

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ FTA® ДЛЯ СБОРА, АРХИВИРОВАНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА ДНК МИКРОСПОРИДИЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

© О. И. Соколова,^{1,2} А. В. Демьянов,³ Л. С. Боверс,⁴ Е. С. Дидье,⁴ Ю. Я. Соколова^{4,5}

¹ Медицинский факультет С.-Петербургского государственного университета,

² Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина,

³ Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия,

⁴ Национальный центр по изучению приматов при Тюлейнском университете, Новый Орлеан — Ковингтон, Луизиана, США,

и ⁵ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ электронный адрес: yusokolova@gmail.com

Технология FTA® впервые была испытана для сбора, архивирования и молекулярного анализа ДНК, содержащейся в образцах стула, с целью выявления и идентификации микроспоридий — внутриклеточных оппортунистических паразитов, вызывающих поражение кишечника и синдром мальабсорбции у людей с ослабленной иммунной системой, в частности у больных СПИДом. ДНК микроспоридий была успешно амплифицирована в 6 из 50 образцов стула ВИЧ-инфицированных пациентов Клинической инфекционной больницы им. С. П. Боткина (Санкт-Петербург). Образцы наносили на специально обработанную фильтровальную бумагу (FTA-Cards, Whatman Inc. Florham Park, NJ, США). Ампликоны (фрагменты гена рибосомной РНК) были прочитаны прямым секвенированием. Виды микроспоридий — *Encyphalitozoon intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* и *Enterocytozoon bieneusi* — идентифицированы по данным Банка генов с помощью программы NCBI BLAST. Данный метод иммобилизации ДНК на фильтровальной бумаге особенно перспективен для эпидемиологических и популяционно-полевых исследований, требующих генотипирования видов и изолятов микроспоридий.

Ключевые слова: FTA®-технология выделения ДНК, микроспоридии человека, оппортунистические протисты, ПЦР.

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция, PBS — фосфатный солевой буфер.

Исследование, недавно проведенное нами на базе Клинической инфекционной больницы им. С. П. Боткина в Санкт-Петербурге (Kusogova et al., 2011; Sokolova et al., 2011), показало, что в стуле у 19 % ВИЧ-инфицированных пациентов содержались микроспоридии — оппортунистические эукариотические микроорганизмы, родственные грибам (Keeling, Fast, 2002; Соколова, 2009). Эту группу патогенов в России никогда ранее не идентифицировали. Общеизвестно, что микроспоридии существенно ухудшают качество жизни больных СПИДом, так как вызываемое этими патогенами нарушение структуры и функции всасывающего эпителия кишечника приводит к синдрому мальабсорбции, который выражается в длительных диареях и резкой потере веса (Didier, Weiss, 2006; Huppmann, Orenstein, 2010). При правильной диагностике эти симптомы могут быть устранены с помощью соответствующих медикаментов (Kotler, Orenstein, 1998; Didier, Weiss, 2006).

Практическим результатом нашей работы стали рекомендации по проведению тестирования на микроспоридии ВИЧ-инфицированных пациентов с длительной диареей и низким иммунным статусом (титр CD4-лимфоцитов <100 клеток на 1 мл крови) (Sokolova et al., 2011).

Нами и другими исследователями показано, что наиболее адекватный метод выявления микроспоридиозов человека — это ПЦР-диагностика со специфическими праймерами. В нашем исследовании с помощью ПЦР было выявлено почти в 2 раза больше микроспоридий-положительных образцов, чем при применении гистохимических методов (окрашивание мазков стула Трихромом и Калькофлуором) (Sokolova et al., 2011). Слабая эффективность световой микроскопии для выявления микроспоридий в образцах стула объясняется мелкими размерами спор (1—1.5 мкм) и наличием многочисленных фоновых объектов, имеющих сходный с микроспоридиями характер окраски как в светлом поле при использовании Трихрома, так и в режиме эпифлуоресценции (окраска Калькофлуором).

