

Молекулярная диагностика инфекционных и инвазионных заболеваний животных.



д. б. н. Гребенникова Т. В.

ГУ НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского

НПО НАРВАК

- Метод полимеразной цепной реакции
- Метод множественной ПЦР
- ПЦР в реальном времени – диагностика
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Молекулярная диагностика

Диагностика на уровне молекул.

Метод позволяет определять непосредственно патоген (вирус, бактерию, простейшие организмы)

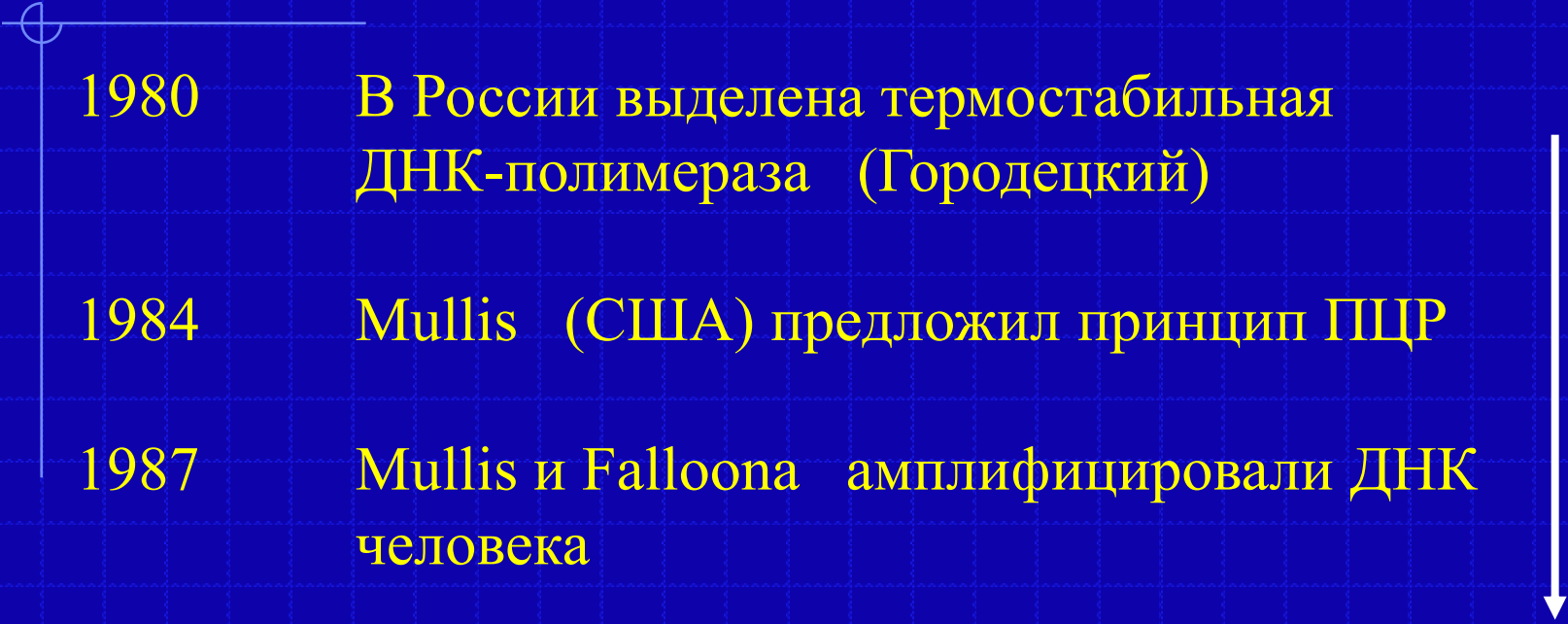
Определяются сверхмалые количества нуклеиновых кислот ДНК или РНК (несколько вирусных геномов).

Может быть определен не только есть патоген или нет, но и сколько в пробе.

Пробы могут быть получены из различных биологических образцов животных и птиц (кровь, моча, мокрота, смывы, соскобы, биопсийный материал), а также из окружающей среды (вода, почва, аэрозоли воздуха).

Требуются отдельные помещения, специальное оборудование, особая подготовка специалистов.

