ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России

Заведующий кафедры туберкулеза с курсом ПО

доцент, к.м.н. Омельчук Данил Евгеньевич

Реферат на тему:

**«Молекулярно-генетические методы в диагностике и дифференциальной диагностике туберкулеза»**

 Выполнил: ординатор специальности«Фтизиатрия»

 Деревянкин Егор Андрееевич

Проверил: Заведущий кафедры туберкулеза с курсом ПО

Омельчук Данил Евгеньевич

Красноярск 2022

Введение……………………………………….…………………………………..3

Основы проведения метода ПЦР …………...…………………….....…………..4

Осуществление рутинных методик ПЦР…………………………...…………...4

ПЦР диагностика туберкулеза легких...........................…………………………9

Забор материала....................……………………………………………………..10

Предобработка проб…………..………………………………………………….10

Условия хранения материала и предварительно обработанных проб.................10

Условия транспортирования материала...............................................................11

Аналитический этап...............................................................................................11

Список литературы ……………………………………………………………...12

 ВВЕДЕНИЕ

ДНК-диагностика - это один из наиболее современных высокотехнологичных методов исследования. ДНК-анализы широко применяются в диагностике инфекционных заболеваний, позволяя обнаруживать даже единичные микроорганизмы в организме человека.

ДНК-диагностика объединяет несколько методов исследования, самый распространенный из них - метод ПЦР (полимеразной цепной реакции, Polymerase chain reaction, PCR diagnostics) . На сегодняшний день ПЦР -анализ является одной из наиболее распространенных и динамично развивающихся технологий лабораторной диагностики. Ежегодно на рынке появляется все больше тест-систем, предназначенных для выявления как возбудителей различных заболеваний, так и мутаций генов человека, животных и растений. Количество ПЦР-лабораторий неуклонно увеличивается, а ПЦР-анализ становится все более востребованным среди специалистов и пациентов. Первоначально сам принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэри Мюллисом в 1983г. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет, и за разработку ПЦР-анализа Кэрри Мюллис уже в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии . Особое место метод ПЦР нашел в диагностике туберкулеза. Традиционные микробиологические методы выявления возбудителя не всегда позволяют подтвердить диагноз туберкулез. Метод люминесцентной бактериоскопии и посева на питательные среды обладают низкой чувствительностью и обнаруживают М.tuberculosis в среднем лишь у 50-60% больных активным туберкулезом легких. В связи с этим внедрение в практику новых молекулярно-генетических методов исследования способствует проведению диагностики туберкулеза в максимально короткие сроки и с наибольшей чувствительностью.

Основы проведения метода ПЦР

Любой метод ДНК-диагностики основан на специфической гибридизации двух нитей ДНК, комплементарных (структурно дополняющих) одна другой. Примерной (хотя и весьма приблизительной) аналогией может служить серологическая реакция, основанная на специфической реакции белка-антитела с соответствующим антигеном. Специфичность связывания нитей в спирали ДНК основана на связях А-Т и Г-Ц. Праймеры комплементарны искомым участкам ДНК, и поэтому они способны связываться с конкретными участками гена. Достройка нитей ДНК, начиная с добавленных праймеров, требует наличия в реакционной смеси пурин-и пиримидинтрифосфатов (АТФ, ТТФ, ГТФ и ЦТФ), а также присутствия ДНК-полимеразы, которая соединяет их в цепочку согласно последовательности второй нити ДНК

Осуществление рутинных методик ПЦР

Исследуемым материалом для ПЦР могут служить соскобы эпителиальных клеток, кровь, плазма, сыворотка, плевральная и спинномозговая жидкости, околоплодная, суставная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, сок простаты, слюна, моча, мокрота, слизь и другие биологические выделения, биоптаты.

Забор материала производится в условиях процедурного кабинета соответствующего профиля. После забора пробы как можно скорее должны быть доставлены в ПЦР-диагностическую лабораторию.

Забор образцов необходимо производить при помощи стерильного, желательно одноразового, инструментария только в одноразовые стерильные пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение часа хромовой смесью, тщательно промытые дистиллированной водой и прокаленные в сушильном шкафу при температуре 150 °С в течение 1 часа.

1. Выделение ДНК из клинического образца производится любым способом. Основное требование - достаточно стандартный выход продукта и интактность, сохранение двухнитевой структуры.

Проведению ПЦР предшествует стадия выделения и преципитации ДНК из исследуемого материала. Это обеспечивает концентрирование обнаруживаемой ДНК инфекционного агента в минимальном объеме жидкости, используемой в ПЦР. В случаях, когда не требуется достижения высокой чувствительности анализа, например, при идентификации МБТ после первичного культивирования, достаточна их обработка, позволяющая лишь разрушить микробную стенку: нагревание в лизирующем буфере, ультразвуковая обработка или использование ферментов (лизоцим) без последующего выделения ДНК.

