

Методология полимеразно цепной реакции (ПЦР)

Ассистент кафедры лабораторной
диагностики ИПО БГМУ, к.м.н.

Билалов Фаниль Салимович

Нормативная документация

- **МУ 4.2.2039-05** Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории
- **СП 1.3.2322-08** Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.
- **СП 1.2.1318-03** Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I — IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами.

Нормативная документация

- **МУ 1.3.2569-09** Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности.

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод молекулярной диагностики, применяемый в клинической практике для обнаружения специфической НК возбудителя в исследуемом материале.

Где используют ПЦР?

- -как метод экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, взятого от человека, с целью выявления ДНК (РНК) микроорганизмов I-IV групп патогенности и их количественной оценки;
- -как метод специфической индикации патогенных биологических агентов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;
- -проводимой терапии как ускоренный предварительный тест при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации культур;

Где используют ПЦР?

- -для определения эпидемиологической значимости изолятов на основании выявления генетических маркеров вирулентности и патогенности, антибиотикоустойчивости;
- -для таксономической характеристики штаммов на основании выявления специфических видовых, родовых и других маркеров;
- -для генотипирования штаммов с целью определения их происхождения;
- -для прогнозирования течения инфекционного заболевания и оценки эффективности

ВИДЫ ПЦР

- ПЦР сопряженная с обратной транскрипцией
- Гнездовая ПЦР
- ПЦР *in situ*
- Количественная ПЦР
- Мультипраймерная ПЦР
- Ассиметричная ПЦР
- ПЦР с «горячим стартом»
- Амплификация больших фрагментов ДНК с высокой точностью
- Аллель-специфическая ПЦР
- ПЦР, чувствительная к метилированию матрицы
- Иммуно-ПЦР

Принцип метода

- Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка НК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*).

Методика ПЦР

1. Выделение ДНК
2. Амплификация ДНК
3. Детекция ДНК

- *Преаналитический этап*

сбор, хранение, транспортировка

- *Выделение НК*

экспресс-методы, универсальные методы

- *Сборка амплификационной смеси*

- *Амплификация*

денатурация, отжиг, элонгация

- *Детекция*

электрофорез, конечная точка, real-time

Преаналитический этап в пцр

Цели

- Правильное определение информативного для ПЦР вида биологического материала.
- Сохранение ДНК возбудителя в материале до момента доставки в лабораторию.
- Препятствие попаданию в материал ингибиторов ПЦР-реакции.
- Предварительная очистка материала для облегчения выделения из него ДНК возбудителя.

Материал

- ✓ соскоб эпителиальных клеток
- ✓ моча
- ✓ секрет простаты
- ✓ эякулят
- ✓ цельная венозная кровь
- ✓ мокрота
- ✓ СПИНО-МОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ, ВЫПОТЫ, СЛЮНА И проч.

● **Все, что содержит ДНК!**

**подготовка
пациента**

прием системных
препаратов

местная терапия

состояние пациента

**взятие образца
для исследования**

протоколы взятия для разных
видов биологических сред

**условия транспортировки
и хранения образцов**

транспортные среды

температурный режим

сроки доставки

Ингибиторы пцр

1. Гепарин
2. Соли тяжелых металлов
3. Слизь
4. Кровь (гемоглобин)
5. Некоторые лекарственные формы
6. Мочевая кислота и ее соединения



Правила взятия мазка.

Мужчины

- Перед забором соскоба из уретры необходимо обработать головку полового члена и области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физраствором. Проводят массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим тампоном. Вводят зонд в уретру на глубину 3-4 см. несколькими вращательными движениями производят соскоб и готовят мазок-отпечаток, касаясь всеми поверхностями зонда поверхностей предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе в течение 10 минут. Готовый препарат поместить в индивидуальную упаковку (полиэтиленовый пакет), прикрепить направление степлером и отправить в лабораторию.

