойчакова, СПб, 2002, с. 68–79.

10. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. — М.: „Мир”, 1999, с. 395–528.

8. ANEXE

ANEXA 1. REACȚIA DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ – TESTE

Testele de mai jos sunt *complement simplu* – CS (se dă una din variantele de răspuns)

1. CS. PCR este metodă:

- A. de identificare a anticorpilor specifici;
- B. de identificare a antigenelor specifice;
- C. de cultivare a microorganismelor pe medii speciale de cultivare;
- D. de identificare a ADN/ARN-ului microorganismelor;
- E. de identificare a microorganismelor în frotiuri colorate.

2. CS. Prin metoda PCR se determină markerii hepatici specifici pentru hepatitele virale

- A. da;
- B. nu.

3. CS. Principiul PCR este bazat pe:

- A. legarea antigenelor din probă cu anticorpii fixați pe faza solidă;
- B. sinteza fragmentelor de ADN cu ajutorul fermentului ADN- polimeraza;

- C. formarea precipitatului vizibil în gel, la locul de legare a antigenelor din probă cu anticorpi;
 - D. separarea proteinelor virale în gel, prin electroforeză;
 - E. hemaglutinare.
- 4. CS. Recoltarea sângelui pentru PCR se efectuează în eprubete:**
- A. de sticlă, ce pot fi utilizate repetat;
 - B. de plastic, de uz unic, cu heparină;
 - C. de plastic, de uz unic, cu soluție de EDTA;
 - D. de plastic, cu capac, ce conțin granule de plastic;
 - E. de plastic, cu capac, ce conțin gel.
- 5. CS. Genotiparea este:**
- A. metodă de identificare a antigenelor virale;
 - B. metodă de identificare a genotipului microorganismelor;
 - C. metodă de cultivare a virusilor pe medii de cultivare;
 - D. metodă de determinare a cantității microorganismului în sânge;
 - E. metodă de identificare a anticorpilor cu ajutorul eritrocitelor marcate cu antigene specifice.
- 6. CS. Reguli generale de recoltare și prelucrare a sângelui pentru investigațiile PCR sunt:**
- A. se recoltează cu instrumentar steril;
 - B. eprubetele pot să nu fie etichetate;
 - C. la transferarea materialului biologic se folosesc vârfuri de uz multiplu;
 - D. la transferarea materialului biologic se folosesc tuburi de sticlă de uz multiplu;
 - E. sângele se recoltează în eprubete cu heparină.
- 7. CS. Identificarea ADN/ARN-ului microorganismelor se efectuează prin metoda:**
- A. ELISA;
 - B. RIA;
 - C. Testul Western-Blot;

- D. Reacția de polimerizare în lanț (PCR);
- E. Metoda hibridizării „*in situ*”.

8. CS . Etapele PCR sunt:

- A. izolarea ADN/ARN;
- B. amplificarea ADN;
- C. detecția ADN;
- D. colorarea frotiurilor cu ARN;
- E. fixarea frotiurilor cu ADN.

9. CS . Modificările PCR sunt:

- A. PCR cantitativ în regim Real Time;
- B. Genotiparea;
- C. ELISA;
- D. RIA;
- E. Testul hemaglutinării.

10. CS . Necesitatea testărilor PCR în diagnosticul hepatitelor virale:

- A. soluționarea rezultatelor suspecte la testările serologice;
- B. diagnosticul diferențial al hepatitelor virale;
- C. monitorizarea tratamentului antiviral;
- D. izolarea antigenelor și anticorpilor specifici virusurilor hepatitelor virale;
- E. purificarea plasmei bolnavului de antigenele virale.

ANEXA 2. PROTOCOL PENTRU SINTEZA ADNC (OBTINEREA PRIMEI CATENE-MATRICE CU AJUTORUL REVERSTRANSRIPTAZEI M-MULV*)

Acest protocol este destinat obținerii în două etape a ADNc prin RT-PCR

1. Componentele indicate în continuare se adaugă într-un tub Eppendorf și se amestecă ușor:

ARN extras	-ARN total sau -ARN conținând <i>poly(A)</i> sau -ARN specific	100 ng–5 μg; 10–500 ng; 0,01 pg–0,5 μg
Praimer	-oligo(dT) ₁₈ sau -hexamer aleator (engl. -random hexamer) sau -praimer specific unei gene	0,5 μg (100 pmol); 0,2 μg (100 pmol); 15–20 pmol
	Apă tratată cu DEPC	până la 12,5 μl

2. *Opțional.* Dacă ARN-ul este bogat în secvențe GC sau conține structuri secundare, amestecul de reacție se amestecă ușor, se centrifugează puțin și se incubează la 65 °C, 5 min, după care se răcește pe gheață, se centrifughează puțin și se plasează din nou pe gheață.

