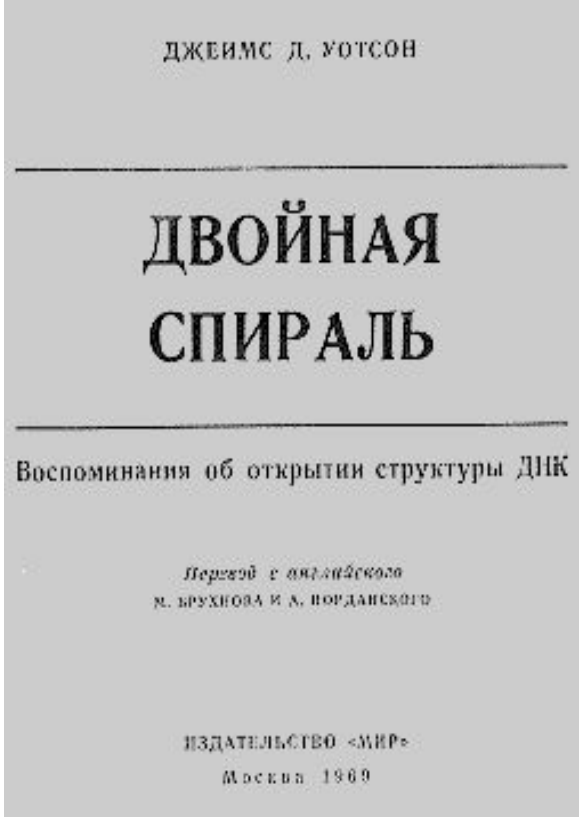
Полимеразная цепная реакция- новый метод лабораторной диагностики

История развития метода


ДЖЕЙМС Д. УОТСОН

ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ

Воспоминания об открытии структуры ДНК

Перевод с английского
М. БРУХНОВА И А. ПОРДАНСКОГО

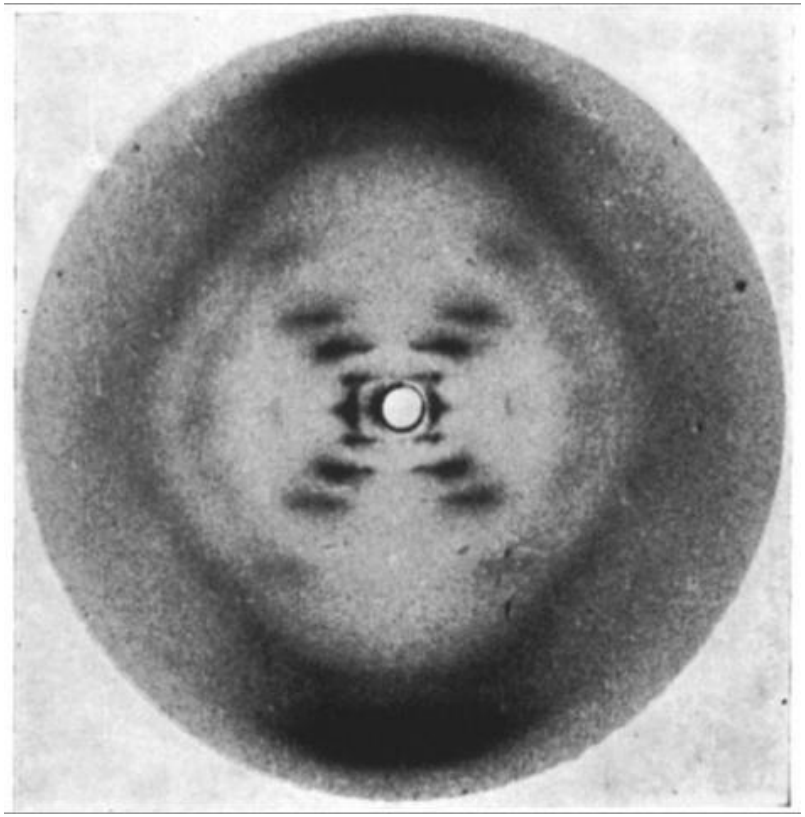
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва 1969

- *Американские ученые Джеймс Д. Уотсон, Фрэнсис Крик и Морис Уилкинс получили в 1962 году Нобелевскую премию, сделав одно из самых значительных открытий в биологии XX века: установили структуру молекулы ДНК - генетического материала клетки, хранящего информацию о наследственных признаках организма.*