При отсутствии в пробе ингибиторов Taq-полимеразы (гемоглобина или других) и наличия десятка копий ДНК-матрицы в объеме, вносимом в пробирку со смесью всех реагентов ПЦР, подготовка пробы может быть полностью исключена. Например, вирус гепатита В в сыворотке крови и многие возбудители инфекционных менингитов в спинномозговой жидкости можно детектировать методом ПЦР без всякой подготовки, без предварительного выделения из них ДНК. В большинстве случаев из исследуемой пробы крови, сыворотки, лейкоцитов, биоптатов, мочи, мокроты для исключения ложноотрицательного результата следует выделить ДНК тем или иным способом [1]. Благодаря этому происходит концентрирование исследуемой ДНК-матрицы в малом объеме и удаление ингибиторов Taq-полимеразы.

В настоящее время используется несколько способов подготовки образца для проведения ПЦР. Процедура подготовки пробы включает лизис микроорганизма и экстракцию нуклеиновой кислоты. С целью разрушения клетки используют простое кипячение, замораживание-оттаивание в присутствии лизоцима, а также специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу. Выбор метода диктуется природой микроорганизма, а точнее - природой его клеточной стенки.

Для экстракции ДНК используют два основных метода. Во-первых, применяют классическую процедуру фенольно-хлороформной экстракции. При этом достигается хорошая очистка ДНК и, в первую очередь, от ингибиторов Taq-полимеразы, но неизбежны большие потери нуклеиновой кислоты, особенно заметные при работе с образцами небольшого объема с низкой концентрацией инфекционного агента. Другой способ, применяемый для очистки нуклеиновой кислоты, основан на использовании сорбентов. Подготовка материала с его использованием занимает меньше времени и более проста в исполнении, хотя не всегда может быть применена, так как не гарантирует удаление возможных ингибиторов.

2. Амплификация. Полимеразная цепная реакция ДНК проводится в специальном приборе (термоциклере или амплификаторе), который, согласно введенной программе, изменяет температуру в рабочих ячейках, держит ее в течение заданного времени и переходит к следующему этапу.

Каждый цикл ПЦР обычно состоит из трех температурных режимов.

а) Нагрев до 95 °С в течение 30-40 сек. При этом выделенные молекулы ДНК подвергаются денатурации, т. е. происходит разделение ДНК на две нити. полимеразный туберкулез микобактерия легкие

б) Охлаждение до оптимальной температуры (обычно 48-66 °С). При этом разделенные нити ДНК могут обратно воссоединиться по комплементарным участкам. Однако, при наличии в образце целевых участков ДНК, синтетические ДНК-зонды (праймеры, длиной 15-30 п.н.) специфически связываются (гибридизуются) с комплементарными участками ДНК, например хламидии или герпесвируса. Тем самым ограничиваются искомые участки генов, определяя точки начала и окончания предполагаемого продукта ПЦР. Время отжига 20-60 сек.

в) После завершения гибридизации праймеров с искомыми участками ДНК, температуру смеси повышают до 72 °С. Эта температура оптимальна для фермента Таq ДНК-полимеразы, которая начинает быстро достраивать одну и другую цепочку ПЦР-продукта, начиная с места фиксации, соответственно, одного и второго ДНК-зонда. Этот процесс называется элонгацией (т. е. удлинением) ПЦР-продукта, сами же продукты ПЦР именуют ампликонами. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

При первом цикле ПЦР получается некоторое число ампликонов различной длины, которые служат субстратом во втором цикле реакции, где количество специфических продуктов удваивается еще раз. В каждом из последующих циклов (всего до 35-40) происходит двукратное возрастание числа целевых продуктов ПЦР-ампликонов.

Специфичность ПЦР и количество амплифицируемой ДНК, которое определяет чувствительность, могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Taq-полимеразы, праймеров, дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и ионов Mg) и температурного режима ПЦР.

Даже при оптимальных концентрациях фермента, ионов Mg, праймеров и dNTP специфичность и чувствительность ПЦР очень сильно зависит от температуры отжига праймеров (2-я стадия цикла ПЦР): неспецифичность ПЦР-амплификации повышается при снижении температуры отжига ниже оптимальной и при повышении концентраций праймеров и dNTP выше оптимальных, а при повышении температуры отжига выше оптимальной снижается выход специфической амплифицируемой ДНК вплоть до ее полного исчезновения.

. Детекция.