Молекулярные методы появились в 80-х годах

- 
- 1980 В России выделена термостабильная ДНК-полимераза (Городецкий)
 - 1984 Mullis (США) предложил принцип ПЦР
 - 1987 Mullis и Falloona амплифицировали ДНК человека
 - 1988 Метод ПЦР стал лабораторным методом
 - 1990 Молекулярные методики стали широко использоваться в клиниках

Прогноз рынка молекулярной диагностики

Cambridge Healthtech Institute, Oct 2003, Pages: 240

In the year 2002, the global market for molecular diagnostics totaled approximately \$3.7 billion.

By 2005 this market is expected to be worth \$5.5 billion, representing approximately 3% of the total diagnostics market and approximately 12% of the in vitro diagnostic market.

The molecular diagnostics market will expand to \$12 billion by 2010.

Применение метода ПЦР

- Молекулярная биология
- Медицина
- Ветеринария
- Судебно-медицинская экспертиза
- Палеонтология
- Пищевая промышленность
- Охрана окружающей среды

ПЦР в контроле за окружающей средой

Водоемы

- спорообразующие бактерии
- грибы
- водные вибрионы
- возбудители кишечных инфекций
- гноеродные кокки
- сибиреязвенные бациллы
- лептоспиры
- туляремиальные бактерии
- энтеровирусы

Почва

СПОРЫ:

- возбудителей сибирской язвы
- столбняка
- газовой гангрены
- ботулизма

Воздух

В закрытых помещениях:

- гемолитические стрептококки
- микобактерии туберкулеза
- дифтерийная палочка
- палочка коклюша
- вирусы (гриппа и др.)

После кратковременного подроста в культуре возбудитель определяют методом ПЦР. Время обнаружения некоторых возбудителей методом ПЦР по сравнению с микробиологическим исследованием может сокращаться в 10-20 раз.

Применение ПЦР в медицине и ветеринарии

- Диагностика инфекционных и заболеваний бактериальной и вирусной природы
- Диагностика наследственных заболеваний
- Диагностика онкологических заболеваний
- Дифференциальная диагностика. Генотипирование

- Получение рекомбинантных вакцин
- Контроль эффективности генотерапии
- Работа с трансгенными животными

Трансплантология
(обследование доноров органов на инфицированность микроорганизмами)
Контроль безопасности донорской крови, ее компонентов, препаратов плазмы

Оценка эффективности лечения различными препаратами
(количественное определение инфекционного агента после курса лечения)