Основные сложности ПЦР-диагностики связаны, во-первых, с наличием ингибиторов синтеза ДНК в стуле, а во-вторых — с необходимостью замораживания, хранения и транспортировки образцов, так как большинство российских клиник не имеют оборудования для проведения ПЦР-тестов. Первая проблема успешно решается применением коммерческих наборов для выделения ДНК типа QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA,

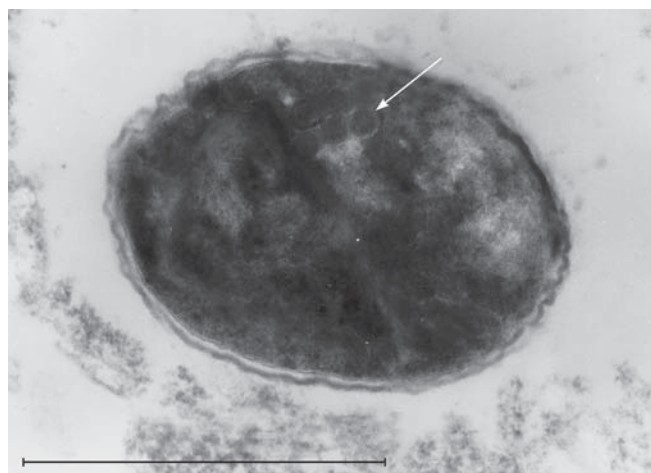
США). Поиску решения второй проблемы посвящено данное сообщение.

Одним из новых методов, используемых для хранения и амплификации генетического материала, является так называемая FTA® технология. Суть ее в том, что ДНК-содержащая суспензия наносится на специально обработанную ДНК-адсорбентами фильтровальную бумагу — FTA-карточку (FTA-Cards, Whatman Inc. Florham Park, NJ, США). В качестве ДНК-матрицы в реакции ПЦР используется ДНК, элюированная с FTA-карточки. Задачей настоящего исследования была предварительная оценка перспектив использования этой технологии для архивирования и молекулярного анализа ДНК микроsporидий из образцов стула.

Материал и методика

Для анализа с помощью технологии Whatman FTA® из 159 образцов стула (по 1 образцу от каждого пациента) случайным образом было отобрано 50 образцов, в 8 из которых ранее были выявлены микроsporидии стандартными методами ПЦР и световой микроскопии (Sokolova et al., 2011). Небольшое количество (0.5–0.7 мм) свежеразмороженного (или фиксированного 2.5%-ным $K_2Cr_2O_7$) стула отбирали деревянным аппликатором и ресуспендировали в 1 мл стандартного фосфатного солевого буфера (PBS), фильтровали через марлю и центрифугировали при 14 000 g 1 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 125–250 мкл PBS с помощью вортекса, затем 125 мкл суспензии равномерно наносили на FTA-карточку с помощью микропипетки. Карточки с суспензией высушивали на воздухе, снабжали этикетками и хранили при комнатной температуре до использования в ПЦР в течение 30 сут и более. Перед проведением реакции из карточек с помощью специального резака вырезали диски размером 2 мм в диаметре.

Дальнейшую обработку дисков для ПЦР-анализа осуществляли по инструкциям разработчика (FTA-Cards,



Электронная микроскопия: поперечный срез споры *Enterocytozoon bienersi* из образца стула.

Стрелка указывает на двойной ряд витков полярного филемента, характерной черты этого вида. Масштабная линейка — 1 мкм.

Whatman Inc. Florham Park, NJ, США). ДНК либо элюировали с помощью FTA Purification Reagent (Whatman), либо диски непосредственно погружали в реакционную смесь (1–3 диска на ПЦР-пробирку). Мишенями для вложенной (nested) ПЦР были внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) и фланкирующие регионы малой (SSU) и большой (LSU) субъединиц гена рибосомной ДНК. Состав реакционной смеси, режим ПЦР, а также все последующие манипуляции с ампликонами (электрофорез, выделение из геля и сиквенирование) были идентичны описанным ранее (Sokolova et al., 2011).