3. La amestecul obținut se adaugă componentele indicate mai jos în ordinea dată:

5x Soluție tampon pentru reverstranscriptază	4 μl
RiboLock™ - Inhibitor al RN-azelor	0,5 μl (20 u)
dNTP Mix, 10 mM fiecare	2 μl (concentrația finală – 1 mM)
Reverstranscriptaza M-MuLV	2 μl (40 u)
Volumul total	20 μl

Componentele date se amestecă lent și se centrifughează puțin.

4. În cazul utilizării praimerilor *oligo(dT)*₁₈ sau *specifici unor gene*, amestecul de reacție se incubează la 37°C, 60 min. Dacă în calitate de praimer se introduc *hexameri aleatori*, amestecul de

reacție se incubează la 25 °C, 10 min și apoi la 37 °C, 60 min. Pentru a realiza transcripția moleculelor de ARN bogate în secvențe GC, temperatura poate fi ridicată până la 45 °C.

5. În scopul realizării finalizării reacției, mixtura se incubează la 70 °C, 10 min. Nu este indicat să inactivăm termic enzima înainte de analizarea moleculelor de ADNc de dimensiuni mari în vederea evitării clivării acestora.

6. După finalizarea reacției de reverstranscripție, produsul ei poate fi utilizat imediat în PCR (2 μl pentru o reacție de amplificare cu volumul de 50 μl) sau păstrat la -20 °C.

**Notă:* În calitate de reagenți ce includ reverstranscriptaza M-MuLV se pot utiliza diverse seturi comercializate, echivalent "Fermentas" # EP 0351 care are capacitatea de a sintetiza molecule ADNc de circa 9 kb.

ANEXA 3. PROTOCOL PENTRU PCR CU AJUTORUL ENZIMEI Taq-POLIMERAZA

Pentru a realiza un număr mare de reacții este indicat a se prepara soluție master mix ce conține: apă, soluție tampon, dezoxinucleozidtrifosfați – dNTP, praimer și Taq-polimerază – toate într-un tub conținutul căruia, ulterior, poate fi alicvotat (distribuit) în alte tuburi în volume mai mici. Soluția cu MgCl₂ și soluția cu ADN de amplificat se adaugă ulterior. Această metodă permite minimizarea erorilor de pipetare și reduce timpul necesar operațiilor de transfer al reagenților.

Constituirea amestecului de reacție**:

1. Componentele necesare pentru PCR sunt decongelate, după care se agită ușor și se centrifughează puțin.
2. Într-un tub Eppendorf cu pereți subțiri care este plasat pe gheață se adaugă reagenții pentru PCR în ordinea redată mai jos:

Reagenți	Concentrația finală	Cantitatea de reagent în 50 μl amestec de reacție
Apă deionizată sterilă	–	variabilă
10×soluție tampon pentru Taq-polimerază	1×	5 μl

2 mM dNTP Mix	0,2 mM fiecare	5 μ l
Praimer I	0,1–1 μ M	variabilă
Praimer II	0,1–1 μ M	variabilă
Taq-polimerază	1,25 u / 50 μ l	variabilă
25 mM MgCl ₂	1–4 mM	variabilă*
ADN de analizat	10 pg–1 μ g	variabilă

* **Notă:** Pentru găsirea volumului soluției de 25 mM MgCl₂ în vederea asigurării unei anumite concentrații finale a acesteia poate fi utilizat tabelul prezentat mai jos:

** **Notă:** Pentru unele reacții poate fi direct utilizat amestecul PCR Master Mix comercializat echivalent „Fermentas” # K 0171. Înainte de reacție, la acest amestec (*Master Mix*) se adaugă praimerii și ADN-ul de analizat.

Concentrația finală a MgCl₂ în amestecul de reacție, mM	1,0	1,25	1,5	1,75	2,0	2,5	3,0	4,0
Volumul soluției 25 mM MgCl₂, μl	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8

3. Amestecul de reagenți se vortexează ușor și apoi se centrifughează puțin pentru a colecta picăturile de pe pereții tubului.

4. *Opțional* (dacă termociclorul nu este dotat cu capac termo-activ). Conținutul tubului se acoperă cu ulei mineral (jumătate din volumul amestecului de reacție).

5. Tubul (tuburile) cu amestecul total de reacție se introduce în termociclor și se include un program de amplificare ajustat în prealabil (în corespundere cu secvențele praimerilor utilizați și cu varianta polimerazei).

6. După finalizarea reacției de amplificare prin PCR convențional, produsul ei poate fi utilizat imediat pentru separarea prin electroforeză și vizualizării/fotografierii (sau pentru restricție enzimatică sau secvențiere) sau poate fi supus păstrării la – 20–70 °C.