




**Современная генодиагностика
инфекционных болезней.**


**Обзор основных
генодиагностических
технологий. Основные
подходы к конструированию
генодиагностических
тест-систем.**

Корсакова И.И.




События последних лет подтвердили глобальный характер эпидемического потенциала патогенов. По информации ВОЗ неуклонно расширяется список стран, вовлеченных в эпидемии и пандемии, вызванные особо опасными вирусами. Возрастает число случаев заболеваний и смертельных исходов, связанных с распространением резистентных форм микроорганизмов, инфекциями, распространение которых может сопровождаться большими человеческими и экономическими потерями (туберкулез, малярия и пр.).






Развитие интеграционных процессов, расширение торгово-экономического сотрудничества, современные быстрые средства транспортировки продуктов питания и кормов ликвидировали прежние географические барьеры для выноса возбудителей болезней человека и животных за пределы эндемичных территорий, в страны, где они либо отсутствуют, либо имеют ограниченное распространение.





Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года определила приоритетные направления развития медицинской науки в России, одним из которых является Научная платформа «микробиология». Достижения молекулярной биологии, биотехнологии и биоинформатики, в том числе, возможности секвенирования и анализа функций генов, открывают новые перспективы получения эффективных препаратов для профилактики и лечения, обнаружения и диагностики инфекционных болезней.

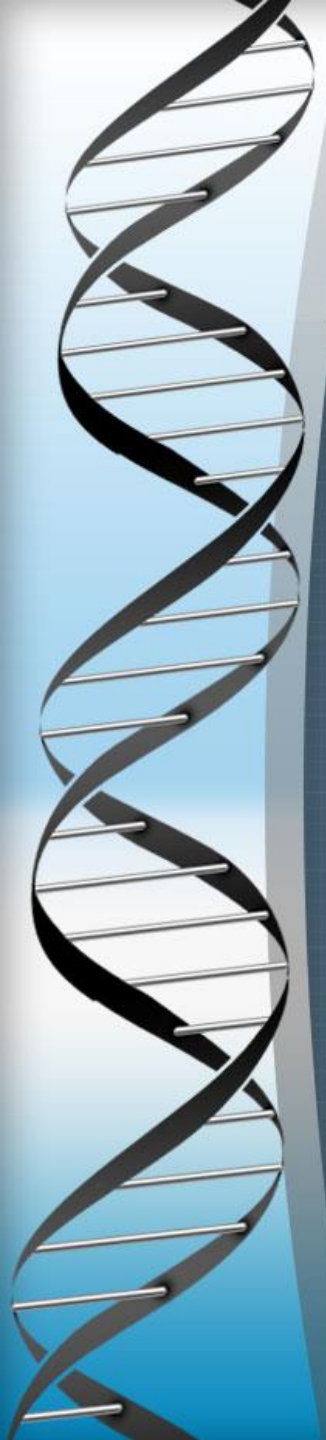


**СТРАТЕГИЯ РАЗВИТИЯ
МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ В РОССИИ
ДО 2025 ГОДА**



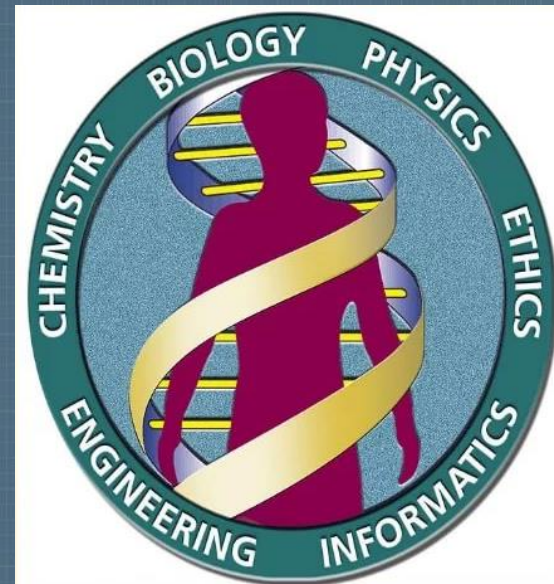
**Основными результатами реализации стратегии
будут:**

- **разработка новых вакцин и совершенствование календаря прививок;**
- **совершенствование и развитие диагностических тест-систем и методов экспресс-диагностики;**
- **разработка новых противoinфекционных лекарственных средств;**
- **разработка современных методов и схем борьбы с внутрибольничными инфекциями;**
- **формирование и развитие системы эффективного эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных заболеваний;**
- **разработка новых вакцин и совершенствование календаря прививок.**



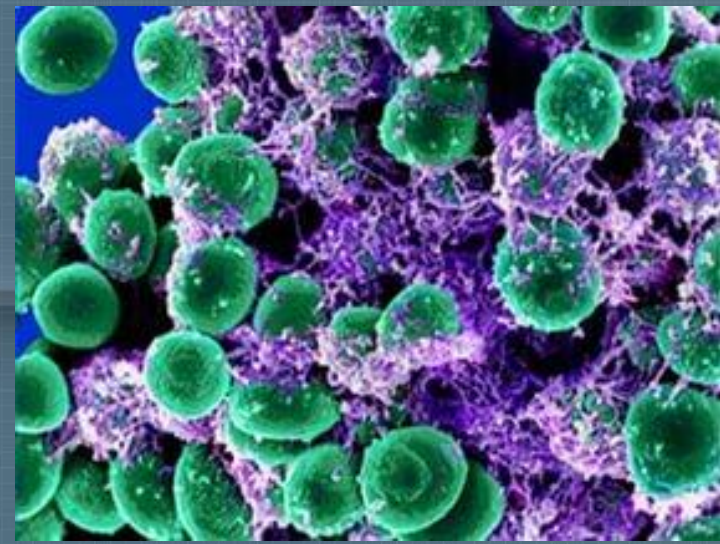
Генодиагностика – это очень широкая область, которая на сегодняшний день имеет три основные направления.

1. Анализ генома человека (делают один раз в жизни, определяют предрасположенность к различным заболеваниям, выявляют отцовство, материнство, узнают этническую принадлежность, носительство какого-либо генетического заболевания, реакцию на те или иные лекарства).

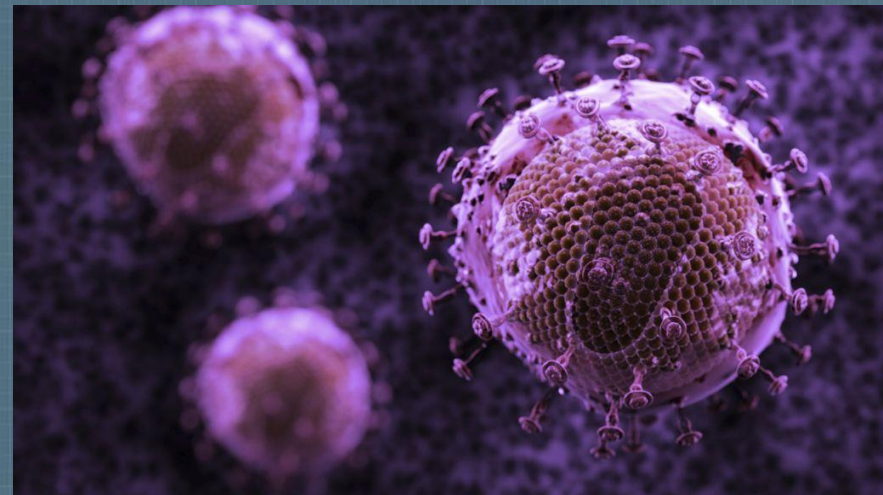


2. Генодиагностика в динамике (поиск изменений в организме за счёт анализа свободно циркулирующих нуклеиновых кислот или из биопсии ткани, диагностика болезни или подбор стратегии лечения для определенной болезни по генетическому профилю конкретной клетки или группы клеток).





**3. Исследование различных заболеваний,
вызванных инфекционными агентами.**



Генодиагностика – это совокупность методов, позволяющих обнаруживать и распознавать генетические изменения (дефекты) в клетках, а также выявлять по специфическим генам возбудителей болезней на ранних этапах заболевания.



Генодиагностика – обнаружение инфекционного агента путем идентификации нуклеотидной последовательности его генома.

ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

- **Универсальность генетического кода, а следовательно и процедуры проведения анализа (сходные наборы и операции)**
- **Быстрота в создании наборов реагентов для новых инфекционных агентов (атипичная пневмония, птичий грипп)**
- **Возможность получения высокой чувствительности и специфичности анализа (амплификационные методы)**
- **Одновременная качественная или количественная детекция нескольких инфекционных агентов**
- **Интенсивное развитие методов: новые технологии выделения, амплификации, детекции (оборудование, биочипы)**



УСЛОВИЯ ДЛЯ УСПЕШНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ГЕНОДИАГНОСТИКИ

- **определение места и роли генодиагностики в общей системе клинической лабораторной диагностики**
- **стандартизация наборов реагентов и оборудования**
- **проведение всесторонней клинической апробации методов генодиагностики, в том числе их сравнительный анализ**
- **правильная организация лаборатории генодиагностики**
- **наличие квалифицированного персонала, прошедшего тематическое усовершенствование**
- **наличие системы внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований**

ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ

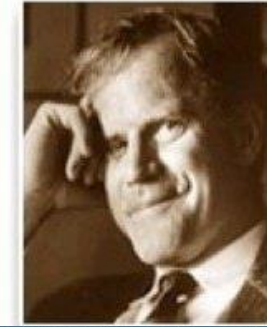
1983 г. - создание К.Б. Мюллисом революционной технологии – ПЦР (Нобелевская премия по химии 1993 г.)