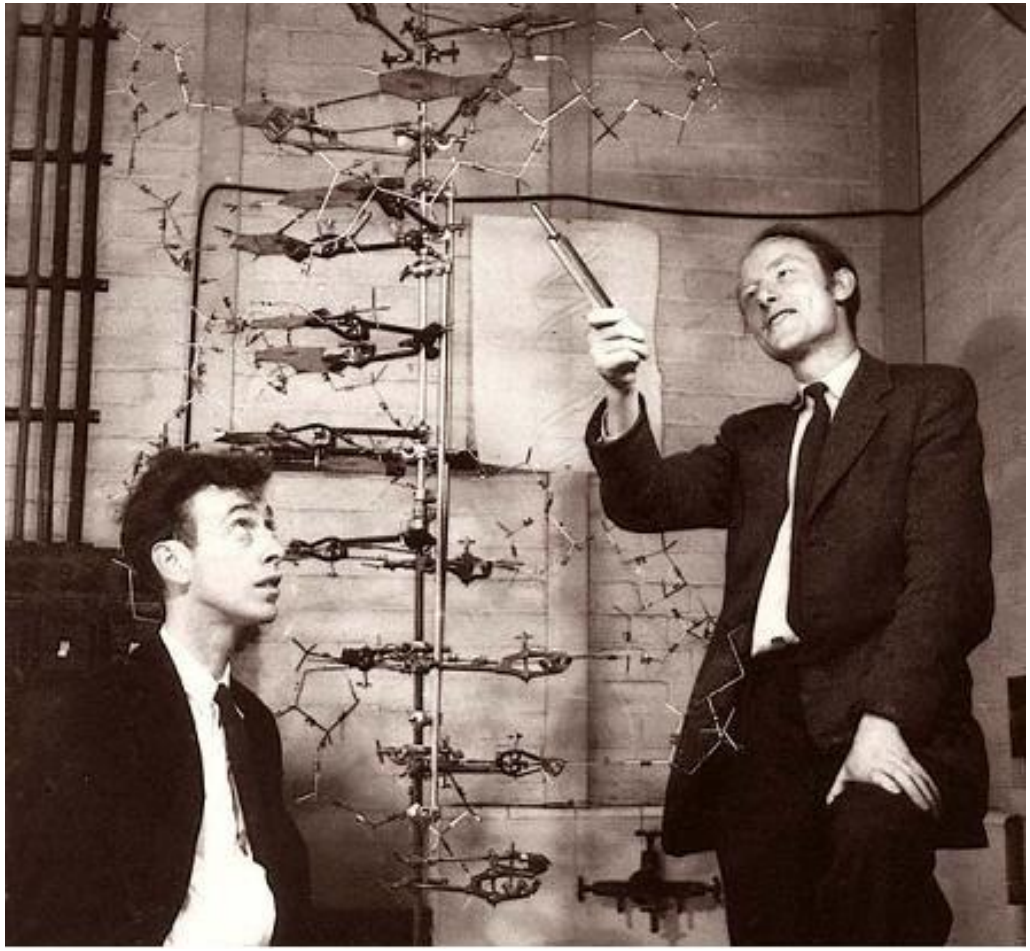
Фрэнсис Крик и Дж. Уотсон прогуливаются по кембриджскому двору. На заднем плане - часовня Кингз-колледжа

Рентгеноструктурный анализ ДНК

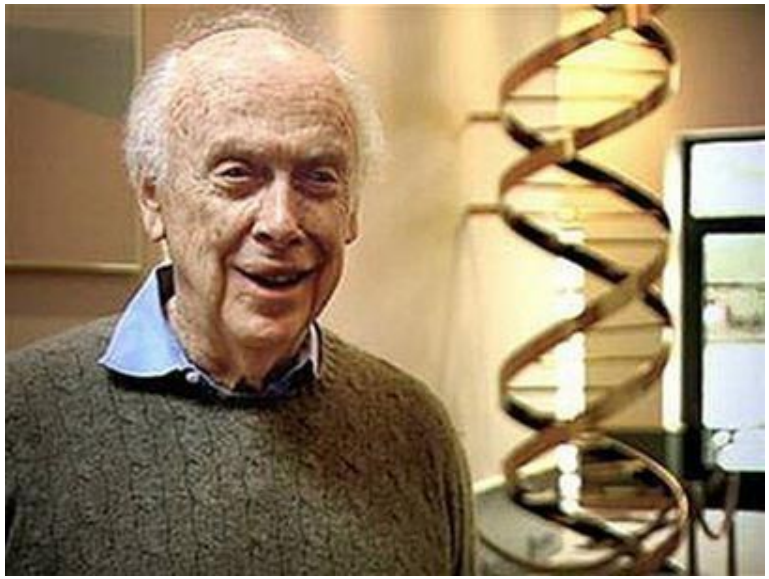
Розалинда Франклин
Морис Уилкинс, 1952 год



Молекулярная модель ДНК



Джеймс Уотсон
Фрэнсис Крик
1953 г. – статья в журнале Nature
1962 г. – Нобелевская премия



Все живые клетки на земле хранят наследственную информацию в виде двухцепочечной молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

Наследственность – универсальная способность живых организмов к идентичному самовоспроизведению.

