



ПЦР-диагностика геморрагических лихорадок

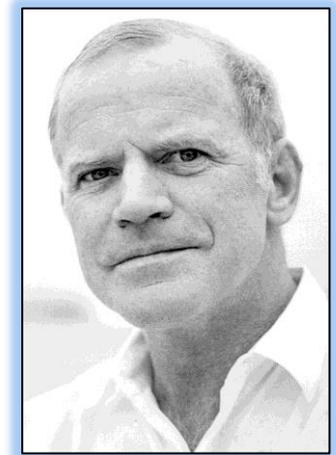
Научный сотрудник
отдела молекулярной вирусологии Флавивирусов и вирусных
гепатитов,
лаборатории молекулярной эпидемиологии особо опасных
инфекций

к.м.н. Демина Анна Владимировна

2013 г.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод [молекулярной биологии](#), позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты ([ДНК](#)) в биологическом материале (пробе).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрёл в 1983 году Кэри Мюллис (американский учёный). Впоследствии он получил за это изобретение Нобелевскую премию. В настоящее время ПЦР-диагностика является, одним из самых точных и чувствительных методов диагностики инфекционных заболеваний.



Лабораторная диагностика

Для вирусологических исследований при геморрагических лихорадках исследуют различные материалы:

- кровь, сыворотку крови,
- спинномозговую жидкость,
- мочу,
- носоглоточные смывы,
- содержимое везикул,
- фекалии,
- смывы с конъюнктивы,
- секционные материалы.



ПЦР. Компоненты ПЦР смеси

- 1. **Прямой праймер (F – forward)**
- 2. **Обратный праймер (R – reverse)**
- 3. **4 дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дНТФ: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, (д)ТТФ) (dNTP: dATP, dGTP, dCTP, (d)TTP)**
- 4. **ПЦР-буфер** (напр. SE-буфер Hot Start Taq ДНК полимеразы: 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.01% Tween-20. Отдельно поставляется 50mM MgCl_2)
- 5. **Термофильная полимеразы**
 - (Taq-полимераза, источник – термофильная бактерия *Thermus aquaticus* или рекомбинантная из бактерии *Escherichia coli*, напр. TaqF-полимераза)
- 6. **Матрица (дцДНК – двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота)**
- 7. **Вода (ПЦР)**

Реакция обратной транскрипции (ОТ)

- 1) Праймеры – гекса- или нонануклеотиды, или видо-, или родоспецифичные нуклеотидные последовательности
- 2) **4 дНТФ**
- 3) буфер (напр. SE-буфер M-MuLV Обратная транскриптаза: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3 при 25°C); 3 mM MgCl₂; 75 mM KCl; 10 mM DTT)
- 4) фермент – **обратная транскриптаза (ревертаза)**
AMV-ревертаза (источник – вирус миелобластоза птиц, avian myeloblastosis virus),
MoMLV-ревертаза (источник – вирус лейкемии мышей Молони, Moloney murine leukemia virus)
- 5) матрица – **РНК** (рибонуклеиновая кислота)

Температура проведения – **37** или **42 °C**

Продукт – **комплементарная ДНК (кДНК, или cDNA)**

ОТ-ПЦР (RT PCR)

- Это две самостоятельные (отдельные) ферментативные реакции:

1. Реакция обратной транскрипции (ОТ, RT)

2. ПЦР Условия термоциклирования

Параметры амплификации сильно варьируются в зависимости от матрицы, праймеров и типа используемого амплификатора.

Протокол для Hot Start Taq ДНК-полимеразы:

Выдержать 3 мин при 94 °С.