1987 г. - запатентована технология секвенирования СБН (секвенирование путем гибридизации)

1989 г. - лигазная цепная реакция (ЛЦР), транскрипционно-опосредованная амплификация (ТМА)

Kary Mullis - Nobel prize in 1993

Kary Mullis shared the 1993 Nobel Prize in Chemistry with Michael Smith. Mullis received the prize for his development of the Polymerase Chain Reaction (PCR)

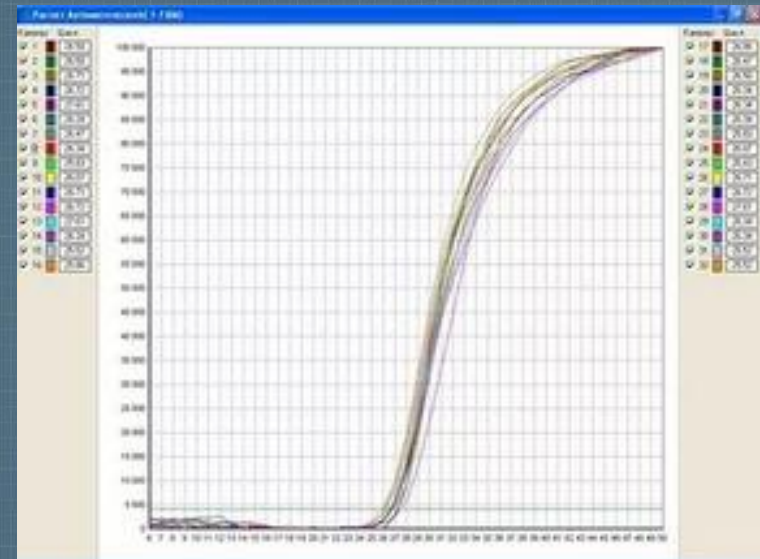
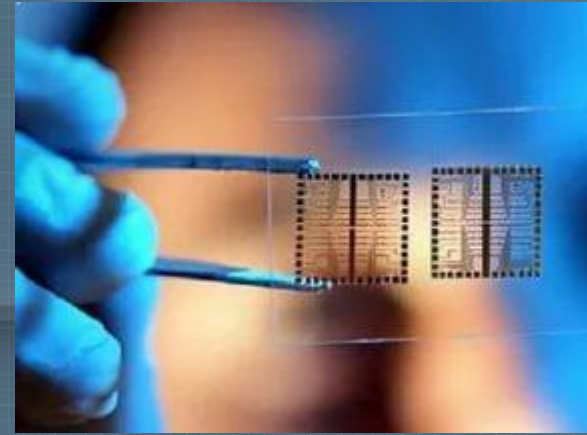


ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ

1994 г. - Fodor и Schena создали количественный анализ генетической экспрессии с помощью биочипов

1996 г. - ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)

1998 г. - NASBA в реальном времени



РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ГЕНОДИАГНОСТИКИ В РОССИИ

1995 г. - регистрация Минздравмедпромом РФ первых наборов для определения нуклеотидных последовательностей *Chlamydia trachomatis* методом ПЦР. Выход методических рекомендаций: по диагностике хламидийной, микоплазменной и герпесвирусной инфекции методом ПЦР и организации ПЦР лаборатории.

1997 г. - регистрация первого отечественного набора лабораторного оборудования для ПЦР-диагностики и программируемого термостата «Терцик».

2005 г. - создание первого отечественного прибора для проведения ПЦР в реальном времени.



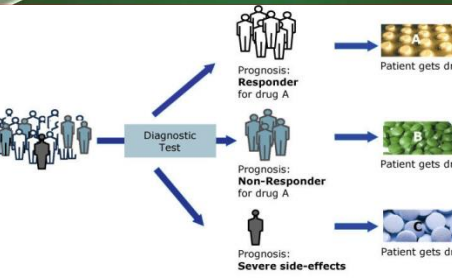
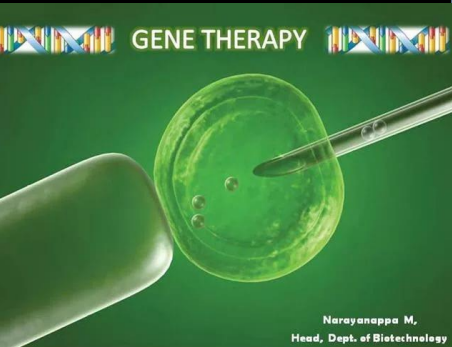
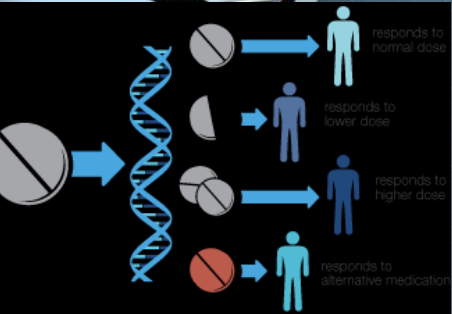
ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

- **Сельское хозяйство** (идентификация животных)
- **Криминалистика** (судебно-медицинская экспертиза, идентификация личности)
- **Палеонтология, археология** (палеодНК, ископаемые животные и растения, миграции вымерших видов)
- **Производство лекарств** (идентификация бактерий, контроль фармацевтических производств)
- **Производство продуктов** (нутригеномика, обнаружение трансгенных источников в продуктах питания)
- **Экология** (патогены в объектах окружающей среды)
- **Медицина**



ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОДИАГНОСТИКИ В МЕДИЦИНЕ

- Установление биологического родства
- Понимание путей возникновения патогенеза заболеваний
- Понимание ген-генных взаимодействий и взаимодействий ген-среда
- Диагностика заболеваний, мониторинг лечения (дифференциальный диагноз, трансплантация органов и тканей)
- Фармакогеномика (определение мутаций вирусов и бактерий, установление резистентности к лекарственным препаратам, предсказание ответа на лечение, контроль качества вакцинных препаратов)
- Генотерапия
- Персонализированная медицина
- Предиктивная медицина
- Развитие новых диагностических технологий



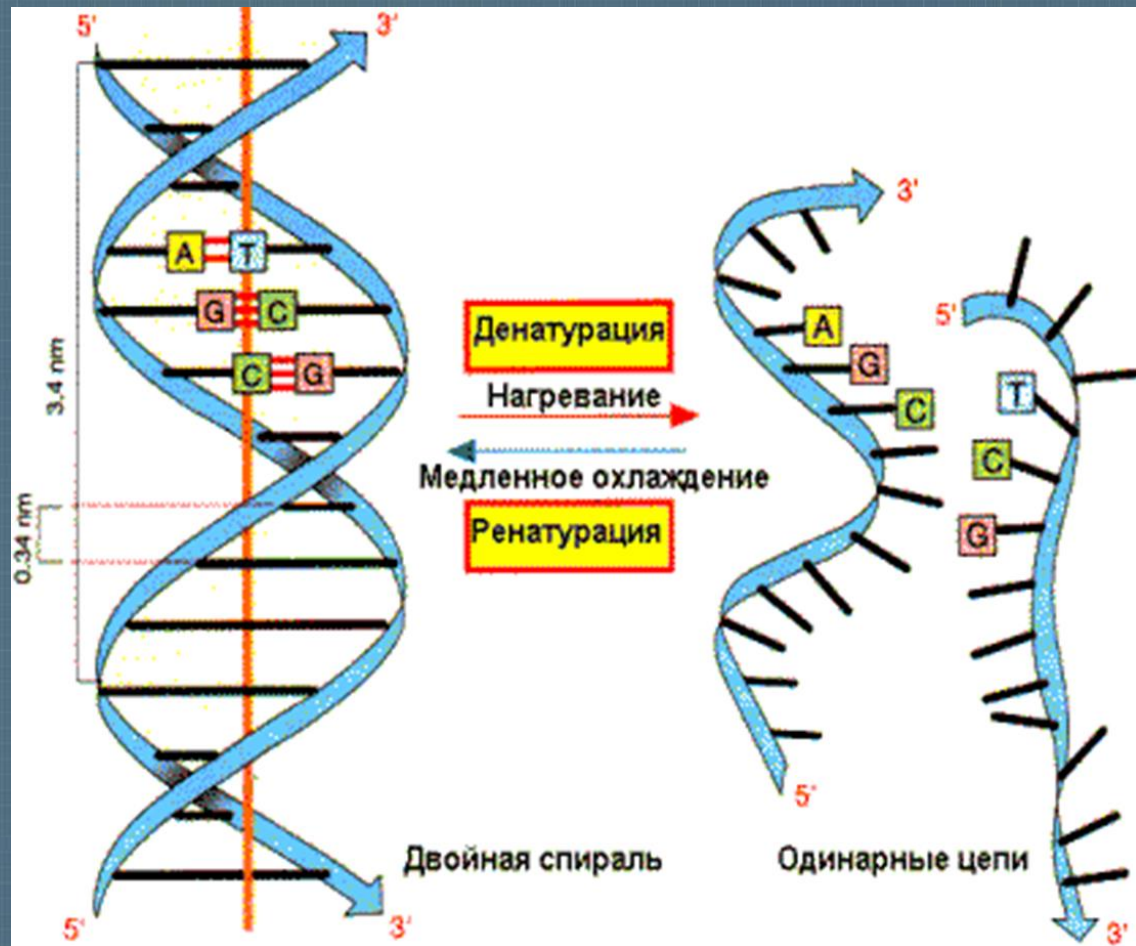


МЕТОДЫ ГЕНОДИАГНОСТИКИ

1. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот
2. Амплификационные технологии
3. Секвенирование нуклеиновых кислот

ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

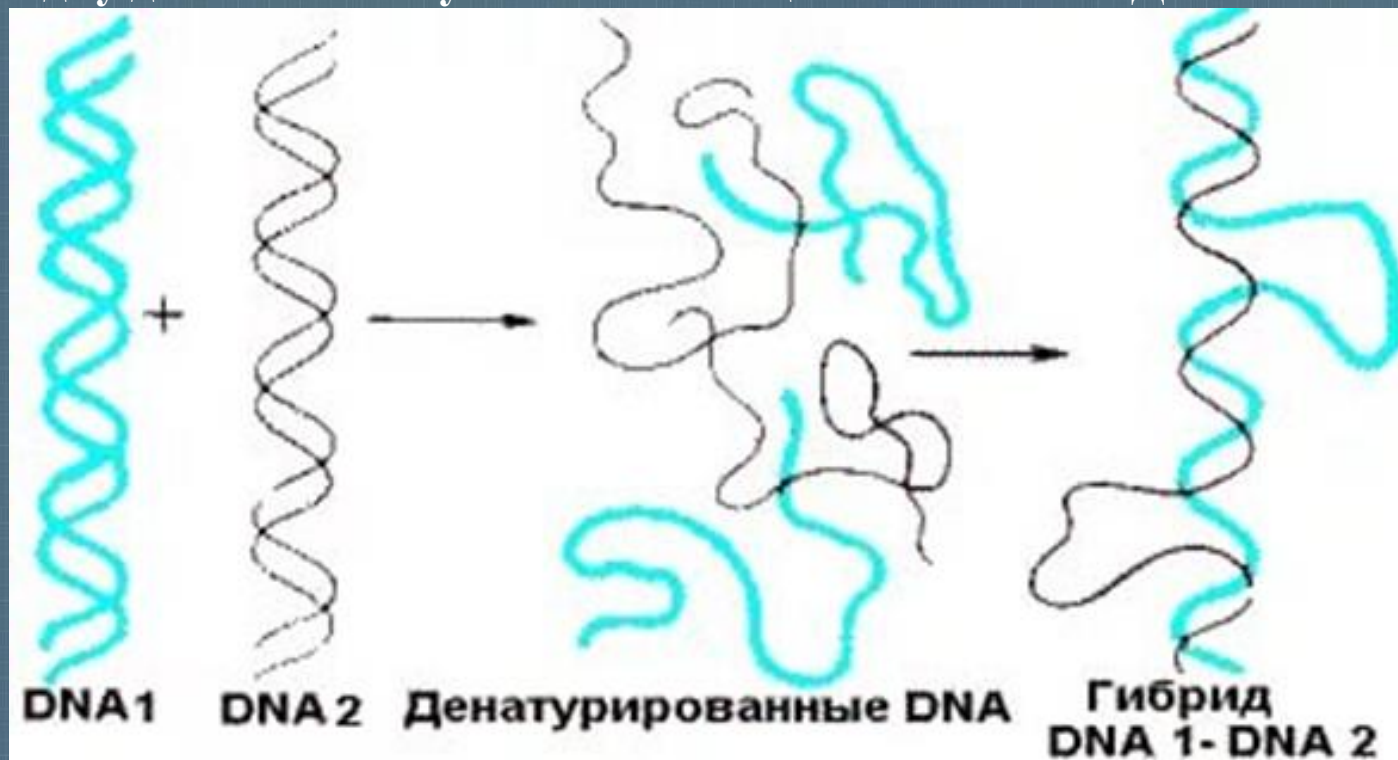
В основе гибридизации нуклеиновых кислот лежит принцип комплементарности ДНК (А=Т; Г=Ц) и РНК (А=У; Г=Ц), а также свойства ДНК при измененной рН и повышенной температуре (95 °С) денатурировать (расплетаться на две нити).