Наследственная изменчивость – способность генетического материала претерпевать изменения, наследуемые в потомстве.

Основные генетические процессы:

- Репликация
- Репарация
- Транскрипция
- Рекомбинация
- Мутагенез

Развитие взглядов на наследственность

- **Гиппократ(400 г. до н.э.) – Ч.Дарвин (1868):** Теория пангенезиса (прямого наследования):
- **1865 г. - Г.Мендель:** независимое наследование фенотипических признаков
- **1868г.- Р.Мишер** открыл дезоксирибонуклеиновую кислоту

(не связывая ее роли с наследственостью).

- **1902г. – У.Бэтсон** : гомозигота, гетерозигота.
- **1909г. - В.Иогансен** предложил термин “ген”.
- **1909г. - Т.Морган** : анализ сцепленного наследования признаков.
- **1936г. –Н.В.Тимофеев-Ресовский** – оценка размера гена при анализе мутаций,
- **1944г.- О.Эвери** - доказательства генетической роли ДНК при трансформации бактерий

вызываемых ионизирующим излучением (переход от классической к молекулярной генетике)

- **1949-1951** – правила **Э.Чаргаффа-** правила, описывающие количественные соотношения между различными типами азотистых основанийправила, описывающие количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в ДНК
- **1952г. А.Херши и М.Чейз** - размножение бактериофагов
- **1953г.- Дж. Уотсон, Ф.Крик -** построение молекулярной модели ДНК на основе рентгеноструктурного анализа ДНК **М.Уилкинса, Р.Франклин.**