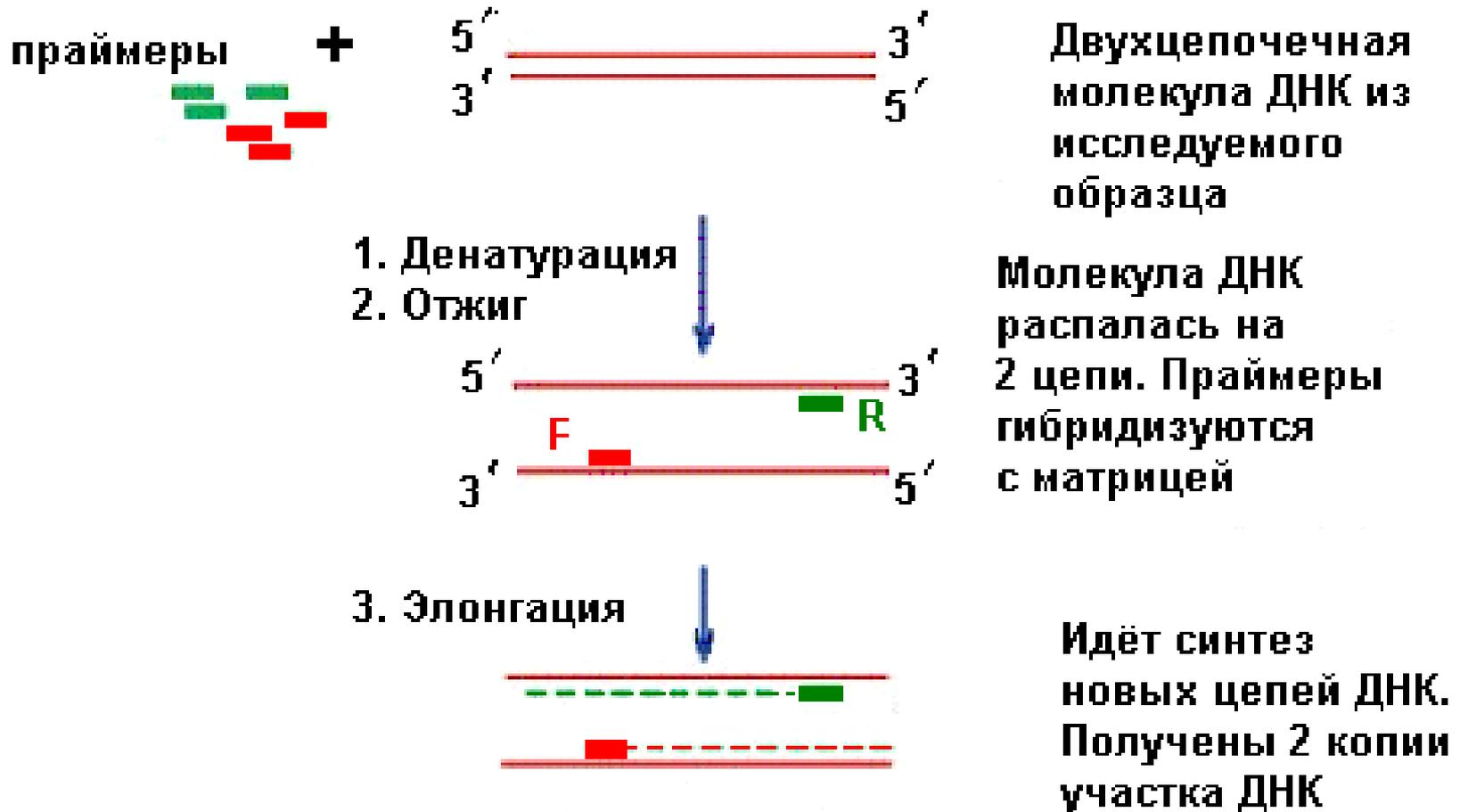
Провести 30 циклов: 95 °С - 15 сек,

64 °С - 30 сек,