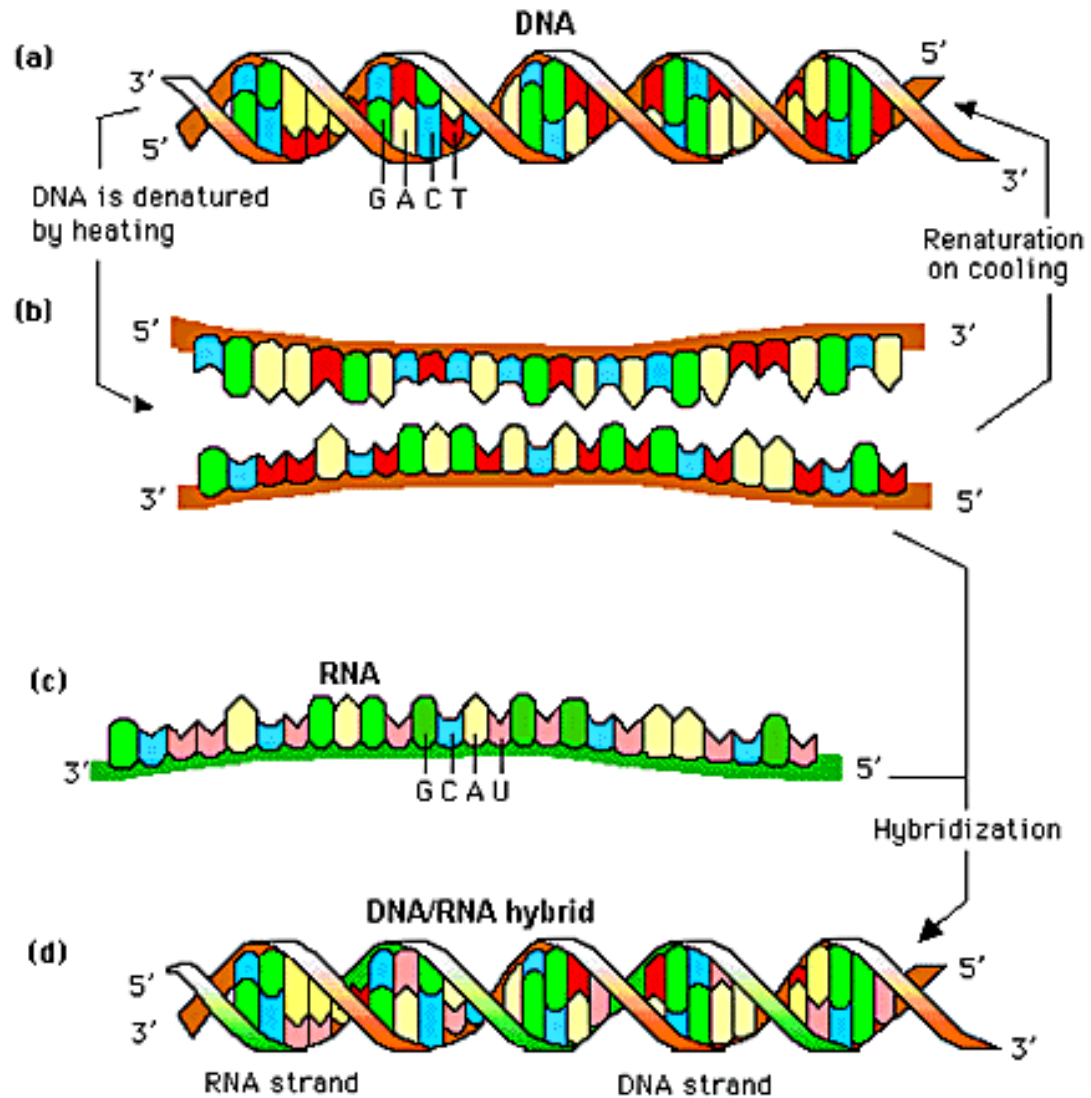
ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Процесс денатурации обратим. Денатурированную ДНК инкубируют в условиях, обеспечивающих гибридизацию нуклеиновых кислот (60°C), то есть повторное образование двухцепочечных молекул путем спаривания нуклеотидов комплементарных цепей.

Эта реакция настолько специфична, что гибрид одноцепочечной молекулы ДНК с комплементарной цепью (РНК или ДНК) можно выявить, даже если кДНК составляет лишь одну десятитысячную часть от общего количества ДНК.



ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



Nucleic Acid Hybridization



ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод позволяет различить полностью и частично гомологичные последовательности.

Специфичность гибридизации нуклеиновых кислот, часто в сочетании с фракционированием или амплификацией, позволяет выявить нужный ген среди десятков тысяч других или нуклеиновую кислоту возбудителя инфекции даже тогда, когда единственная ее копия приходится на несколько клеток человека.

Для выявления гибридизационных зондов используют радиоактивную метку или нерадиоактивные методы.

ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

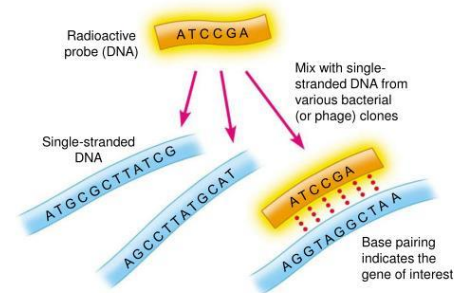


ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

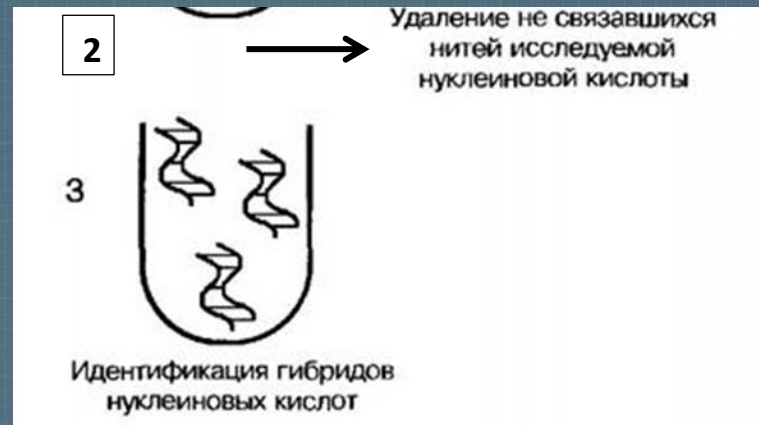
Для гибридизации применяют молекулярные зонды.

Зонд – это синтетический олигонуклеотид с известной нуклеотидной последовательностью, размером 10–30 нуклеотидов, представляющий собой короткий сегмент одноцепочечной ДНК, РНК или ее ДНК-копии, комплементарный искомому гену, меченный изотопами или флуоресцентными красителями, который используется для выявления комплементарных последовательностей с помощью гибридизации.

A DNA probe tags a gene by base pairing



ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ





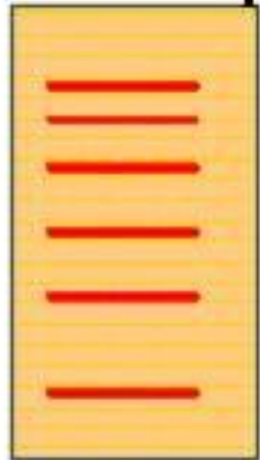
МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Одним из основных и исторически первым методом идентификации фрагментов ДНК был метод блот-гибридации (**Саузерн-блот**), предложенный ещё в 1975 году английским учёным Эдвардом Саузерном (Southern, 1975).

Принцип метода: геномная ДНК подвергается расщеплению и образующиеся фрагменты разделяют по относительной молекулярной массе в агарозном или акриламидном геле. После электрофореза ДНК денатурируют и переносят с геля на плотный носитель. Перенос осуществляют за счет действия капиллярных сил, электрического поля или вакуума. Денатурированные фрагменты ДНК гибридизуются с радиоактивно-меченным зондом – молекулой ДНК длиной несколько сотен нуклеотидов. После автордиографии определяют положение искомого фрагмента ДНК на электрофореграмме.

МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Гель электрофорез



1

Фильтровальная бумага

2

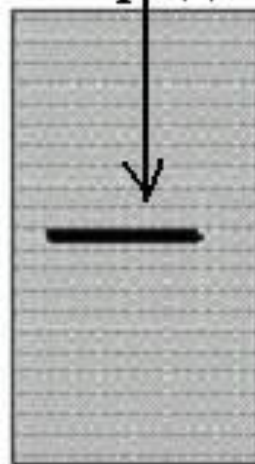
Губка

Щелочной раствор

Нитроцеллюлоза
Гель

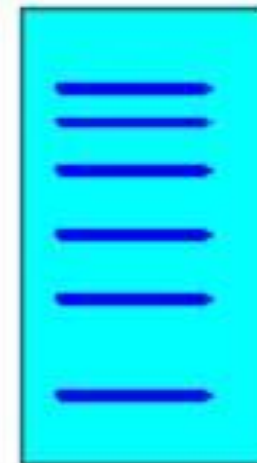
Визуализированный
гибрид

4



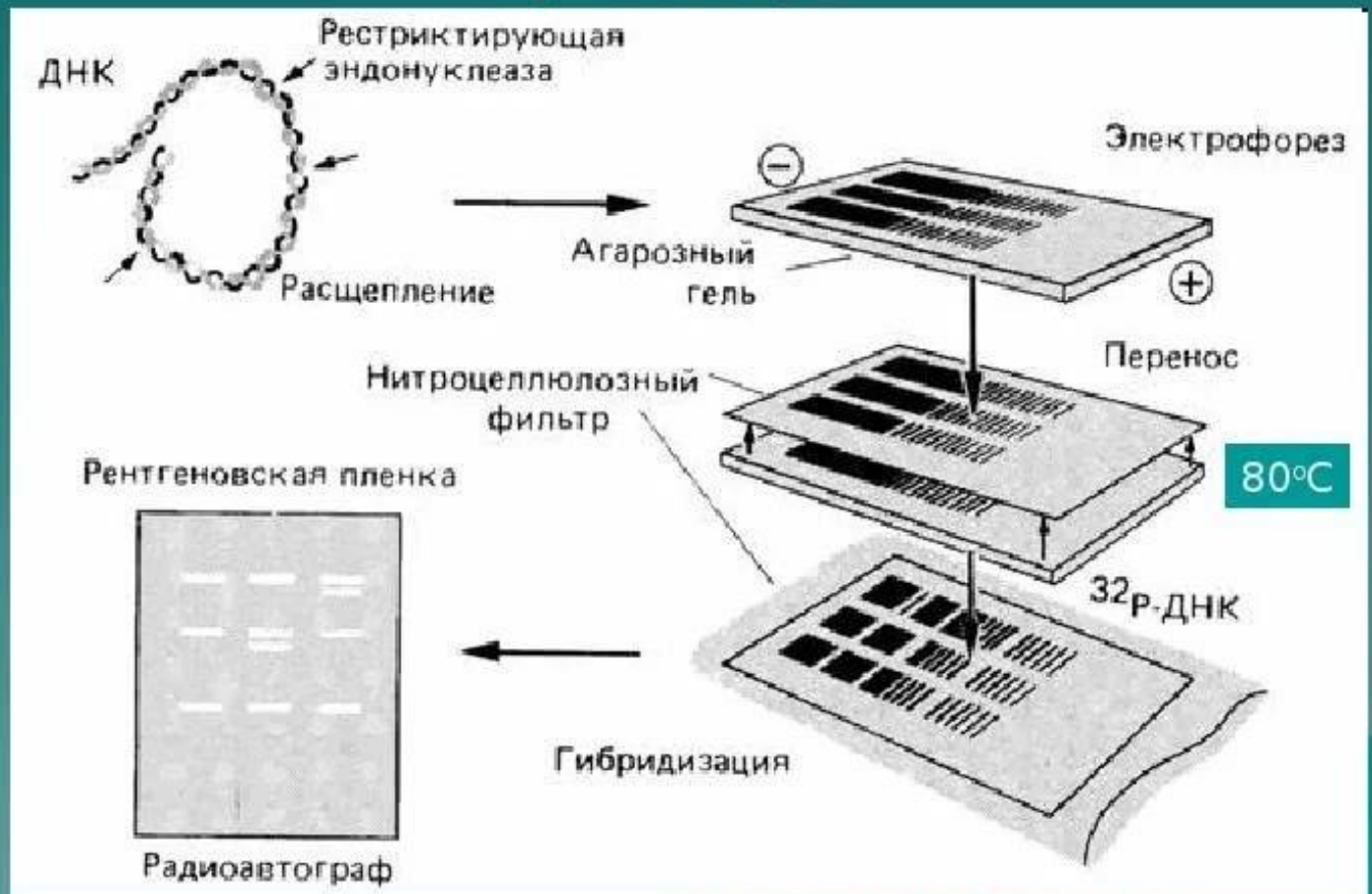
3
Гибридизация
с меченым
ДНК-зондом

Нитроцеллюлозный
фильтр



МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Блоттинг ДНК по Саузерну (1975г)

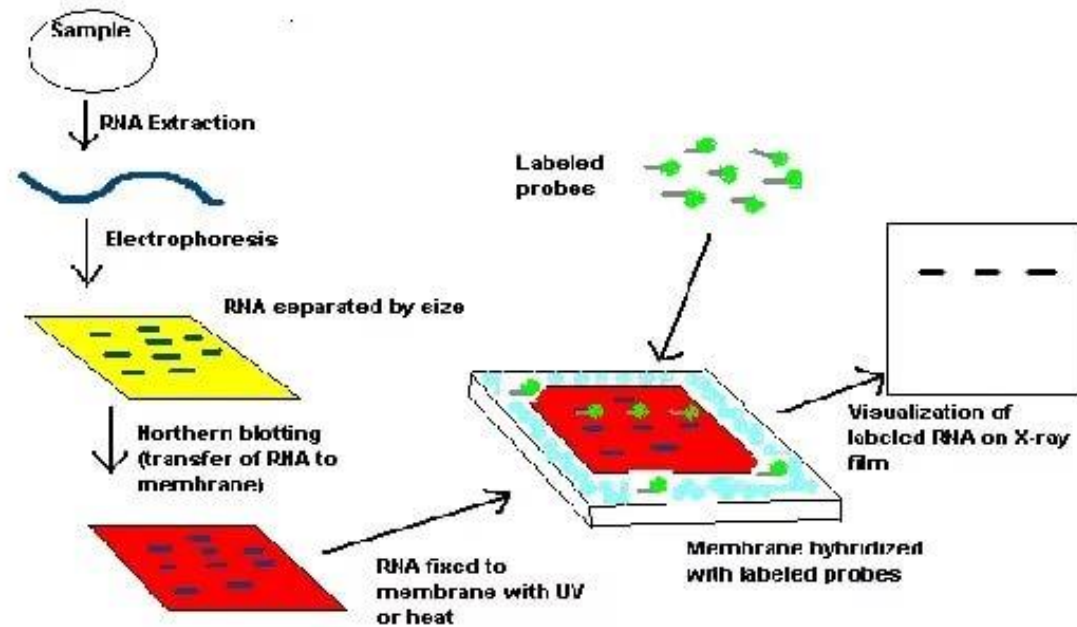


МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Для выделения и анализа РНК (например, для выяснения того, присутствует ли в данном типе клеток мРНК, считанные с данного гена, т.е. экспрессируется ген или нет; для определения количества этой РНК и его изменения в развитии данного типа клеток; для определения размера транскрипта какого-то гена и др.) применяется **Нозерн-блот анализ**.

В данном случае молекулы РНК, выделенные из клетки, разделяются по размерам с помощью гель-электрофореза, а затем переносятся на фильтр. После гибридизации с меченым одноцепочечным зондом выявляются места гибридизации (гомологии) РНК и зонда.

МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ



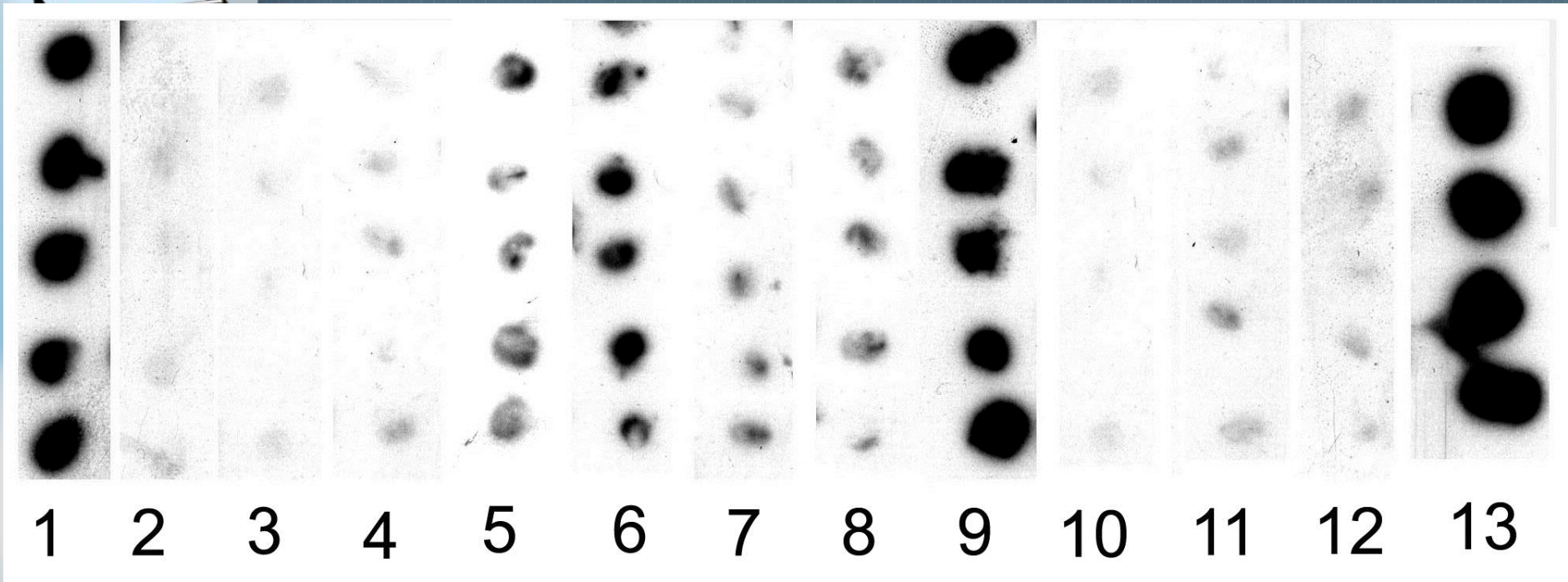
Нозерн-блот - метод исследования экспрессии генов путём тестирования молекул РНК (мРНК) и их фрагментов в образцах.

Гибридизация с *ДНК-зондом* указывает на экспрессию определенного гена.