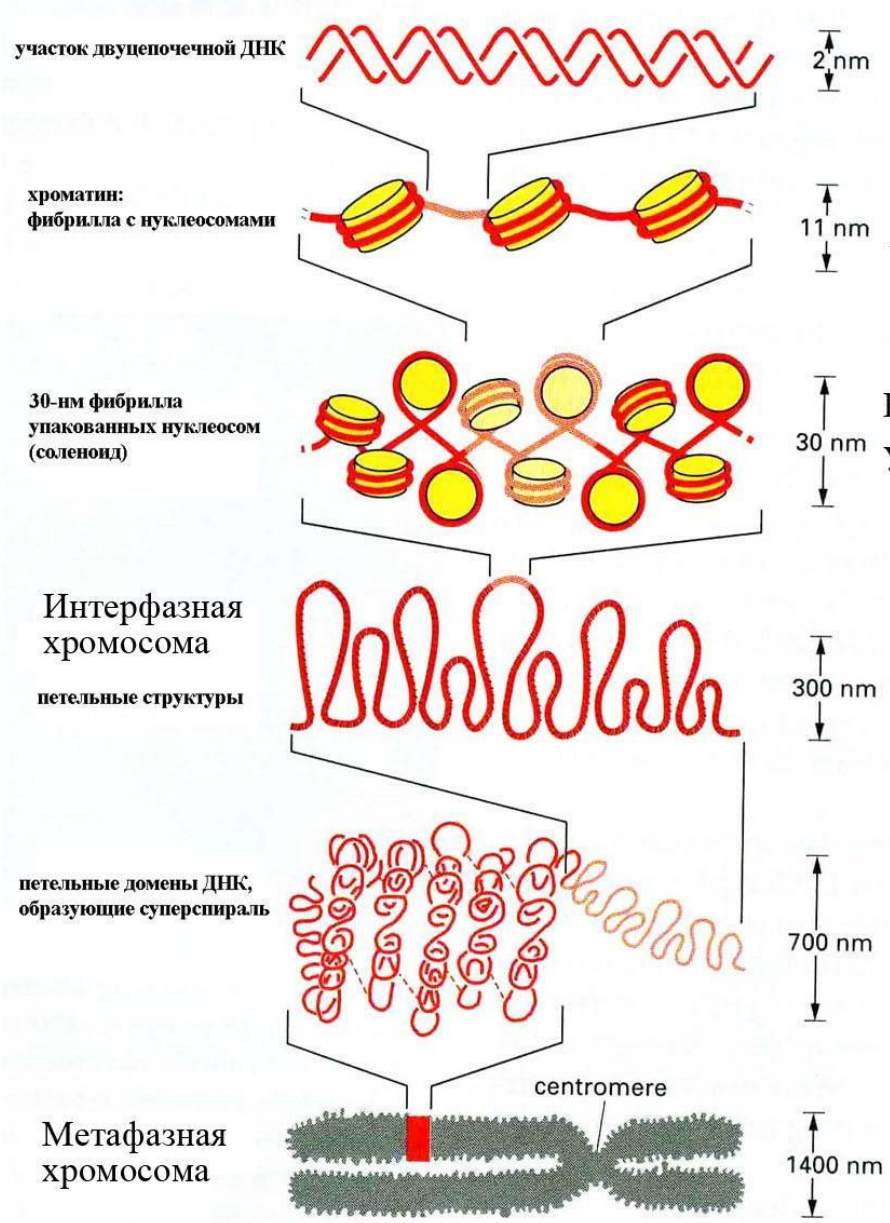
Генетический код

-наследственная информация о всех структурных и функциональных белках закодирована в виде последовательности нуклеотидов

Геном человека

- ✔Общая длина молекулы ДНК 1, 5 – 1,7 м упакована в ядре диаметром 5 мкм.
- ✔Число нуклеотидов 3,17 х 10^9
- ✔Число генов 20 000 - 25 000
- ✔Кодирует синтез всех белков организма 1,2% всей ДНК
- ✔Идентичность геномов разных индивидуумов составляет 99,0 - 99,9%, Межиндивидуальная вариабельность 0,1 - 10% (полиморфизмы)

Упаковка ДНК в ядре 4 уровня компактизации ДНК.



145 п.н. ДНК образуют 1,75 оборота вокруг нуклеосомы

Уменьш. длины ДНК в 7 раз.

Взаимодействие гистонов H1 в линкерных областях.

Уменьш. длины еще в 7 раз.

Прикрепление специфических последовательностей ДНК к внутреннему ядерному матриксу.
Петли - геномные домены(репликоны в 50-100 т.п.н.)
Уменьш. длины ДНК еще в 25 раз.

Упаковка ДНК за счет складывания скелетных нитей, к которым прикреплены соленоидные петли с образованием суперспирализованной метафазной хромосомы.

Упакованная митотическая хромосома в 10.000 раз короче длины исходной молекулы ДНК

Мутации – все изменения в последовательности ДНК, независимо от их локализации и влияния на жизнеспособность особи