Правила взятия мазка. Женщины

- **Цервикальный канал:** удаляют слизь с поверхности шейки матки тампоном, вводят зонд в цервикальный канал на 1-1,5 см и вращают его в течение 3-5 секунд. Извлекают зонд, избегая касания стенок влагалища, и делают мазок-отпечаток.

Правила взятия мазка. Женщины

- **Уретра:** перед забором соскоба из уретры необходимо обработать ее наружное отверстие тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Производят массаж уретры пальцем со стороны влагалища, прижимая ее к лобковой кости. Вводят зонд в уретру на глубину 1-1,5 см и аккуратно, не поранив слизистую, несколькими вращательными движениями производят соскоб и готовят мазок-отпечаток, касаясь всеми поверхностями зонда поверхности предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе 10 минут.

Правила взятия мазка. Женщины

- **Задний свод влагалища.** В случае избытка слизи и обильных выделений удаляют их стерильным ватным тампоном. Проводят зондом по поверхности слизистой в области заднего свода влагалища и экзоцервикса и готовят мазок-отпечаток, касаясь всеми поверхностями зонда поверхности предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе 10 минут.

Секрет предстательной железы для микроскопического исследования.

- После окончания массажа предстательной железы секрет в количестве 0,5-1,0 мл собирают в одноразовую стерильную пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. При невозможности получить секрет - сразу после массажа собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве не менее 10 мл в специальный стерильный сухой флакон.

- Приготовленные клинические образцы необходимо доставить в КДЛ для исследований и в течение 2 часов выделить ДНК
- Если это невозможно сделать, то необходимо образцы заморозить при -20 °C и использовать их в течение не более 2 недель

- Оборудование для выделения ДНК
- Термостат «Гном» представляет собой программируемый твердотельный термостат для научных и клинико-диагностических исследований. Рассчитан на использование пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 и 0,5 мл.



- **Микроцентрифуги MiniSpin, MiniSpin plus**



Мини-центрифуга - вортекс FV-2400 Микро



Выделение днк

- Экспресс-методы (термический)



Сорбентный метод

Классический сорбентный метод

Преимущества: - чистота выделенной НК
- универсальность
использования

Недостатки: - длительность
- трудоемкость



Сборка амплификационной смеси

- В зависимости от комплектация коммерческой тест-системы различают:
- - **ГОТОВЫЕ** («раскапанные» смеси) – остается добавить только выделенное ДНК/РНК
- - **НЕГОТОВЫЕ** («нераскапанные» смеси) – необходимо добавлять различные компоненты смеси (праймеры, полимеразу, буферную смесь и т.д.) и в конце ДНК/РНК

Амплификатор

- Четырехканальный ДНК-амплификатор «Терцик» предназначен для проведения полимеразной цепной реакции в амплификационных пробирках 0,5 мл. Прибор выполнен в виде единого модуля, объединяющего 4 независимо управляемых термоблока.



Амплификация



- Высокая производительность благодаря 96-луночному формату приспособленному к стандартным планшетам, пробиркам и стрипам; Мультиплексная детекция с использованием 4-5 каналов флуоресценции и различных комбинаций флуорофоров;