Способы учета результатов ПЦР:

Качественная оценка (электрофоретический метод)

Во многих случаях при ПЦР-диагностике достаточно получить ответ "да" или "нет", как, например, при первичном выявлении инфекционных возбудителей, судебно-медицинских исследованиях, определении генных мутаций, специфических онкогенов и др. Обычным способом разделения продуктов ПЦР и идентификации специфического гена является электрофорез в агарозном или (реже) полиакриламидном геле. Методики электрофоретического разделения достаточно стандартизированы и дают вполне воспроизводимые результаты. Результат должен быть безусловно отрицательным в контроле без изучаемой ДНК и положительным - в пробе с ДНК, содержащей искомый участок гена. Положительный контроль может представлять собой целевую ДНК или участок гена, клонированный в плазмиде или амплифицированный с помощью ПЦР

Для учета результатов качественной ПЦР может быть использован и метод флуоресцентной детекции. Для этого по окончании ПЦР определяют наличие или отсутствие специфического сигнала с помощью специальных флуориметров (так называемый flash-метод). Поскольку здесь нет необходимости и в электрофоретическом оборудовании, то очевидна существенная экономия рабочих зон и реагентов для лаборатории.

Методы учета результатов ПЦР без применения электрофореза наиболее уместны и выгодны для многопрофильных лабораторий, где ПЦР-методы составляют лишь некоторую часть общего производственного процесса.

В таких крупных лабораториях часто определяется лишь ограниченный круг наиболее востребованных микроорганизмов. На медицинских рынках предлагается целый ряд flash-наборов для диагностики заболеваний, передающихся половым путем, и ряда вирусных инфекций. Этот ассортимент патогенов вполне достаточен для многих больничных лабораторий, и они могут с начала своей деятельности сделать акцент на подобных методах анализа.

Количественная оценка результатов ПЦР

В ряде клинических ситуаций возникает вопрос о динамике патологического процесса и/или эффективности проводимой терапии. Эти вопросы наиболее актуальны при обследовании пациентов с хроническими инфекциями (гепатиты В и С, МБТ, вирус иммунодефицита человека и др.). При диагностике исходят из того, что накопление продуктов ПЦР (ампликонов) пропорционально содержанию копий искомого гена в исследуемой пробе.

Естественно, учет результатов количественной ПЦР можно проводить и с помощью гель-электрофореза с анализом интенсивности специфических сигналов ПЦР. Обязательным условием правильной количественной оценки результатов ПЦР являются надежные положительные контрольные пробы с известным содержанием копий искомого гена (например, 1000 копий гена МБТ на одну ПЦР-реакцию). Ряд последовательных разведений количественного контроля дает возможность построить калибровочные кривые, по которым можно оценивать содержание генокопий в клинических образцах .

Ключевым достижением в проведении количественной ПЦР стала разработка флуоресцентных ДНК-зондов, которые добавляются в реакционную смесь наряду с "обычными" праимерами и дают возможность отслеживания хода ПЦР во времени (так называемая real-timе-ПЦР), которая в 1993-1994 гг. была внедрена в соответствующих приборах и диагностических системах (принцип ТаqМаn). Существует еще несколько методов конструирования ДНК-зондов для количественной ПЦР.

Методология ТаqМаn предусматривает синтез флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеющих на концах две метки. Одна из них - флуоресцентная молекула, другая - молекула-гаситель этой флуоресценции. Таq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивает нуклеотидную цепочку, но и разрушает связанный флуоресцентный зонд. При этом флуоресцирующая метка выходит в свободное состояние, освобождаясь от влияния гасителя. Поэтому интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу ампликонов и, соответственно, числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом термоблока-амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции в каждой пробирке (принцип real-time-ПЦР). В результате после 20-40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые. По калибровочным кривым с контрольными образцами возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Важная особенность проведения ПЦР флуоресцентным методом состоит в том, что пробирки с ПЦР-смесью не нужно открывать при учете результатов. Благодаря этому уменьшается вероятность загрязнения помещений продуктами амплификации и отпадает необходимость в выделении специальных рабочих зон для проведения электрофореза.

ПЦР диагностика туберкулеза легких

Особенности метода

Высокая специфичность

Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов в отличие от метода иммуноферментного анализа, где нередки ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами. ПЦР аналогична росту бактерий на искусственных питательных средах (процессу биологической амплификации), при которой одна микробная клетка, образуя видимую колонию, амплифицируется в 105-106 раз, давая возможность определить свойства бактерии, манипулируя уже с целой колонией. Как и питательные среды, которые могут быть селективными, поддерживающими рост только одного микроорганизма, или обогатительными, дающими возможность размножаться широкому кругу микроорганизмов, так и праймеры, определяющие специфичность ПЦР, могут быть строго видоспецифичными или с их помощью можно выявить целые рода или семейства микроорганизмов.

Высокая чувствительность.

Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, дающей возможность обнаружить единичные бактериальные клетки. Но это преимущество ПЦР уместно рассматривать при сравнении с другими молекулярно-генетическими или иммунологическими методами диагностики. Использование ПЦР позволяет определять инфекционный агент непосредственно в биологическом материале с исключительно высокой чувствительностью - порядка 1-10 микроорганизмов при высокой специфичности, обеспечиваемой последовательностью нуклеотидов синтезируемого фрагмента ДНК.