Принцип диагностики при помощи ПЦР

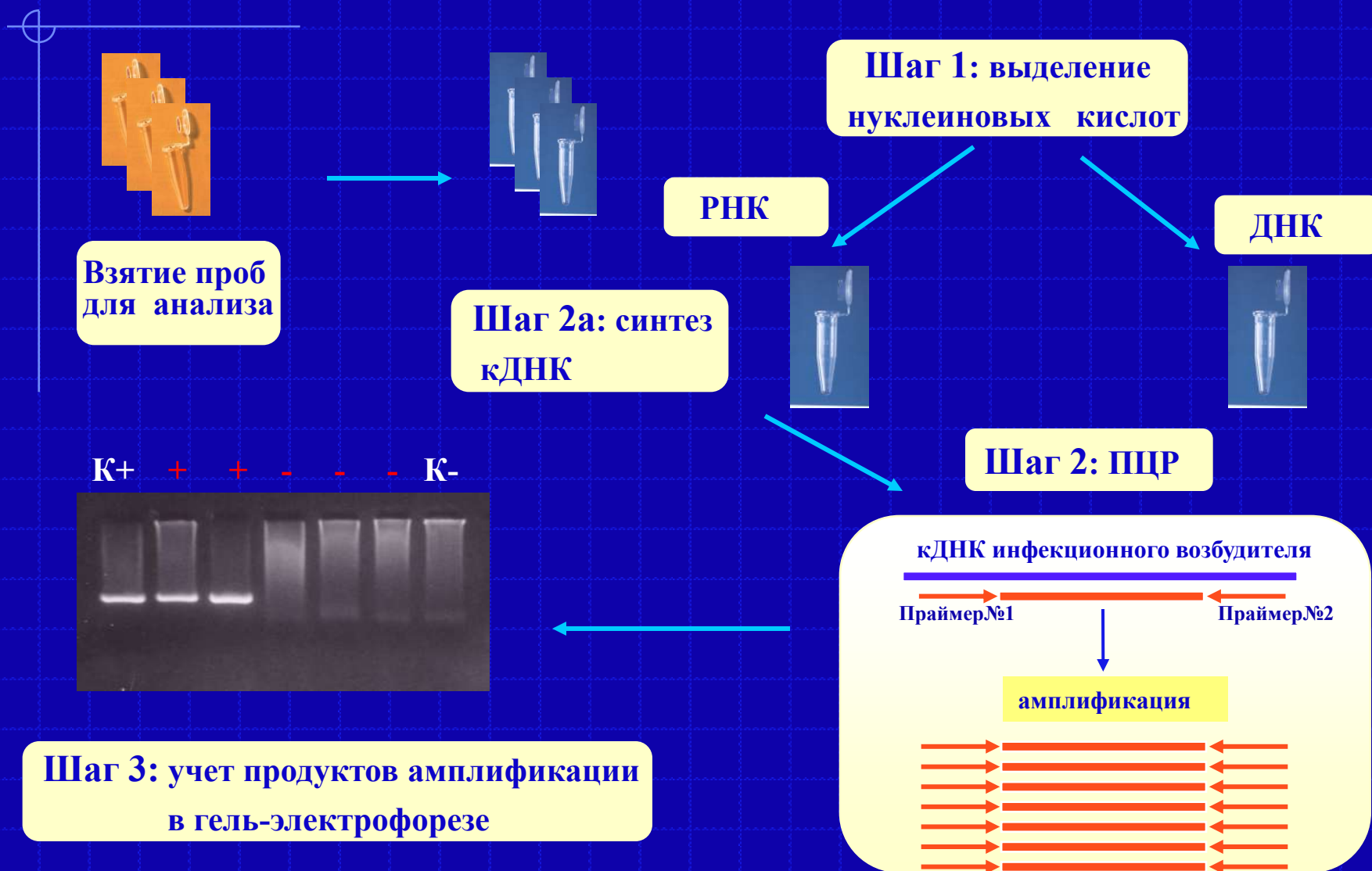
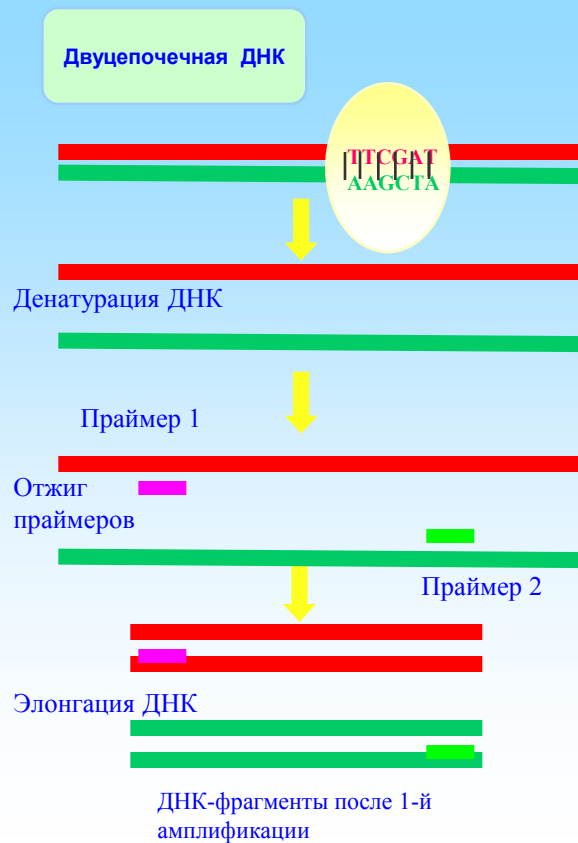
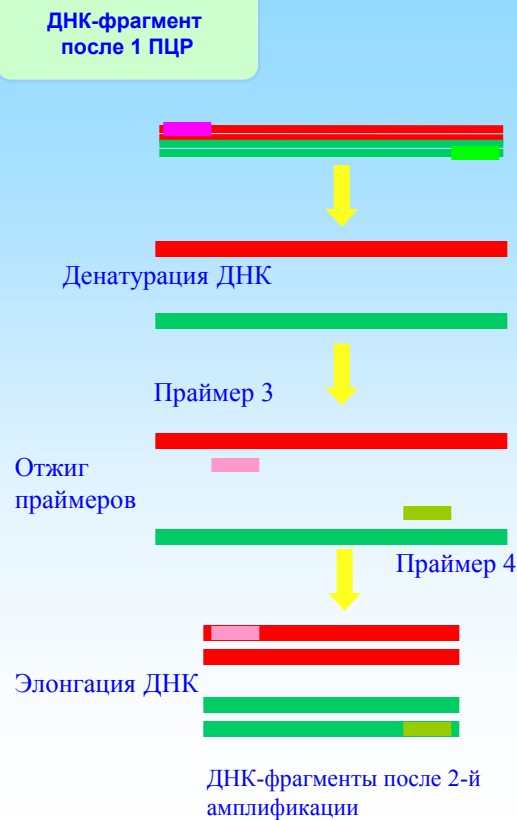