Электронно-микроскопический анализ использовали для исключения ложноположительных диагнозов и подтверждения присутствия микроsporидий. Примерно 1 мл стула ресуспендировали в PBS, фильтровали через марлю, несколько раз промывали 1 М буфером HEPES и осаждали центрифугированием при 800 g. Осадок фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом в 0.1 М HEPES и постфиксировали в 1%-ном OsO_4 . После стандартной процедуры обезвоживания в серии спиртов осадок заключали в Эпон—Аралдит. Срезы толщиной 80 нм окрашивали цитратом свинца и уранил ацетатом и просматривали в электронном микроскопе JEOL-3.

Результаты и обсуждение

ДНК микроsporидий была успешно амплифицирована лишь в 6 образцах из 50, нанесенных на FTA-карточки, против 8 положительных образцов, выявленных стандартным ПЦР и (или) методами световой микроскопии (см. таблицу). Все 6 ампликонов, полученных в ПЦР с использованием FTA-карточек (далее «бумажный ПЦР»), были успешно сиквенированы и идентифицированы по данным Генбанка с помощью программы NCBI BLAST. Однако только в 3 образцах диагноз «бумажного ПЦР» совпал с результатами ПЦР амплификации ДНК, выделенной стандартным методом (стандартный ПЦР). В двух случаях и «бумажный», и стандартный ПЦР диагностировали *Encephalitozoon intestinalis*; в одном — *E. hellem*. В 1 образце, который дал положительный ответ на микроsporидиоз в результате только светооптического, но не стан-

Результаты диагностики микроsporидий в образцах стула (n = 50) методами ПЦР и световой микроскопии

Но- мер	Код пациента	ПЦР-FTA ^a	ПЦР	СМ ^b
		элюат/диски	стандартный	Кал/Тр
1	80	—/—	Ei	+/+
2	81	—/Ei	Ei	+/+
3	114	Eh/—	Eh	—/+
4	118	—/Eb	—	—/+
5	124	Ec/Ec	—	—/—
6	137	Ei/—	Ei	—/+
7	140	—/—	Ei	—/—
8	142	—/—	Ei	+/+
9	156	—/—	Ei	+/+
10	157	Ec/Ec	Ei	+/+

Примечание. ^a При проведении «бумажного» ПЦР (ПЦР-FTA; элюат/диски) ДНК элюировали из карточек с помощью специального реагента (элюат) либо диски с нанесенной суспензией образца помещали в ПЦР-пробирку, ^b СМ — световая микроскопия; Кал/Тр — окраска Калькофлором/Трихромом. Виды микроsporидий: Ec — *Encephalitozoon cuniculi*, Eh — *E. hellem*, Ei — *E. intestinalis*, Eb — *Enterocytozoon bienersi*.

дартного ПЦР-анализа; «бумажный ПЦР» амплифицировал геномную последовательность, принадлежащую *Enterocytozoon bieneusi*. В одном случае наличие *E. cuniculi* в образце было показано исключительно с помощью «бумажного ПЦР». Наличие микроспоридий в последних двух образцах было подтверждено электронной микроскопией (см. рисунок). Заражение микроспоридиями 1 образца было выявлено и стандартным, и «бумажным ПЦР»-тестом, однако в первом случае сиквенс ампликонов показал присутствие *E. intestinalis*, а во втором — *E. cuniculi*, что говорит о двойной инфекции у данного пациента, не выявленной ранее стандартным ПЦР (см. таблицу).

ПЦР-диагностика микроспоридий практически невыполнима в большинстве клинических лабораторий как в России, так и в ряде других стран, так как для нее требуются дорогостоящее оборудование, реактивы, обученный персонал и пр. Альтернативные методы амплификации (не требующие использования дорогостоящих амплификаторов), такие как LAMP (Accelerated loop-mediated isothermal amplification) (Nagamine et al., 2002), пока находятся в стадии разработки и не дают стабильных результатов с ДНК микроспоридий. Для диагностики микроспоридий образцы стула необходимо переправлять из клиник в научные лаборатории, где такой анализ может быть выполнен. «Бумажная» технология, которой посвящено это сообщение (Whatman FTA technology, <http://www.whatman.com/>), была специально разработана и внедрена в практику, чтобы облегчить сбор, перевозку и очистку нуклеиновых кислот из различных биологических субстанций, включая образцы крови и кала (Jaravata et al., 2006).