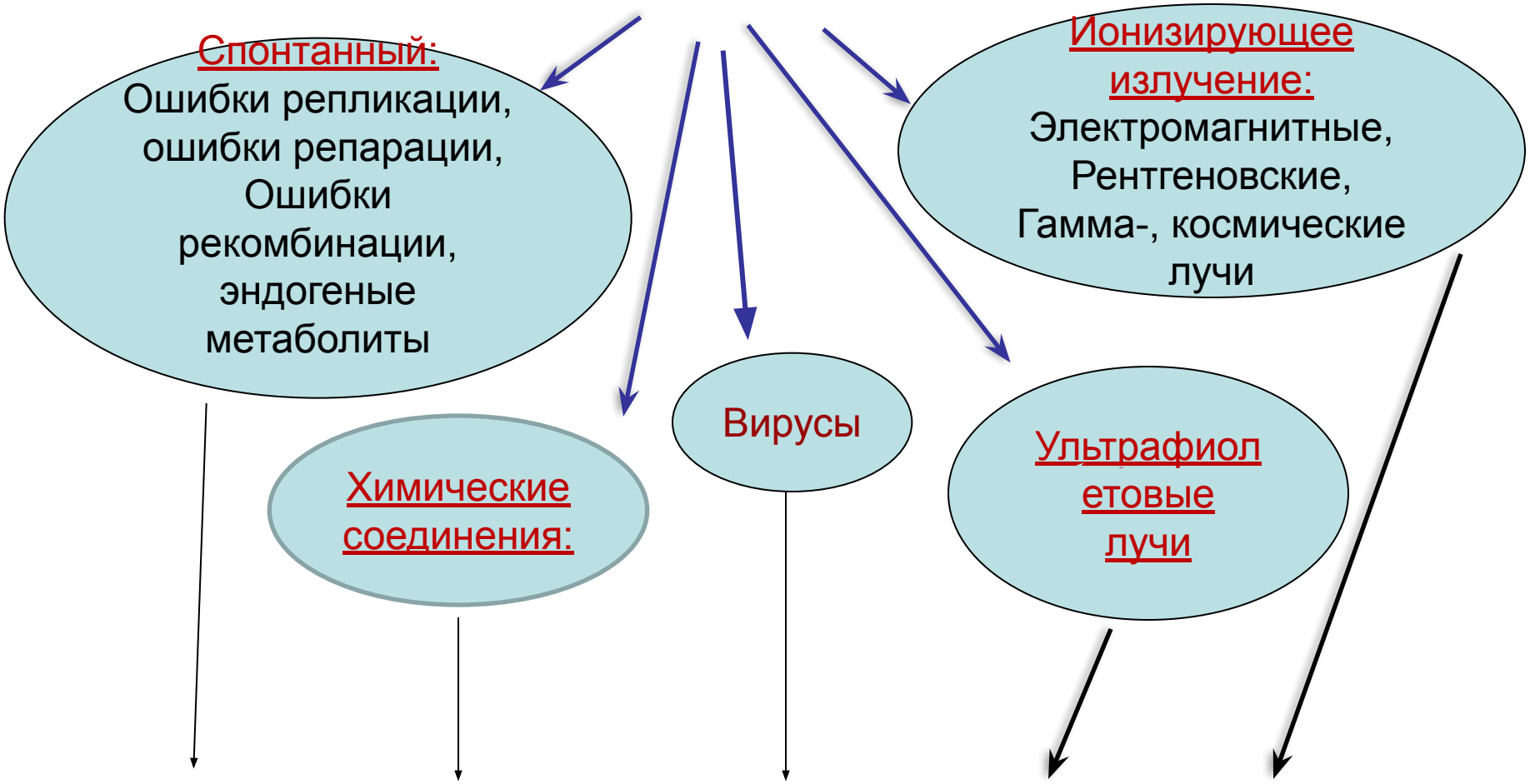
Мутагенез – процесс возникновения мутаций.

Мутации – основное патогенетическое звено заболеваний.

Используются как маркеры для

- уточнения диагноза
- определения стадии
- мониторинга
- выбора стратегии лечения заболевания

Мутагенез



Одно-, двухцепочечные разрывы ДНК; сшивки между цепями ДНК, ДНК и белками; тимин-тиминовые димеры; амплификация генов, замены оснований, делеции, инсерции и др.

Каждый ген за время жизни организма подвергается спонтанным нарушениям до 1млн раз.

Современная молекулярная диагностика – персонализированная медицина

Применение ПЦР

- **Медицина, система санитарно-эпидемиологического контроля**

 - *диагностика инфекций*:

- особо опасные и социально значимые инфекции;
- эпидемические инфекции;
- гемотрансмиссивные инфекции;
- оппортунистические инфекции;
- TORCH-инфекции;
- исследование биоценозов;

 - *диагностика иммунных патологий*

 - *генетические исследования наследственных заболеваний*

 - *определение ГМИ пищевых продуктов*

- **Ветеринария и растениеводство**

 - *инфекционные заболевания*

 - *определение видовой принадлежности*

- **Наука**

 - *генная инженерия, микробиология, генетика и др.*

- **Промышленность**

 - *определение биологического загрязнения (санитарный контроль)*

- **Судебная медицина**

 - *идентификация личности*

Необходимо различать, что ПЦР используется для

Генотипирования микроорганизмов:

- Определения наличия и количества инфекционного возбудителя
- Типирование вирусов (HPV)
- Определение резистентности к лекарственной терапии

(т.е. выявление чужеродной пациенту ДНК)

Генотипирования человека:

- Наследственные заболевания
- Онкология, онкогематология
- Фармакогенетика
- Предрасположенность к заболеванию
- Идентификация личности

(анализ ДНК пациента)

Мультифакториальные заболевания

(болезни с наследственной предрасположенностью) — развиваются в результате взаимодействия определённых комбинации аллелей разных локусов и специфических воздействий факторов окружающей среды.