Схема “гнездовой” (“nested”) ПЦР

1 амплификация

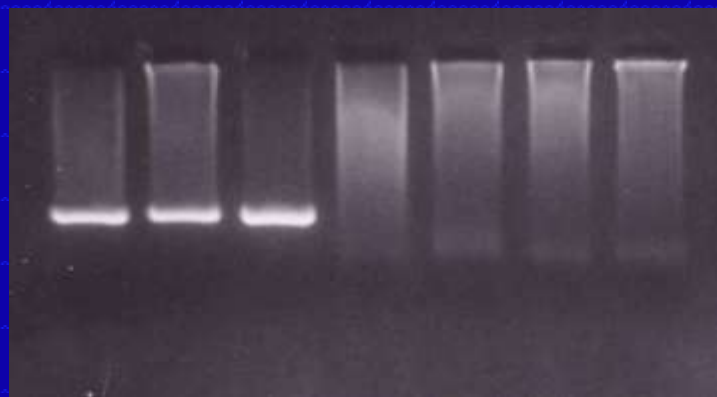


2 амплификация (реамплификация)



Учет результатов амплификации

- Учет результатов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.
- Под действием электрического поля молекулы ДНК движутся от отрицательного (-) полюса к положительному (+).
- После просматривания геля в ультрафиолетовом свете можно говорить о результатах ПЦР (на геле видны светящиеся полосы).
- В положительных пробах положение полосы должно точно совпадать с положением полосы положительного контроля.



Метод множественной ПЦР

Проба от животного



Выделение
нуклеиновых кислот

Праймеры
Для ПЦР-1

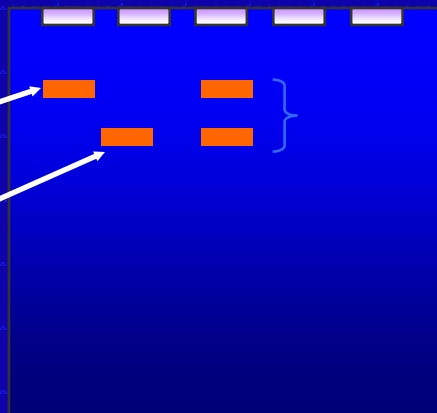
Праймеры
Для ПЦР-2



Реакция ПЦР (ДНК возбудителя)
или ОТ-ПЦР (РНК возбудителя)

Возбудитель 1

Возбудитель 2



Учет продуктов амплификации
в гель-электрофорезе

Преимущества диагностики на основе ПЦР

- Чувствительность (несколько копий патогена в пробу 0,2 мл)
- Специфичность
- Возможность дифференциальной видовой диагностики
- Быстрота
- Возможность определять маскированный возбудитель
- Возможность диагностики возбудителя в различных образцах