Эту технологию уже успешно использовали для анализа ДНК вирусов, бактерий, одноклеточных и многоклеточных паразитических и свободноживущих животных и растений, а также клинических образцов (Lampel et al., 2000; Orlandi, Lampel, 2000; Beck et al., 2001; Ndunguru et al., 2005; Jamjoom, Sultan, 2009). Метод показал хорошие результаты при широкомасштабном генотипировании организмов, в частности при анализе сайтов единичного нуклеотидного полиморфизма (SNPs) в разнообразных популяционных и эпидемиологических исследованиях (He et al., 2007; Moscoso et al., 2007; Duscher et al., 2009). Специально обработанная фильтровальная бумага быстро захватывает и стабилизирует ДНК, что позволяет длительное время хранить эту ДНК при комнатной температуре. Считается, что при адсорбировании ДНК на FTA-карточки удаляется значительное количество ингибиторов ПЦР (Mullen et al., 2009).

Этот метод был успешно применен при изучении распространения и генетической вариативности микроспоридий *Kneallhazia* (= *Thelohania*) *solenopsae* из колоний огненных муравьев *Solenopsis invicta* в Техасе, США (Snowden et al., 2002). Работа американских исследователей, проведенная на насекомых, так же как и наше небольшое исследование, показывает, что ДНК микроспоридий хорошо адсорбируется на FTA-карточки, и FTA-метод может быть использован и в клинических, и в полевых условиях для выделения и хранения генетического материала микроспоридий.

В то же время результаты применения «бумажного» и стандартного ПЦР не всегда совпадали. Причина такого несоответствия требует анализа и проведения специальных исследований. Без сомнения, «бумажная» технология может рассматриваться как перспективный метод для

идентификации микроспоридиозов человека, однако введение этой технологии в рутинную клиническую практику требует дополнительной работы по оптимизации.

Авторы выражают благодарность главному врачу А. А. Яковлеву, сотрудникам 20-го и 21-го отделений и Клинико-диагностической лаборатории клинической инфекционной больницы им. С. П. Боткина за содействие в проведении исследований, а также О. В. Рыбальченко (Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов) за помощь в электронно-микроскопическом анализе образцов стула.

Работа выполнена при финансовой поддержке U. S. Civilian Research and Development Foundation (RUB2-002707-SP-05), National Institutes of Health (RR 00164, Е. Дидье) и Tulane Research Enhancement Fund (Е. Дидье).

Список литературы

- Соколова Ю. Я. 2009. Происхождение микроспоридий и положение в системе эукариот. Микология и фитопатология. 43 : 177—192.
- Beck I. A., Drennan K. D., Melvin A. J., Mohan K. M., Herz A. M., Alarcon J., Piscosa J., Velazquez C., Frenkel L. M. 2001. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood samples for diagnosis in infants in the field. J. Clin. Microbiol. 39 : 29—33.
- Didier E. S., Weiss L. M. 2006. Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis. 19 : 485—492.
- Duscher G., Peschke R., Wille-Piazza W., Joachim A. 2009. Parasites on paper: the use of FTA Elute® for the detection of *Dirofilaria repens* microfilariae in canine blood. Vet. Parasitol. 161 : 349—351.
- He H., Argiro L., Dessein H., Chevillard C. 2007. Improved technique that allows the performance of large-scale SNP genotyping on DNA immobilized by FTA® technology. Infection, Genetics and Evolution. 7 : 128—132.
- Huppmann A. R., Orenstein J. M. 2010. Opportunistic disorders of the gastrointestinal tract in the age of highly active antiretroviral therapy. Hum. Pathol. 41 : 1777—1787.
- Jamjoom M., Sultan A. H. 2009. Diagnosis of clinical samples spotted on FTA cards using PCR-based methods. J. Egypt. Soc. Parasitol. 39 : 227—246.
- Jaravata C. V., Smith W. L., Rensen G. J., Ruzante J. M., Cul-lor J. S. 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine manure using Whatman FTA card technology and lightcycler real-time PCR. Foodborne Pathogens and Disease. 3 : 212—215.
- Keeling P. J., Fast N. M. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann Rev. Microbiol. 56 : 93—116.
- Kotler D. P., Orenstein J. M. 1998. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv. Parasitol. 40 : 321—349.
- Kucerova Z., Sokolova O. I., Demyanov A. V., Kvac M., Sak B., Kvetonova D., Secor W. E. 2011. Microsporidiosis and Cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in St. Petersburg, Russia: serological identification of Microsporidia and *Cryptosporidium parvum* in sera samples from HIV/AIDS patients. AIDS Res. Hum. Retrovirus. 27 : 13—15.
- Lampel K. A., Orlandi P. A., Kornegay L. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. Appl. Environ. Microbiol., 66 : 4539—4542.
- Moscoso H., Bruzual J. J., Sellers H., Hofacre C. L. 2007. FTA® liver impressions as DNA template for detecting and genotyping fowl adenovirus. Avian Dis. 51 : 118—121.