известно не менее 1500 генов, относящихся к различным генным сетям МФЗ:

- Сердечно-сосудистые заболевания
- Остеопороз
- Сахарный диабет
- Нарушения свертываемости крови
- Бронхиальная астма
- Ожирение
- Нарушение иммунного ответа
- Рак молочной железы
- Нейродегенеративные заболевания

Социально значимые заболевания

Согласно Постановлению Правительство Российской Федерации от **1 декабря 2004 г. N 715** «*Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих*», в соответствии со **статьей 41** *Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан*, перечень социально значимых заболеваний включает:

- **Туберкулез** (код по МКБ-10 А 15 - А 19);
- **Инфекции, передающиеся преимущественно половым путем** (А 50 - А 64);
- **Гепатит В** (В 16; В 18.0; В 18.1);
- **Гепатит С** (В 17.1; В 18.2);
- **Болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)** (В 20 - В 24);

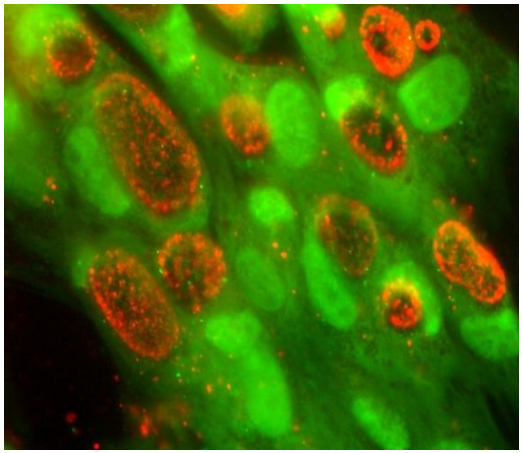
- Злокачественные новообразования (С 00 - С 97);
- Сахарный диабет (Е 10 - Е 14);
- Психические расстройства и расстройства поведения (F 00 - F 99);
- Болезни, характеризующиеся повышенным кровяным давлением (I 10 - I 13.9).

Социально значимые заболевания
Выявление ИППП

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем, включают:

- T. pallidum
- N.gonorrhoeae
- C.trachomatis
- M.genitallium
- T.vaginalis
- Candida и.тд.

Метод диагностики T. vaginalis	Диагностическая чувствительность метода
Микроскопия (окрашенный препарат)	10-12% (М) 50-60% (Ж)
Бак.посев	70-95%
ПЦР	90-96%



Метод диагностики C.trachomatis	Диагностическая чувствительность метода
Микроскопия (по Рамановскому)	10-12%
Культуральный метод	60-80%
ПИФ	40-60%
ПЦР	95-98%

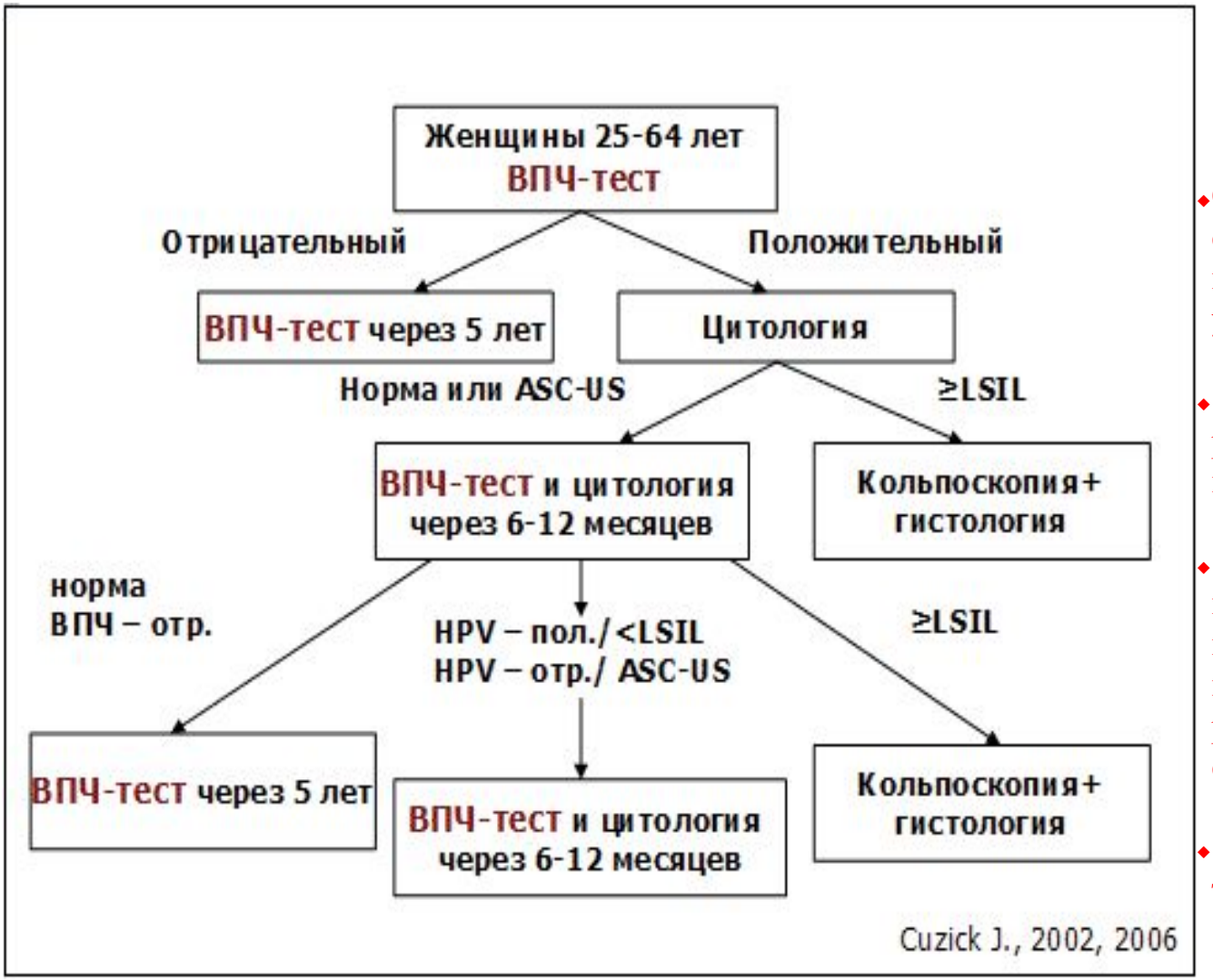
Метод диагностики N.gonorrhoeae	Диагностическая чувствительность метода
Микроскопия (по Граму)	80-95% (М) 30-50% (Ж)
Бак. Посев	95-98% (М) 80-87% (Ж)
ПЦР	95-98%