Сложности диагностики на основе ПЦР

1. Чувствительность (несколько копий патогена в пробу 0,2 мл)
2. Необходимость использования обученного квалифицированного персонала
3. Необходимость использования 3-х специализированных помещений
4. Необходимость соблюдения строгих правил работы при постановке ПЦР во избежание контаминации (загрязнения) проб

Что необходимо для проведения ПЦР

Амплификатор



Тест-системы ПЦР



Образцы для исследования



Микроцентрифуга
Вортекс



Набор автоматических
пипеток, пластиковые
наконечники, пробирки



Аппарат для
электрофореза



Твердотельный
термостат



Ультрафиолетовый
трансллюминатор



Устройство ПЦР-лаборатории

**Комната
пробоподготовки и
выделения РНК, ДНК**



Чистая зона



**Чистая комната для
смешивания
компонентов ПЦР**



**Комната для проведения
амплификации и
электрофореза,
фотографирования гелей**



Компоненты диагностической системы ПЦР

Набор для выделения
ДНК или РНК

+4°C



Набор для
выявления патогена

-20°C



Набор для
проведения
электрофореза

+4°C



Тест-системы состоят из 3 наборов

Являются универсальными
для отечественных и
импортных амплификаторов

Тест-системы на основе ПЦР, разработанные в НПО НАРВАК.

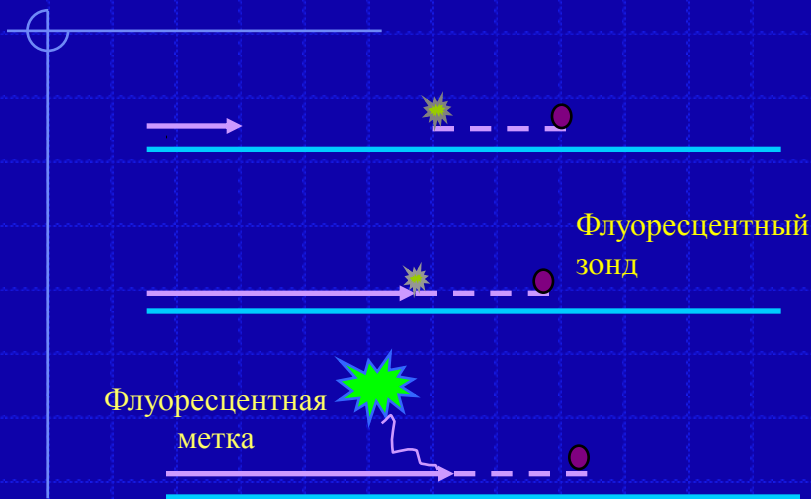
- для обнаружения патогенных лептоспир
- для индикации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis*
- для обнаружения вируса диареи КРС
- для обнаружения вируса герпеса 1-го типа КРС
- для обнаружения вируса классической чумы свиней
- для обнаружения вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС)
- для обнаружения и дифференциации вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) и респираторного коронавируса свиней (РКВС)
- для обнаружения и дифференциации цирковирусов свиней I и II типов
- для обнаружения парвовируса свиней
- для обнаружения вируса чумы плотоядных
- для обнаружения вируса лихорадки долины Рифт
- для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц
- для обнаружения вируса гриппа А
- для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипов H5 и H7
- для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1

Последняя модификация ПЦР:

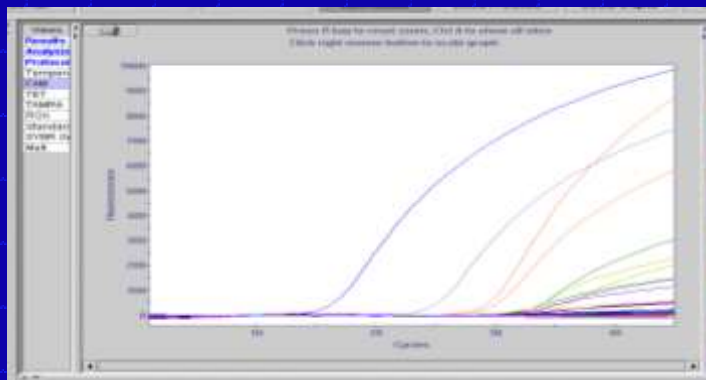
«ПЦР в реальном времени» или Real-Time PCR