Однако высочайшая чувствительность ПЦР обычно достигается при работе с чистой культурой микроорганизма или, что еще лучше, с очищенной нуклеиновой кислотой. Эта чувствительность автоматически не трансформируется в чувствительность метода при работе с клиническим материалом. На успех определения при работе с этим материалам влияют такие факторы, как методика приготовления образца, возможное присутствие ингибитора фермента, осуществляющего амплификацию, объем образца при низких концентрациях тестируемых молекул.

Высокая скорость получения результата анализа

Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, занимающее большое количество времени. Унифицированный метод обработки материала и детекции продуктов реакции, автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4,5 часа. Этим он выгодно отличается от других лабораторных методов, которые дают замедленные результаты

Забор материала

Забор материала осуществляют в количестве не менее 0,5 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы (пробирки) с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для предотвращения попадания пищи в мокроту, перед сбором мокроты нужно прополоскать рот.

Мокроту желательно собирать до приема пищи. Собирают мокроту, отделяющуюся при кашле, а не при отхаркивании.

Предобработка проб

Перед выделением нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение мокроты, используя раствор «Муколизин». В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 (5 частей «Муколизина» к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке емкости. В процессе разжижения мокроты (20-30 мин) емкость периодически встряхивают. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или в микроцентрифужную пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 5-7 тыс. g (8-10 тыс об./мин. на центрифуге) в течение 10 мин. В случае исследования на бактериальные агенты полностью удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя с колбой-ловушкой, осадок ресуспендируют в PBS-буфере, доведя общий объем пробы до 0,1 мл.

 Условия хранения материала и предварительно обработанных проб

• при температуре 2-8°С - в течение 1 суток;

• при температуре минус 20°С - в течение 1 недели;

• при температуре минус 70°С - длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

 Условия транспортирования материала

Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом:

• при температуре 2-8°С - в течение 6 часов;

• в замороженном виде - в течение 1 суток.

Аналитический этап

ПЦР - диагностика туберкулеза как правило строится на использовании последовательностей ДНК специфичных для всех 4 видов группы туберкулеза. Часто для этих целей используют праймеры для выявления последовательностей IS-элементов, например, IS-986 или IS-6110, поскольку данные мигрирующие элементы характерны только для видов микобактерий группы туберкулеза и присутствуют в геноме микобактерий в числе нескольких копий. Выделение ДНК из чистых культур и клинических образцов (мокроты больных) возможно осуществлять любым приемлемым методом, например, методом Boom с использованием лизирующего буфера на основе гуанидина тиоционата и двуокиси кремния в качестве носителя ДНК.

В качестве примера праймеров для идентификации микобактерий группы туберкулеза можно привести праймеры, фланкирующие фрагмент размером 245 нп мигрирующего элемента IS-986, содержащегося в геноме M.tuberculosis в числе 2-8- копий. Последовательность праймеров:

INS1 5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC - 3'5' - GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA - 3'

Амплифицированный фрагмент выявляют электрофорезом в 1,6 % агарозном геле.

Данная пара праймеров была проверена на специфичность с использованием в качестве контроля 100 нг/проба ДНК близкородственных микроорганизмов; ДНК возбудителей легочных, заболеваний; ДНК микроорганизмов, входящих в нормальную микрофлору человека (например, E.coli, S.aureus и др.); образцов ДНК человека.

Испытания данной пары праймеров с параллельным бактериоскопическим и культуральным обследоваванием были проведены на клинических образцах мокроты, полученных от больных с различными клиническими формами туберкулеза. Методом ПЦР возбудитель был выявлен у 90,6% больных туберкулезом, в то время как значительно более длительными по времени микробиологическими методами микобактерии были выявлены только у 21 (39,6%) больного

Список литературы

1. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции от 22.06 1995.

2. Щербо С.Н. ПЦР в клинической лабораторной диагностике: реальности и перспективы //Справочник заведующего КДЛ 2006. №10 с. 45-48

3. Тарасенко И.М. Правила организации работы КДЛ с патогенными биологическими агентами // Справочник заведующего КДЛ 2007. №6 с.37-40.

4. Херсонская А.М. Современные методы клинической диагностики: ПЦР в режиме реального времени // Справочник заведующего КДЛ 2007. №11 с.31-36

5. Чухловин.А.Б. Метод ПЦР в клинической лабораторной диагностике // Справочник заведующего КДЛ. 2008. №4 с.46-50

6. Херсонская А.М., Амон Е.П. Типовые ошибки при диагностике методом ПЦР // Справочник заведующего КДЛ 2008. №5 с.30-36