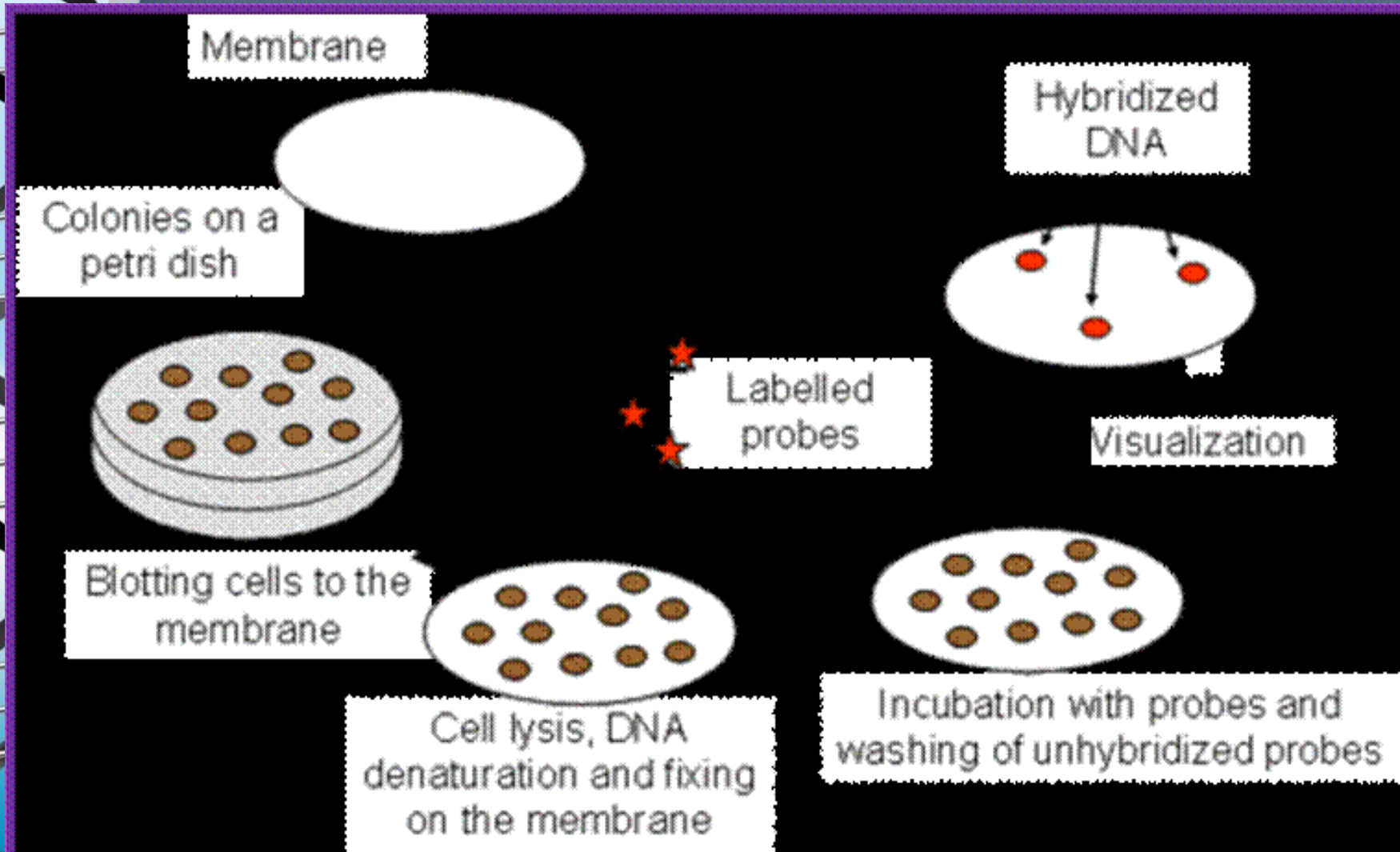
МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Для приготовления **дот-блотов** препарат ДНК или РНК наносят непосредственно на фильтр. Капельки препарата выглядят в виде точек на фильтре, что объясняет название типа блоттинга (англ. dot – точка). Из геномной ДНК, предварительно обработанной ультразвуком, образуются фрагменты длиной 5–10 пар нуклеотидов. Чтобы сделать ДНК- или РНК- пробы доступными зонду, их нужно денатурировать, т.е. перевести в одноцепочечную форму. Это происходит под воздействием температуры 100 °С. Затем денатурированные нуклеиновые кислоты инкубируют на льду: быстрое понижение температуры предотвращает их ренатурацию, т.е. комплементарное спаривание цепей. Денатурированную ДНК или РНК наносят непосредственно на фильтр. Для этого используют два типа фильтров: нитроцеллюлозный и нейлоновый. Чтобы анализируемая нуклеиновая кислота не перешла в раствор, ее необходимо зафиксировать на фильтре. Для иммобилизации нуклеиновых кислот на нитроцеллюлозном фильтре используют прожаривание при 80 °С в вакууме, а на нейлоновом фильтре – УФ-облучение в течение 3–5 минут. После инкубации препарата нуклеиновых кислот с меченым изотопом зондом проводят радиоавтографию в специальной кассете или идентификацию нерадиоактивными методами.

МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДАЦИИ



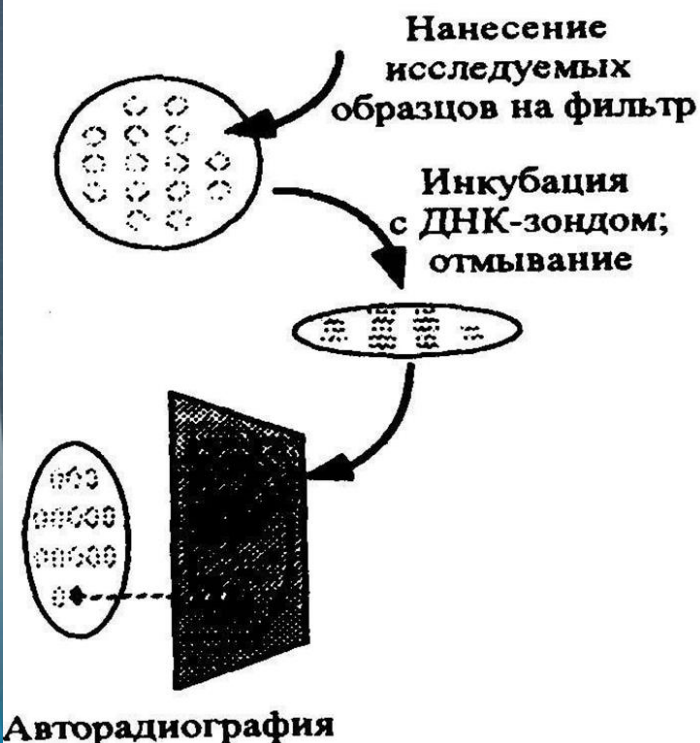
МЕТОД БЛОТ-ГИБРИДАЦИИ



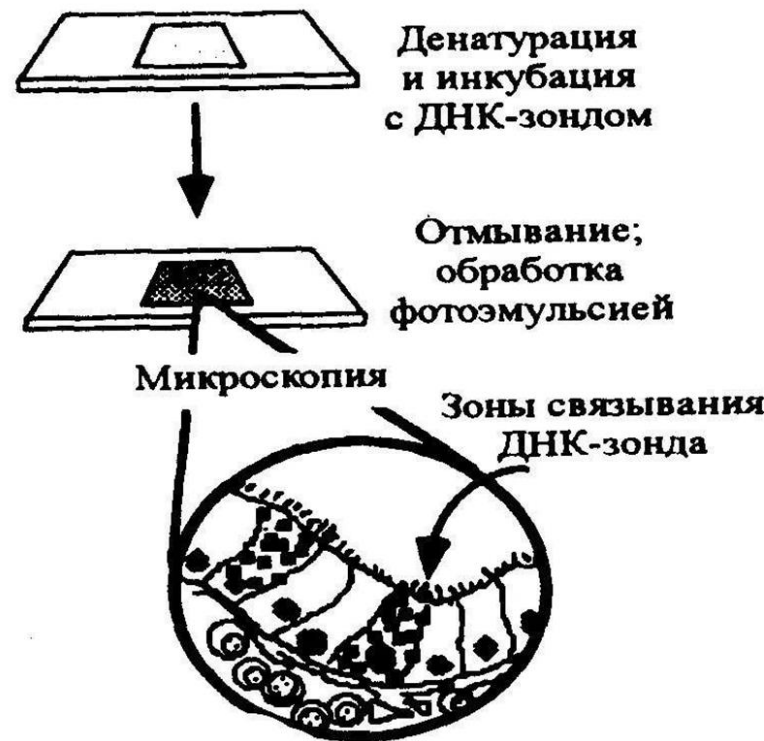
ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Процедуру гибридизации можно проводить не только на геле, на фильтрах или в растворе, но и на гистологических или хромосомных препаратах. Этот метод носит название гибридизации *in situ*.

Гибридизация на твердой фазе



Гибридизация *in situ*





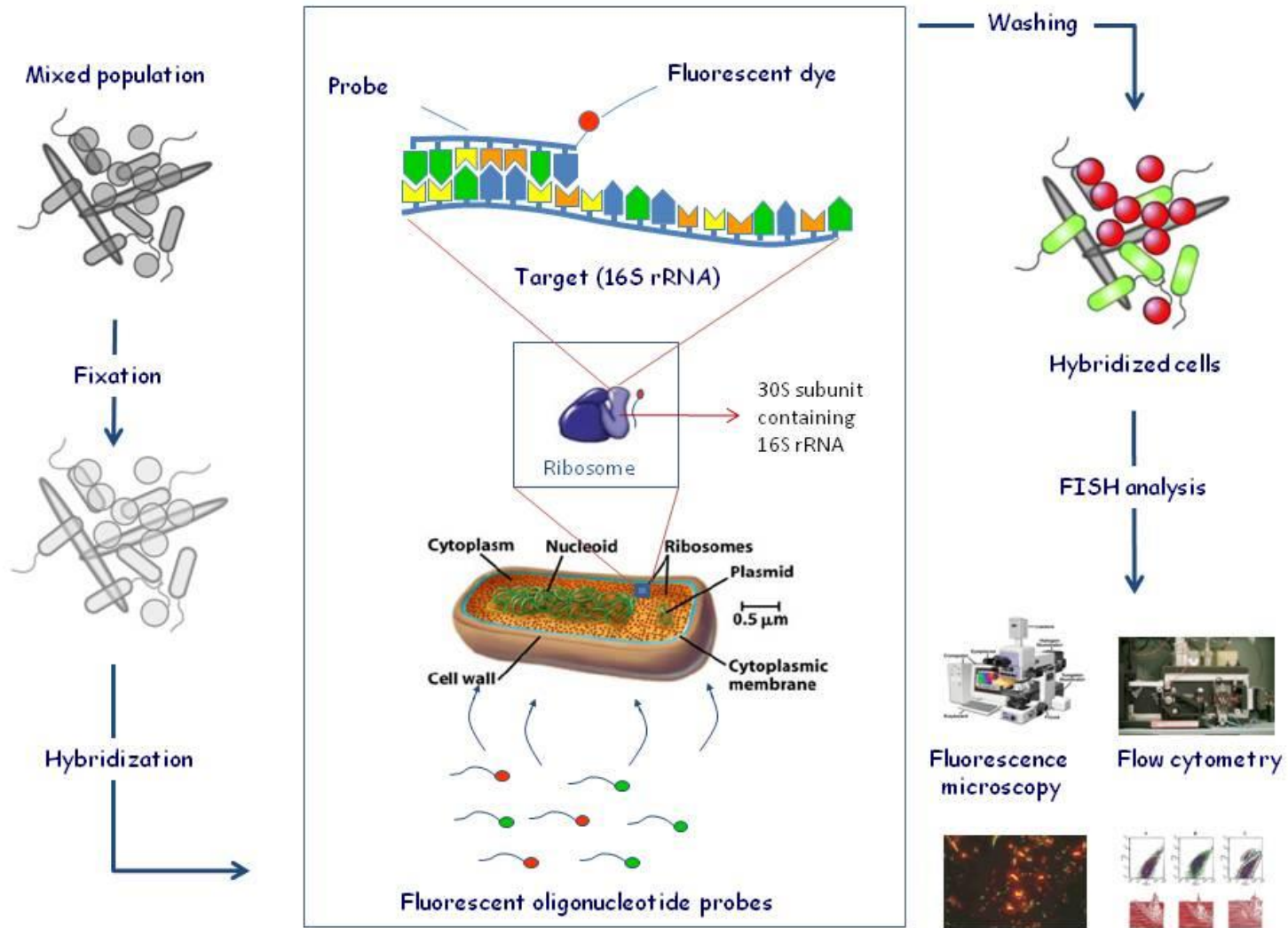
FISH - ГИБРИДИЗАЦИЯ

Вариант метода, при котором в качестве зондов используют препараты ДНК или РНК, меченные флюорохромами, называется FISH (fluorescein in situ hybridization). Меченный ДНК-зонд наносят на препараты дифференциально окрашенных и подготовленных для гибридизации (денатурированных) метафазных хромосом. Предварительная обработка хромосом применяется для облегчения доступа зонда к геномной ДНК. После отмывки несвязанных молекул ДНК и нанесения светочувствительной эмульсии (при использовании радиоактивной метки), либо проведения соответствующей обработки (при использовании биотин- или флюоресцеин-меченных ДНК-зондов) места локализации последовательностей ДНК, комплементарных используемому ДНК-зонду, можно непосредственно выявлять при микроскопии в виде характерных точек над соответствующими участками определённых хромосом.