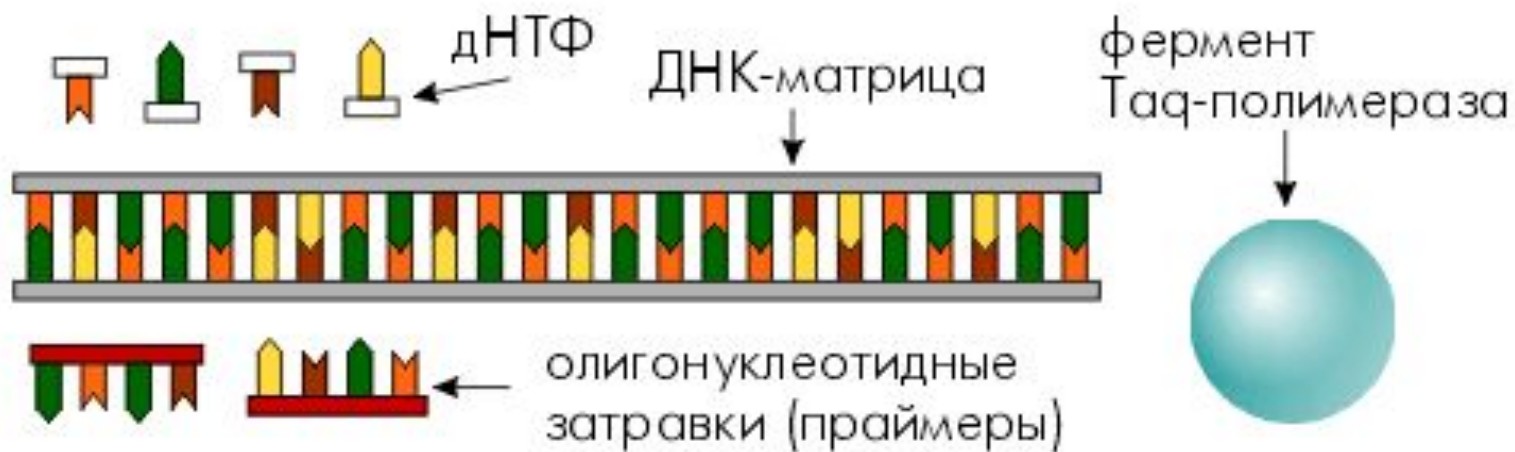
- Долговечность источников света, представляющих собой светодиоды (LED), отличающихся высокой продолжительностью (до 100 000 ч) и стабильностью работы в отличие от галогеновых ламп;

- Высокая чувствительность, соотношение сигнал/шум и низкий уровень помех между каналами обеспечиваются с помощью оригинального оптического тракта, включающего в себя отдельный источник света на каждый канал и ПЗС-матрицу (CCD камеру);

- Широкий динамический диапазон детекции достигается применением метода множественной экспозиции, позволяющего на качественно новом уровне оптимизировать условия регистрации сигнала, упростить (или отменить вообще) фотометрические настройки;