«ПЦР в реальном времени» или Real-Time PCR



ABI Prism 7000 (Applied Biosystems)



ABI Prism (Applied Biosystems)
Icycler (Bio-Rad)
Mx 4000 (Stratagene)
Cobas TagMan (Roche)
LightCycler (Boehringer Mannheim)
DNA-Engine (MJ-Research)
Rotor-Gene 2000 (Corbett Res)
Джин (ДНК технология)
Прибор фирмы Синтол и другие

Что необходимо для проведения ПЦР в реальном времени

Микроцентрифуга
Вортекс



Твердотельный
термостат



Тест-системы ПЦР



Набор автоматических
пипеток, пластиковые
наконечники, пробирки



Прибор для ПЦР в
реальном времени



Образцы для
исследования

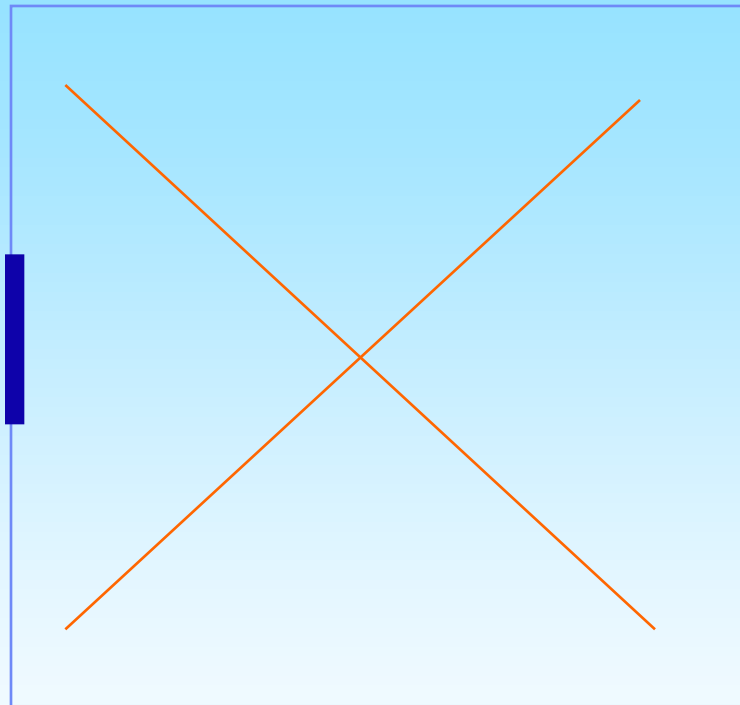




**Комната
пробоподготовки и
выделения РНК, ДНК**



**Комната для смешивания
компонентов, проведения
ПЦР в реальном времени и
анализа результатов**



Преимущества ПЦР в реальном времени:

- Существенное повышение специфичности метода за счет наличия внутреннего специфического зонда;
- Возможность количественного определения инфекционного агента;
- Надежность из-за снижения риска контаминации (информацию о составе пробы и о ходе реакции можно получить, не открывая пробирку)
- Возможность создания систем множественной ПЦР, позволяющих определять несколько возбудителей в одном образце;
- Снижение времени проведения реакции

Сложности диагностики на основе ПЦР в реальном времени

1. Цена прибора для постановки ПЦР в реальном времени довольно высока по сравнению с амплификатором
2. Необходимость использования 2-х специализированных помещений

Компоненты диагностической системы ПЦР в реальном времени

Стандартная тест-система

Набор для выделения
ДНК или РНК

+4°C

Набор для
выявления патогена

-20°C



Тест-системы ПЦР в
реальном времени
состоят из 2 наборов

Тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, разработанные в НПО НАРВАК.

- для индикации и дифференциации *M.bovis* и *M. tuberculosis*
- для обнаружения вируса классической чумы свиней
- для обнаружения вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС)
- для обнаружения и дифференциации цирковировусов свиней II типа
- для обнаружения вируса диареи КРС
- для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5
- для обнаружения вируса лихорадки долины Рифт
- для обнаружения параргиппа-3 КРС
- для обнаружения герпесвируса I типа КРС



Спасибо за внимание