Данный метод исследования позволяет определить не только хромосомную принадлежность, но и внутрихромосомную локализацию исследуемого гена.

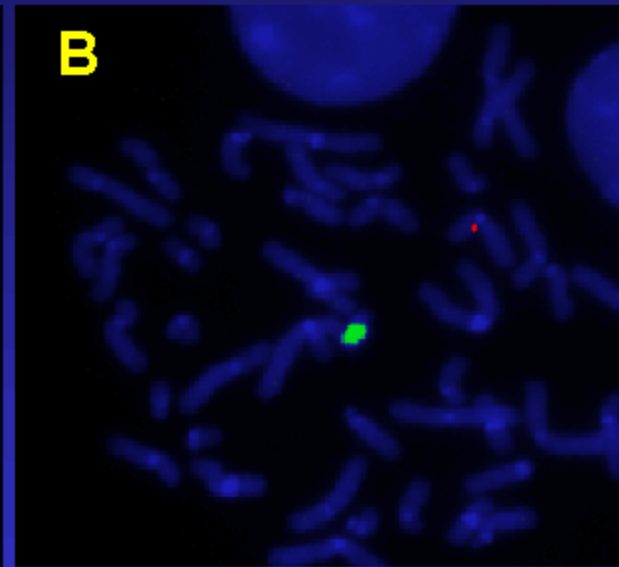
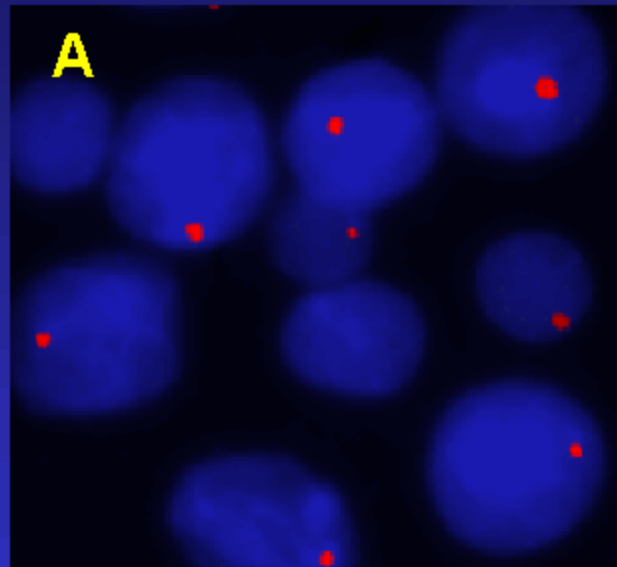
FISH - ГИБРИДИЗАЦИЯ

Fluorescent in situ Hybridization



FISH - ГИБРИДИЗАЦИЯ

Fluorescence *In Situ* Hybridization



A. Hybridization of probe for chromosome X to interphase cells

B. Hybridization of probes for chromosome X and Y to a metaphase spread



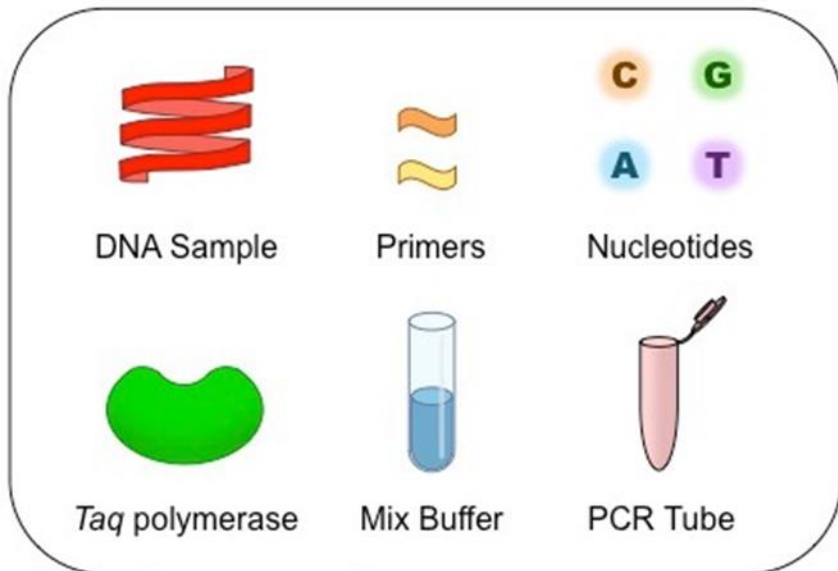
АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Полимеразная цепная реакция, ПЦР (polymerase chain reaction, PCR) - ферментативная реакция, осуществляемая *in vitro* с помощью термостабильной ДНК-полимеразы на матрице ДНК с использованием олигонуклеотидных ДНК-затравок (праймеров), комплементарных нуклеотидным последовательностям противоположных цепей ДНК на границах амплифицируемого участка.

ПЦР представляет собой серию из 3-х циклически повторяющихся реакций: денатурация ДНК, отжиг ДНК-затравок с матрицей и синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы с каждой из затравок навстречу друг другу с использованием противоположных цепей ДНК в качестве матриц. Обычно в сумме осуществляют 20-30 циклов. По завершении каждого цикла количество синтезированного продукта удваивается и происходит увеличение количества анализируемой ДНК в геометрической прогрессии, что позволяет в миллионы раз увеличивать количество изучаемого фрагмента ДНК в пробе.

АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

PCR Components



Thermal Cycler



PCR Cycle

PCR Process (ONE Cycle)



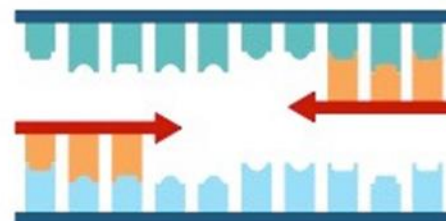
↓ 95°C – Strands separate

1. Denaturing



↓ 55°C – Primers bind template

2. Annealing




↓ 72°C – Synthesise new strand

3. Extension



АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

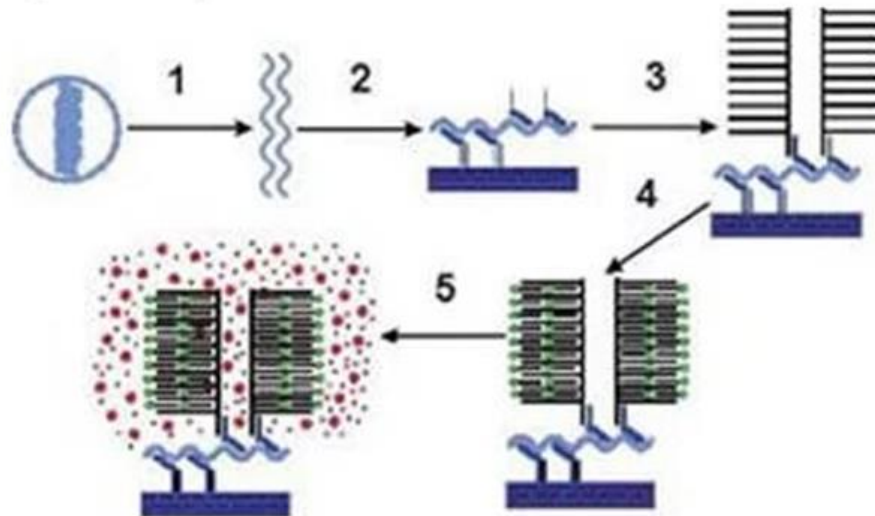


Внедрение метода ПЦР в лабораторную практику стало одним из наиболее важных событий в биологии и медицине. ПЦР позволяет определять малые и сверхмалые количества нуклеиновых кислот, а следовательно, поднимает лабораторную диагностику на принципиально новый уровень - уровень прямого обнаружения инфекционного агента как вирусной, так и бактериальной природы. С помощью ПЦР можно определить любое изменение в генетическом материале, даже единичную генетическую мутацию.

Метод "разветвленной" ДНК (bDNA)

•Метод разветвленной ДНК-гибридизации (bDNA assay — branched DNA assay), в отличие от других методов, основан не на **амплификации** ДНК, а на амплификации сигнала гибридации исследуемой нуклеиновой кислоты с синтетической разветвленной детектирующей молекулой ДНК.

•**амплификация** (англ. amplification) — (от лат. *amplificatio* — усиление, увеличение) — в молекулярной биологии — увеличение числа копий ДНК в результате ее репликации.



1. разрушение организма и денатурация нуклеиновой кислоты
2. гибридизация зонда с мишенью
3. гибридизация bДНК (амплификационный мультимер)
4. гибридизация меченных ферментом зондов
5. детекция: добавление субстрата и измерение хемилюминесценции

ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ

С развитием нанотехнологий средствами медицинской диагностики станут автоматизированные системы гибридизационного анализа, использующие биологические микрочипы (biochips).

ДНК-микрочип (англ. DNA-microarray) — сложная технология, используемая в молекулярной биологии и медицине. Он представляет собой небольшую поверхность, на которую с большой плотностью в определенном порядке нанесены фрагменты одноцепочечной синтетической ДНК с известной последовательностью. Эти фрагменты выступают в роли зондов, с которыми гибридизуются (образуют двухцепочечные молекулы) комплементарные им цепи ДНК из исследуемого образца. Чем больше в образце молекул ДНК с определенной последовательностью, тем большее их количество свяжется с комплементарным зондом. После гибридизации поверхность микрочипа сканируется, и в результате каждой последовательности ДНК ставится в соответствие тот или иной уровень сигнала, пропорциональный числу молекул ДНК с данной последовательностью, присутствующих в смеси.