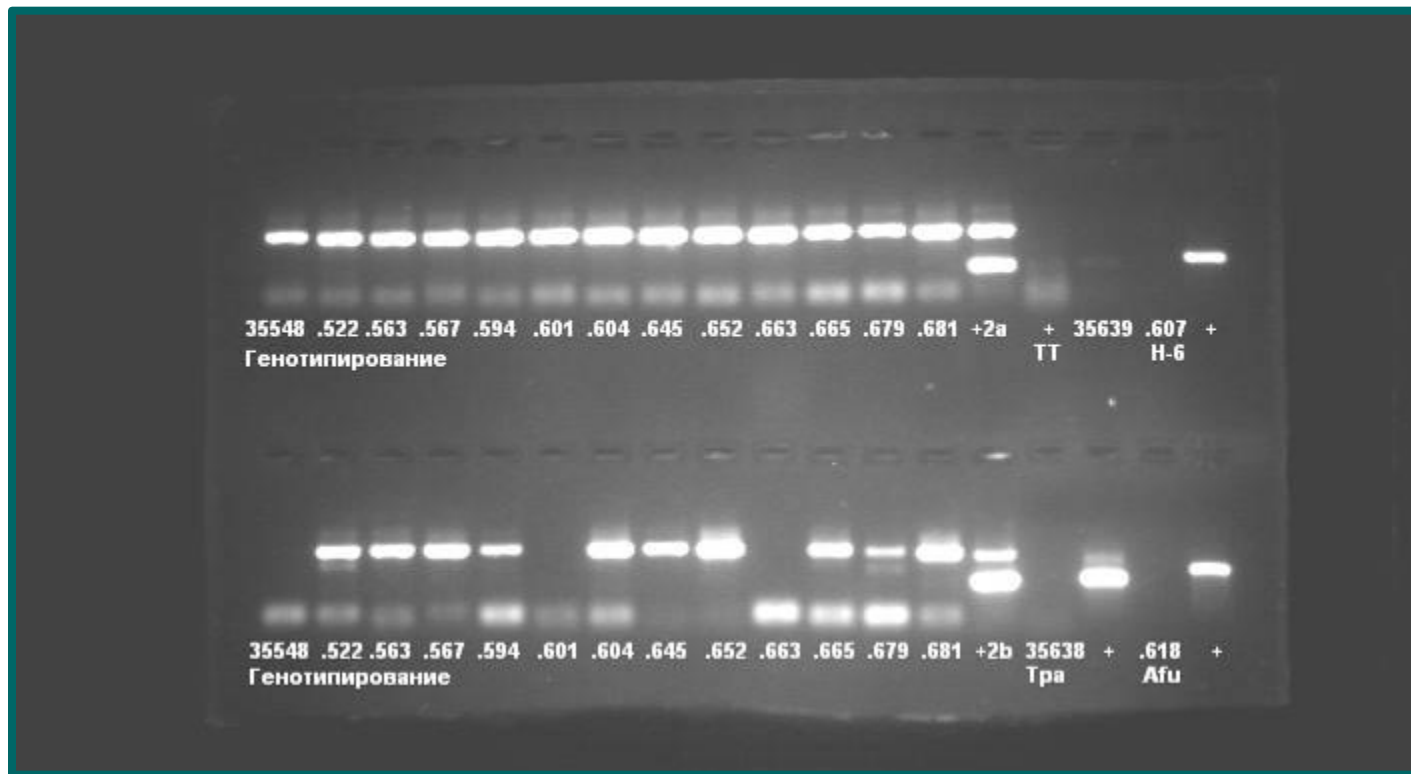
- Работа с различным типом флуорофоров, благодаря комплектации оптическими системами с различными спектральными характеристиками;