Гемотрансмиссивные инфекции. HIV

Так как методом ПЦР определяют не антитела к продуктам генов ВИЧ, а непосредственно гены, он незаменим при диагностике ВИЧ-инфекции:

- В серонегативный период
- Исследовании банков крови и препаратов из крови
- При неопределенных результатах ИФА
- У детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями (персистенция материнских антител у ребенка может достигать 15 мес.)
- При одновременной диагностике множественных инфекций, встречающихся при СПИДе
- При дифференциальной диагностике между ВИЧ-1, ВИЧ-2 и другими вирусными заболеваниями,
- При испытаниях на животных химиопрепаратов и вакцин против СПИДа.

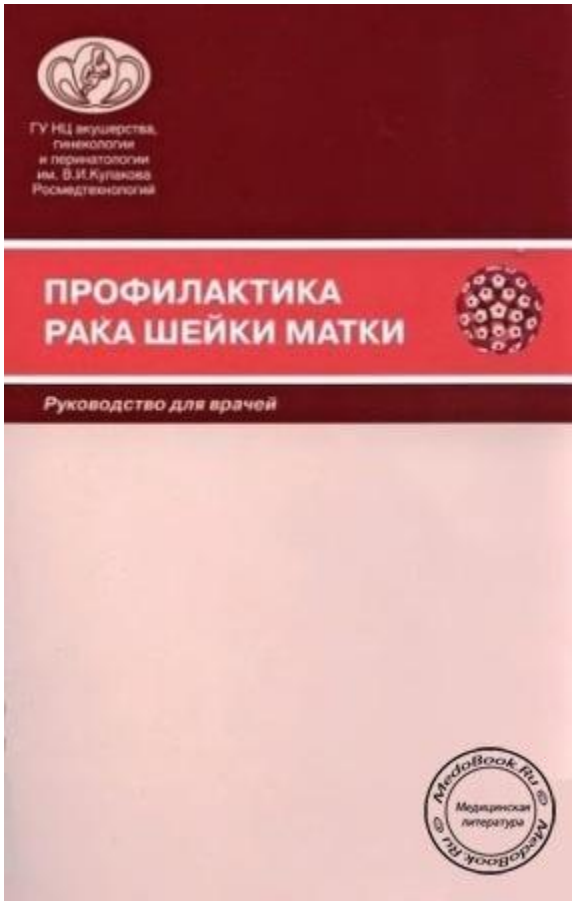
Алгоритм применения ПЦР (ВПЧ-теста) для скрининга



По рекомендациям ВОЗ:

- Обследования в рамках скрининга, основанного на исследовании ДНК ВПЧ, у женщин до 30 лет не проводят.
- Ежегодное обследование не рекомендуется ни в одной из возрастных групп.
- Если при двух последних цитологических исследованиях мазков с шейки матки патологии не выявлено, обследование в рамках скрининга женщинам старше 65 лет не проводят
- Кольпоскопия рекомендуется только как метод диагностики.