Mullen M. P., Howard D. J., Powell R., Hanrahan J. P. 2009. A note on the use of FTA technology for storage of blood samples for DNA analysis and removal of PCR inhibitors. *Irish J. Agricult. Food Res.* 48 : 109—113.

Nagamine K., Hase T., Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.* 16 : 223—229.

Ndunguru J., Taylor N. J., Yadav J., Aly H., Legg J. P., Aveling T., Thompson G., Fauquet C. M. 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *BMC Virol. J.* 2 : 45, doi: 10.1186/1743-422X-2-45.

Orlandi P. A., Lampel K. A. 2000. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 2271—2277.

Snowden K. F., Logan K. S., Vinson B. S. 2002. Simple, filter-based PCR detection of *Thelohania solenopsae* (Microspora) in fire ants (*Solenopsis invicta*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 49 : 447—448.

Sokolova O. I., Demyanov A. V., Bowers L. C., Didier E. S., Yakovlev A. V., Skarlato S. O., Sokolova Y. Y. 2011. Emerging Microsporidia Infections in Russian HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 49 : 2102—2108.

Поступила 15 VI 2011

ON THE USE OF FTA® TECHNOLOGY FOR COLLECTION, ARCHIEIVING, AND MOLECULAR ANALYSIS OF MICROSPORIDIA DNA FROM CLINICAL STOOL SAMPLES

O. I. Sokolova,^{1,2} A. V. Demyanov,³ L. S. Bowers,⁴ E. S. Didier,⁴ Y. Y. Sokolova^{4,5}

¹ Medical Faculty, St. Petersburg State University, ² S. P. Botkin Memorial Clinical Hospital of Infectious Disease,

³ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia,

⁴ Division of Microbiology, Tulane National Primate Research Center, Covington, LA, 70433 USA4,

and ⁵ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia;

⁵ e-mail: yysokolova@gmail.com

The FTA® technology was applied for sampling, archiving, and molecular analysis of the DNA isolated from stool samples to diagnose and identify microsporidia, the intracellular opportunistic parasites which induce malabsorption syndrome in immunosuppressed humans, particularly in patients with AIDS. Microsporidia DNA was successfully amplified in 6 of 50 stool samples of HIV-positive patients of the S. P. Botkin Memorial Infectious Disease Hospital (St. Petersburg) applied to FTA cards (FTA-Cards, Whatman Inc. Florham Park, NJ, USA). Amplicons (the fragments of rDNA) were directly sequenced, and microsporidia species — *Encephalitozoon intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, and *Enterocytozoon bieneusi* — were identified in Genbank by NCBI BLAST program. The FTA method of DNA immobilization is especially promising for epidemiological and field population studies which involve genotyping of microsporidia species and isolates.

Key words: human microsporidia, PCR diagnostics, FTA® technology.