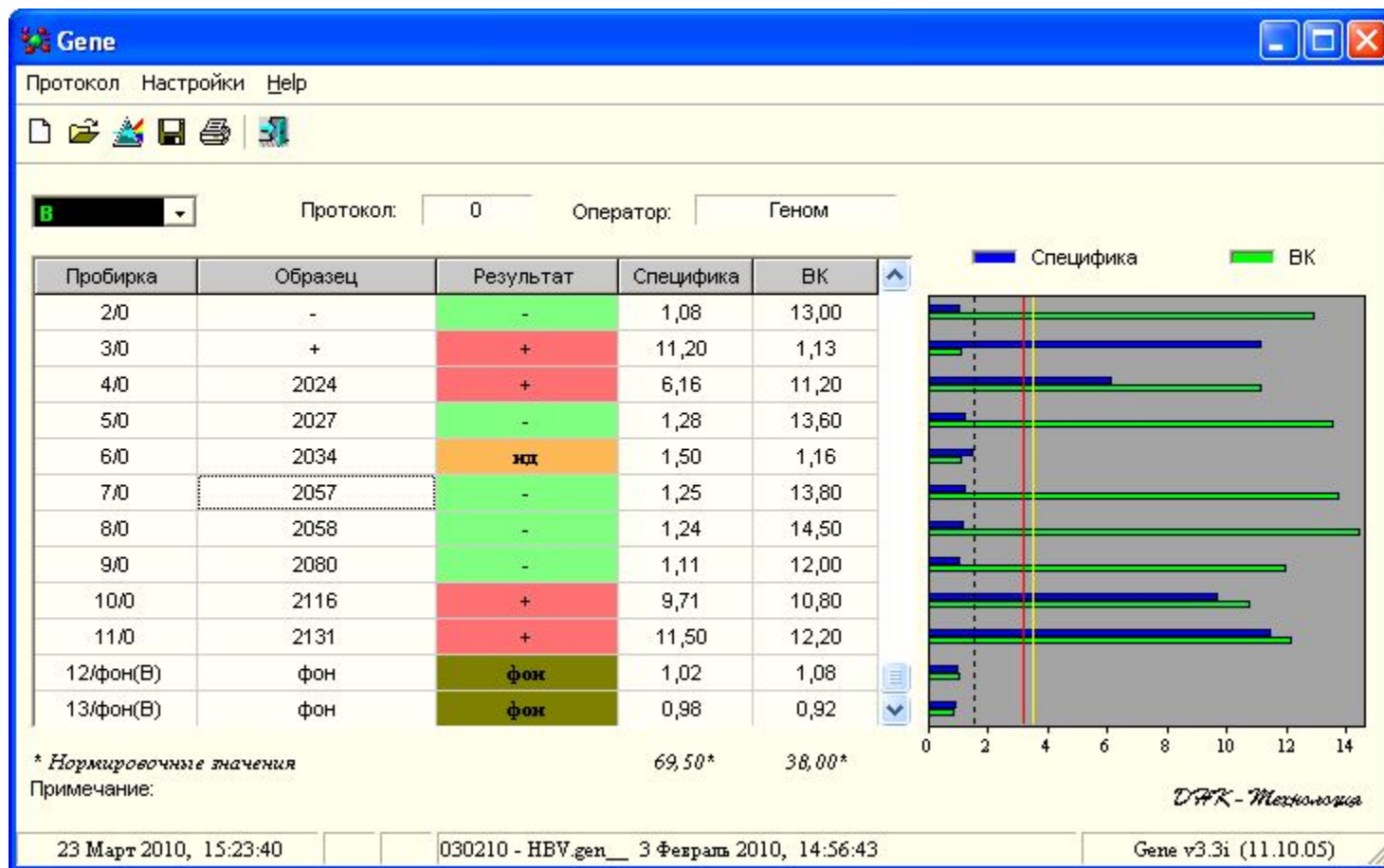


Исходные компоненты ПЦР

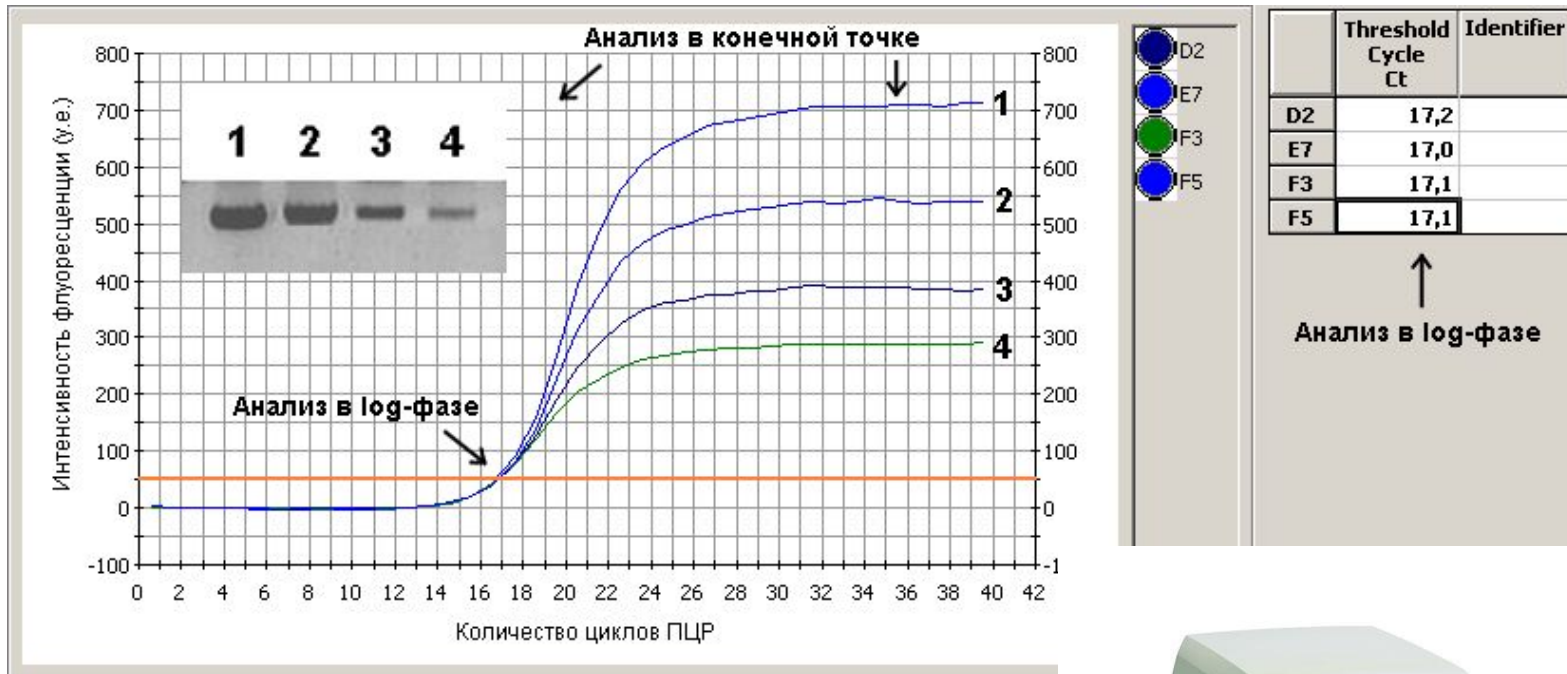
Детекция методом электрофореза



Детекция по конечной точке



Результаты ПЦР на образцах с одинаковым количеством ДНК



Интерпретация результатов

Отрицательный ответ

1. НК возбудителя не обнаружено
2. Концентрация НК ниже 1000 ДНК-копий/мл
3. Неправильно выбран материал для исследования

Положительный ответ

- Присутствие НК возбудителя
- Присутствие фрагментов НК возбудителя

Преимущества ПЦР-метода

- *Прямое определение наличия возбудителей.*
- *Высокая специфичность.*
- *Высокая чувствительность.*
- *Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.*
- *Высокая скорость получения результата анализа*

Что делать с отходами ПЦР?

- Дезинфицирующие растворы после обработки ими исследуемого материала и истечения времени их экспозиции сливают в канализацию, открытую емкость с обработанным материалом помещают в плотный термостойкий пакет (контейнер) для последующего автоклавирования под давлением 2,0 кгс/кв. см (0,2 МПа) при температуре 132 +/- 2 град. С в течение 60 мин.
- После автоклавирования пакет с инактивированным материалом выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов или на сжигание в специальных печах

- Обеззараживание пробирок с ампликонами, расходного материала, перчаток в рабочей зоне 3 (помещении).
- Использованные пробирки с ампликонами (исключая пробирки с ампликонами, передаваемые для анализа в рабочие зоны 4-1 и 4-2), наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в боксе биологической защиты или ПЦР-боксе собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 с целью последующей инактивации.
- При ее отсутствии отходы переносят в специально предназначенное вспомогательное помещение, где проводят их инактивацию.

- Рабочую одежду сотрудников лаборатории маркируют индивидуально и в соответствии с зональным распределением, ее смену проводят не реже одного раза в неделю. В зоне детекции результатов желательно использовать одноразовую рабочую одежду.
- Стирку рабочей одежды сотрудников проводят в прачечной организации. Не допускается одновременно производить стирку рабочей одежды разных рабочих зон. Обработку рабочей одежды из зоны учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот проводят отдельно от одежды из других зон.



Спасибо за внимание!