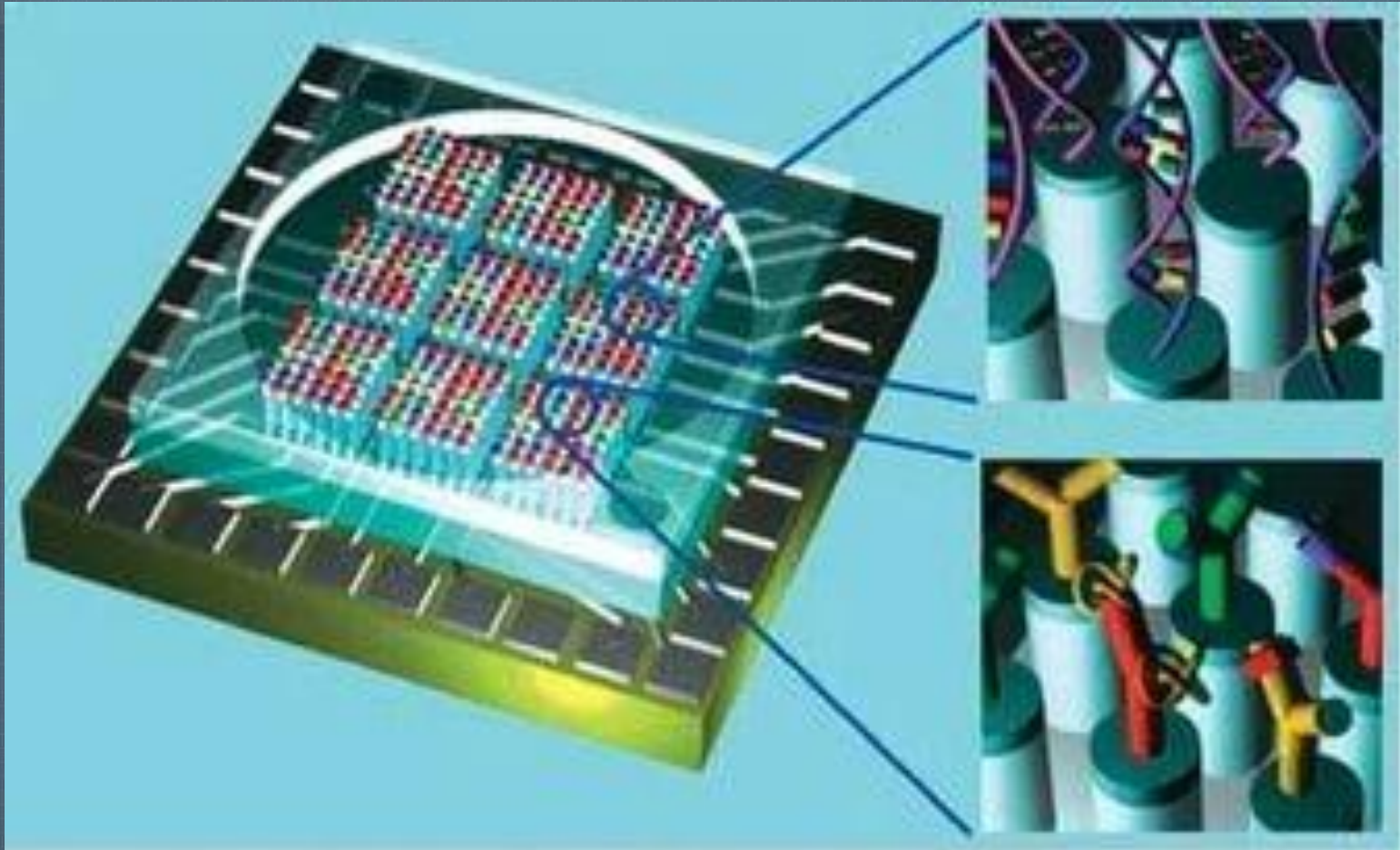
ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ

- В ячейках биологических микрочипов можно иммобилизовать тысячи различных химических веществ, служащих зондами (олигонуклеотиды, ДНК, РНК, белки, рецепторы и др.).
- Зонды очищаются и анализируются качественно и количественно до иммобилизации. Зонды в ячейках находятся в условиях, близких к их состоянию в растворах.
- Трехмерная структура ячеек геля обеспечивает высокую интенсивность регистрируемого сигнала.
- Биологические микрочипы позволяют осуществлять параллельно тысячи химических и ферментативных реакций (гибридизация, амплификация ДНК и РНК, взаимодействие антиген – антитело и др.).
- Результат анализа образца определяется индивидуальным рисунком свечения отдельных ячеек микрочипа, который регистрируется с помощью специальной аппаратуры.
- Биологические микрочипы позволяют изучать кинетические и термодинамические параметры молекулярных комплексов, образующихся при взаимодействии зонда и анализируемого образца.
- Биологические микрочипы стабильны и могут быть использованы многократно.

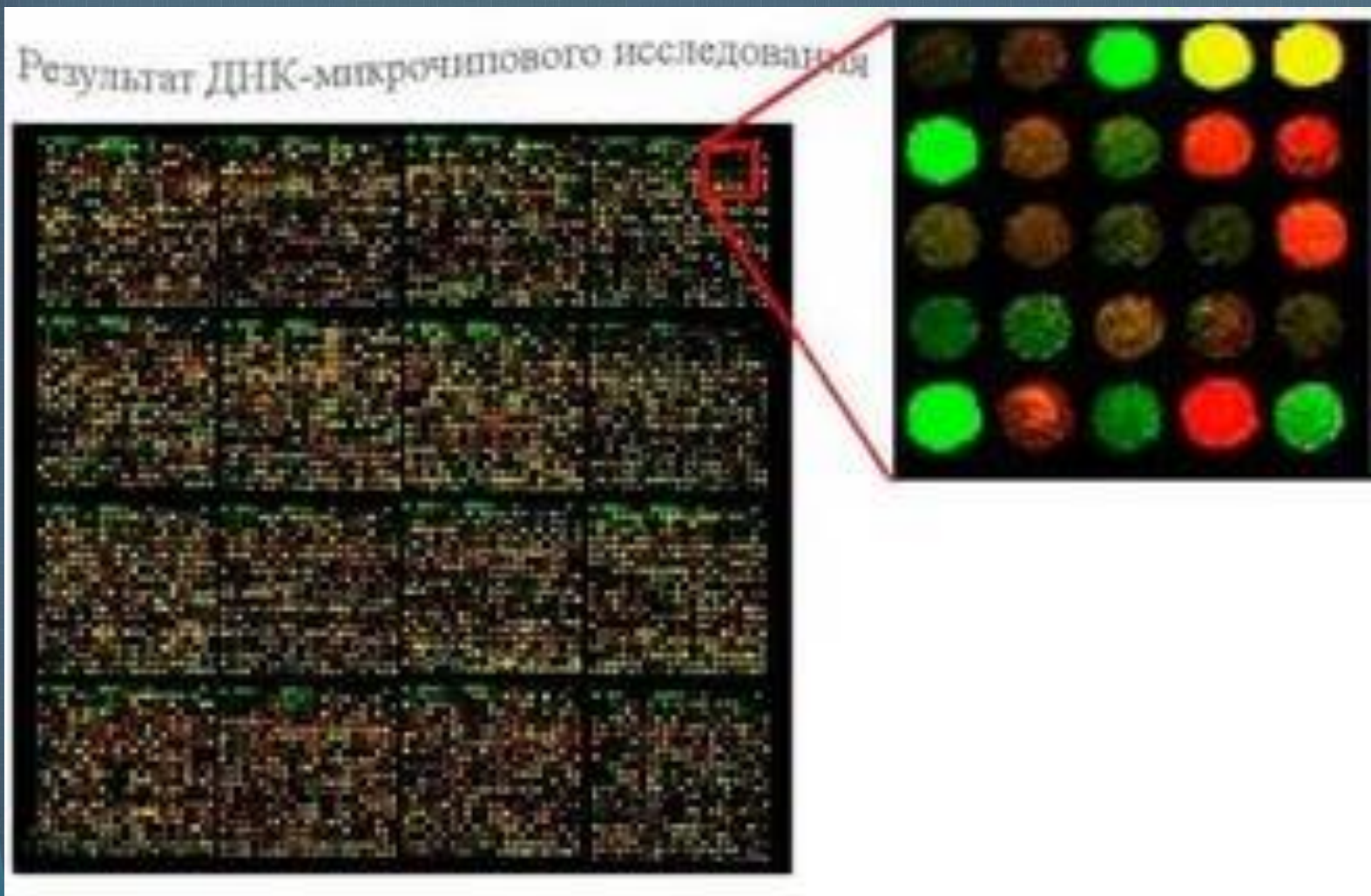
ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ



ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ



ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ

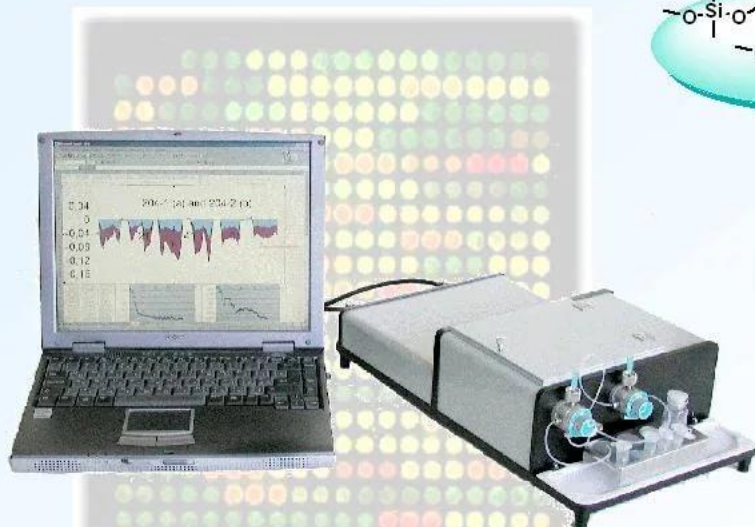


ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ

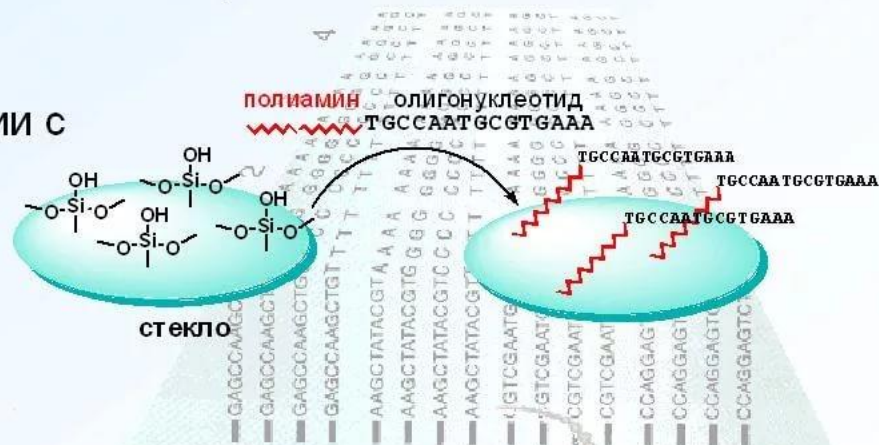
Разработка новых ДНК-чиповых технологий для медицинской диагностики

НИБХ, КТИ ПМ, ИАЭ, ИЦиГ СО
РАН

Разработан автоматизированный поляризационный сенсор для регистрации процессов на поверхности чипов, сигнализирующих о связывании с ним определенных ДНК



Разработаны новые методы получения ДНК-чипов путем присоединения олигонуклеотидов к поверхности стеклянных блоков.



Разработанные методы позволяют выявлять генетические заболевания, обусловленные даже минимальными изменениями в последовательности ДНК, (фенилкетонурия, муковисцидоз) и детектировать различные штаммы вирусов (ВИЧ, гепатит и др.)



ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ

В настоящее время биологические микро-чипы применяют для экспресс-диагностики социально значимых инфекционных, онкологических, сердечно-сосудистых и наследственных заболеваний (анализ изменения экспрессии генов, выявление однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирование или повторное секвенирование мутантных геномов), выявление заранее определенных компонентов среды и в научных исследованиях.