Требование к ВПЧ-тестам для скрининга (2008 г)



- ВПЧ-тест должен выявлять только типы высокого канцерогенного риска; обнаруживать не менее 10 генотипов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58), что обеспечивает более чем 95% чувствительность теста.
- ВПЧ-тест должен обладать высокой чувствительностью выявления предраковых состояний (CIN II, III) и высокой специфичностью, не уступающей цитологическому исследованию, т.е. выявлять только клинически значимую концентрацию вируса или дифференцировать клинически значимую от незначимой.
- ВПЧ-тест должен быть простым и быстрым в исполнении, недорогим, учет результатов должен быть автоматизирован.

- Вирусная нагрузка менее 3 lg на 10^5 клеток является *клинически малозначимым количеством вируса* и характеризуется минимальным риском развития дисплазии и почти 100% спонтанной регрессией.
- Вирусная нагрузка более 5 lg на 10^5 клеток обозначается как *повышенное количество вируса* и отражает наличие дисплазии или высокий риск ее развития.
- *Снижение вирусной нагрузки* более чем на 1 lg за 6 мес. является динамическим маркером транзиторной инфекции.

Организация ПЦР-лаборатории

Требования к помещениям лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические диагностические исследования

- При строительстве новых или реконструкции имеющихся помещений лабораторию размещают в отдельно стоящем здании (изолированной части здания, этажа) с соблюдением требований СП 1.3.1285-03 и (или) СП 1.3.2322-08.

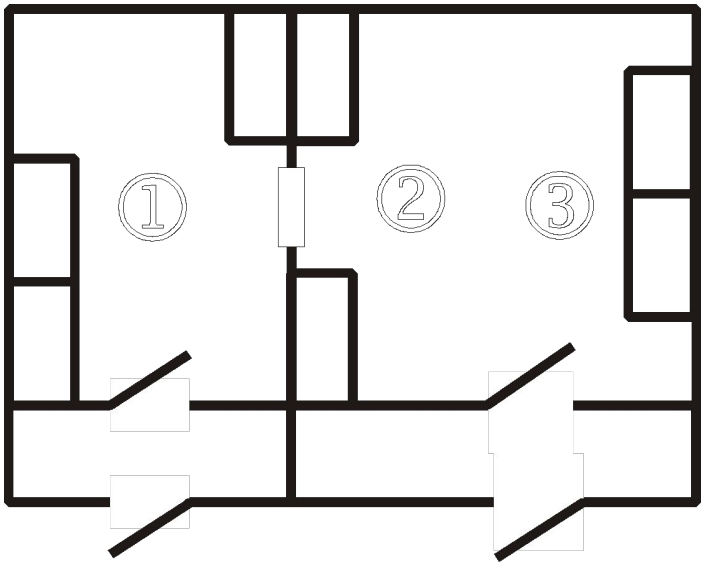
- При отсутствии возможности размещения помещений лаборатории в виде отдельного блока допускается проведение исследований поступающего материала на базе действующей лаборатории (микробиологической, вирусологической, иммунологической и т.д.) при условии организации в ней самостоятельных или выделенных в составе других функциональных помещений рабочих зон, соответствующих этапам проведения анализа, поточности движения персонала и материалов.

Зоны (помещения) ПЦР-лаборатории

Лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений, количество которых определяется используемыми МАНК:

- **Рабочая зона 1** - зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала
- **Рабочая зона 2** – зона выделения нуклеиновых кислот
- **Рабочая зона 3** - зона проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридизационо – флуоресцентного метода детекции
- **Рабочая зона 4-1** – зона учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и (или) гибридизационно - ферментным методом детекции
- **Рабочая зона 4-2** – зона учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и (или) на ДНК-чипах

Устройство ПЦР-лаборатории с гибридизационо – флуоресцентный детекцией



- Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала (Рабочая зона 1)
- Зона выделения нуклеиновых кислот (Рабочая зона 2)
- Зона проведения реакции амплификации (Рабочая зона 3)

Для детекции в формате *FLASH* - ТОЛЬКО КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ!

Для детекции в формате *real time* – КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗЫ!

Спасибо за внимание!