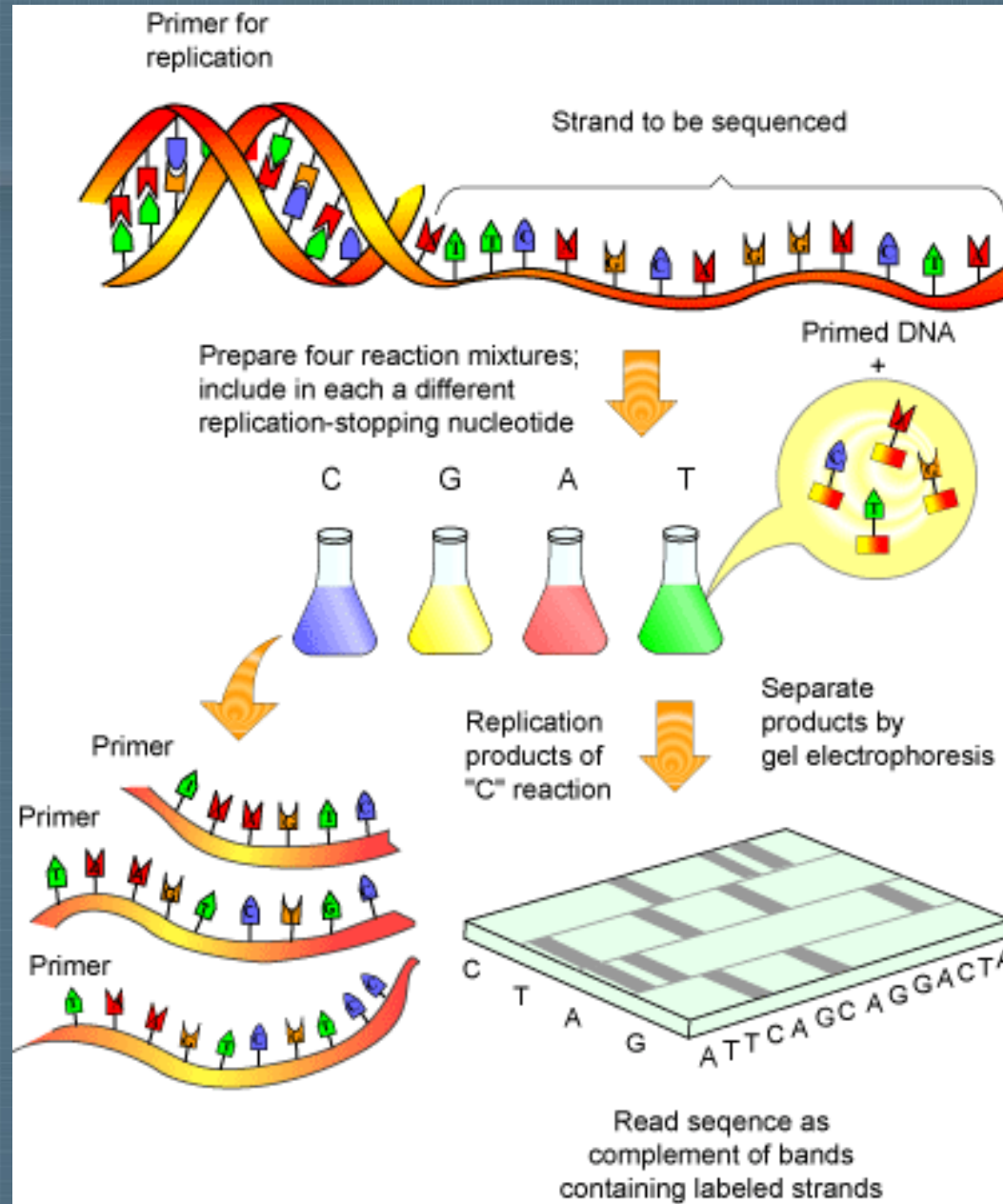


СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Секвенирование - определение точной нуклеотидной последовательности определенного фрагмента ДНК. Изучаемый фрагмент ДНК (например, продукт ПЦР) играет роль матрицы, на которой при участии праймера, дезоксирибонуклеотид-трифосфатов и ДНК-полимеразы инициируется направленный комплементарный синтез новых молекул ДНК, осуществляемый одновременно в 4-х параллельных реакциях.

Смысл метода в том, что в каждую из реакций добавляется один из 4-х химически измененных дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (терминаторов). В качестве таких терминаторов выступают ди-дезоксирибонуклеотид-трифосфаты (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP), которые при встраивании в состав молекулы ДНК обрывают дальнейший синтез полинуклеотидной цепи. В результате этого в каждой из пробирок накапливается набор дочерних молекул ДНК различной длины, оканчивающихся строго на один и тот же нуклеотид. После электрофореза продуктов этих реакций в 4-х соседних дорожках проводится считывание информации от более коротких фрагментов к более длинным, при этом выявляемый пошаговый порядок удлинения цепей и отражает последовательность нуклеотидов в составе анализируемой ДНК-матрицы.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Различные платформы секвенирования используются для генотипирования штаммов бактерий и вирусов, типирования близкородственных микроорганизмов, установления источника происхождения штаммов и определения их ландшафтно-географической принадлежности.

Полногеномное секвенирование позволяет судить об организации систем регуляции транскрипции генов и экспрессии белков, наличии факторов патогенности, генов устойчивости к антибиотикам и противовирусным препаратам.




СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Выявление этиологии заболевания (идентификация и типирование возбудителя, выявление патогенетически значимых маркеров возбудителя - антигенов, токсинов, ферментов и др.) и определение лекарственной устойчивости возбудителя ведет к раннему назначению адекватного лечения, что ускоряет выздоровление, предупреждает осложнения, снижает смертность, а также важно для изучения патогенеза инфекционных заболеваний с целью создания новых лечебных и профилактических препаратов, проведения эпиднадзора.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Ценность специфической диагностики возрастает в условиях происходящей смены патогенов вследствие генетической изменчивости и воздействия факторов внешней среды, появления новых и усиления агрессии известных возбудителей, а также популяционных изменений, в частности роста числа иммунодефицитных состояний, врожденных и перинатальных инфекций, атипичных и хронических форм заболеваний, а также микстинфекций, трудных в диагностике и терапии.





СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

В мировых тенденциях создания методов специфической диагностики инфекционных заболеваний можно выделить 2 основных направления:

1. Высокотехнологичные разработки с максимальной автоматизацией, высокой чувствительностью, специфичностью, производительностью, с использованием микро- и нанотехнологий выявления ДНК/РНК, белков или небольших молекул, желательно на основе мультиплексных технологий, для использования в крупных специализированных лабораториях.

2. Создание быстрых, простых портативных бесприборных методов, также высокой чувствительности и специфичности, но пригодных для использования практически везде, в том числе у постели больного, с использованием портативных чипов и картриджей, что сейчас стало возможным также благодаря использованию высоких технологий.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Основными проблемами генодиагностики являются следующие :

1. Оптимизация метода обработки биопроб для получения ДНК и РНК, пригодных для генотестирования.
2. Оптимизация компоновки реагентов для ПЦР, обеспечивающей их сохранность, удобство транспортировки и простоту проведения анализа.
3. Предотвращение ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

От эффективности перевода ДНК и РНК анализируемой пробы в реакционную смесь ПЦР напрямую зависит достоверность результата анализа. Очевидная проблема здесь состоит в том, что ДНК и РНК из биопробы – жидкости или суспензии объемом 1 мл или более – должны быть переведены в реакционную смесь ПЦР объемом от 20 до 50 мкл, и при этом потенциальные ингибиторы ПЦР должны быть отделены.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Как известно, большим преимуществом ПЦР (и ее изотермического аналога NASBA) является возможность контролировать эффективность амплификации изнутри путем введения в исходную смесь известных количеств специально сконструированных ДНК или РНК, которые размножаются вместе с определяемыми, но дают отличный от них сигнал.

Введение внутреннего стандарта в амплификационный реагент тест-систем позволяет предотвратить наиболее вероятные ложноотрицательные результаты, связанные с ингибиторами ПЦР, которые могут оказаться в реакционной смеси при любом используемом методе подготовки проб. Ингибирование ПЦР будет сразу замечено по отсутствию сигнала внутреннего стандарта.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Проблема предотвращения ложноположительных результатов тесно связана с детекцией размноженных копий фрагментов анализируемых ДНК и РНК – амплификонов. Случайный занос амплификонов в исходную смесь (контаминация) является основной причиной ложноположительных результатов.

Все высокие требования к помещениям для ПЦР-анализа и организации работы как раз нацелены на предотвращение контаминаций амплификонами, которая представляет собой самую серьезную проблему.



СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Наиболее распространенный в клинических ПЦР-лабораториях электрофорез в агарозных гелях, равно как и гибридизация на твердой поверхности (например, в ячейке иммунологического планшета) как раз сопряжены с извлечением продуктов ПЦР из амплификационной пробирки и переносом их в систему для анализа, что и создает возможность контаминации.

Использование флуоресцентной детекции в закрытой системе (гибридизационной или с применением неспецифических красителей-флуорофоров типа SYBR Green) полностью исключает попадание амплификатов в окружающую среду, снимает проблему контаминаций и снижает требования к организации ПЦР-лабораторий. На такой детекции основана ПЦР в реальном времени, уже определившаяся в качестве будущего универсального генодиагностического метода.



СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Однако приход флуоресцентной детекции в ПЦР-анализ вполне может вызвать и определенное новое ограничение метода. Если реакционная смесь ПЦР становится элементом оптической системы, то наличие в ней посторонней окраски или взвеси может существенно исказить результат. Такое нередко бывает при простых методах обработки проб и не мешает последующей ПЦР с электрофоретической детекцией.

Вероятно, следующим прорывом будет как раз уход от оптических методов. Недавнее сообщение фирмы Toshiba о разработке системы детекции продукта ПЦР на электрохимической основе может оказаться шагом в этом направлении.



СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ И МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

В рамках данных направлений крайне актуальным является разработка и усовершенствование следующих диагностических систем:

- диагностикумы, основанные на принципе ПЦР;
- многопараметрические диагностические тест-системы на основе ПЦР с детекцией результатов в реальном времени;
- диагностические тест-системы на основе ИФА;
- многопараметрические диагностические тест-системы, основанные на технологии суспензионных биочипов;
- диагностические тест-системы, основанные на использовании геномного анализа и секвенирования, включая полногеномное секвенирование;
- диагностические тест-системы, основанные на новых физических принципах (методы плазмонного резонанса).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы занимают одно из важнейших мест в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями, поскольку отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, экспрессностью.

Использование молекулярно-генетических подходов, основанных, в частности, на амплификации нуклеиновых кислот, особенно актуально и дает прекрасные результаты в случаях, когда возбудитель относится к группе труднокультивируемых или некультивируемых, а также присутствует в небольшом количестве.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня в нашей стране идет активное внедрение генодиагностики в практическое здравоохранение для установления причин инфекционных заболеваний, а также механизмов, путей и факторов их передачи.



**Благодарю
за внимание!**