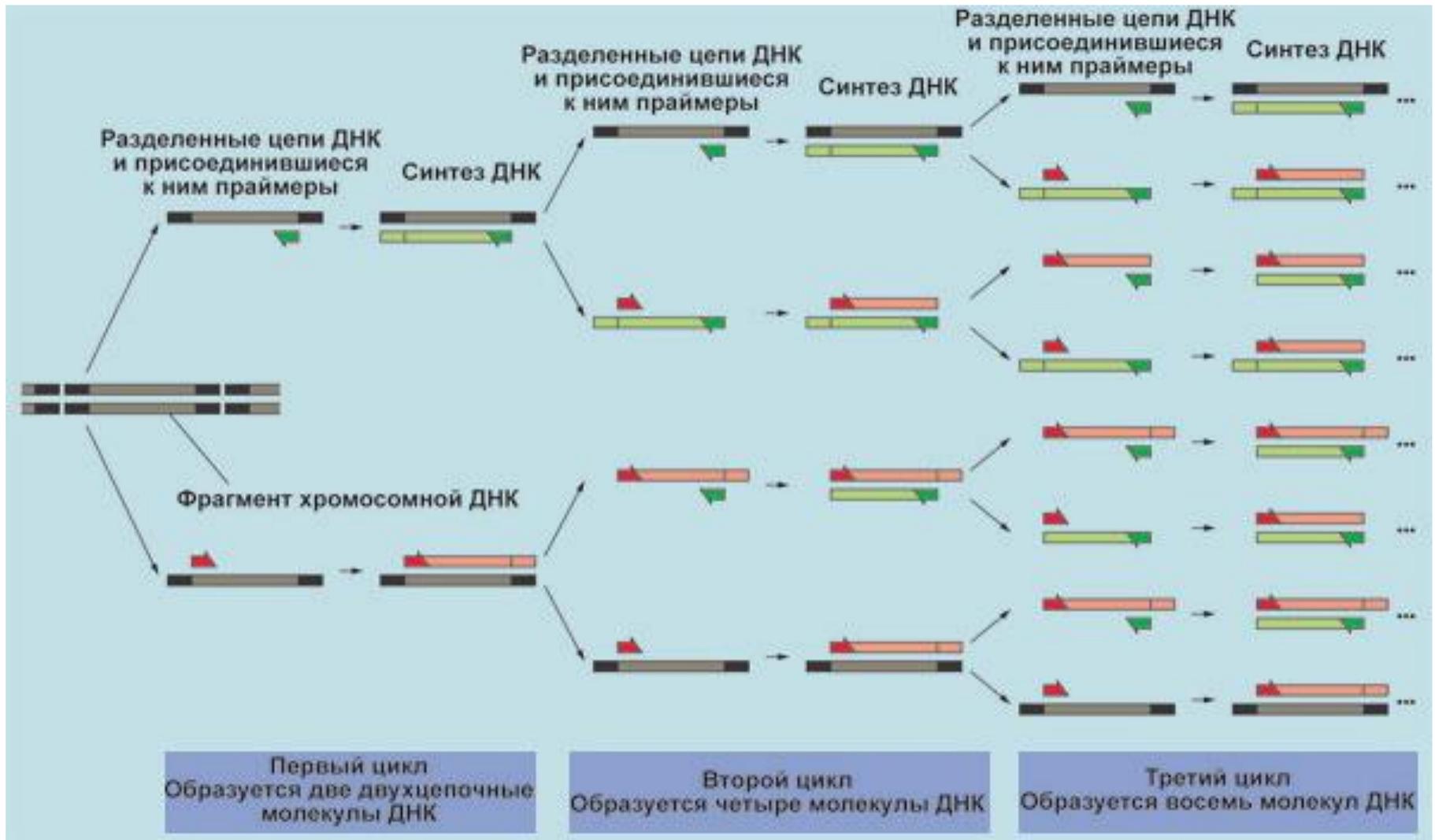
72 °С- 2 мин.

Завершение 72 °С- 5 мин.

ПЦР (3 стадии цикла)



ПЦР (первые 3 цикла)



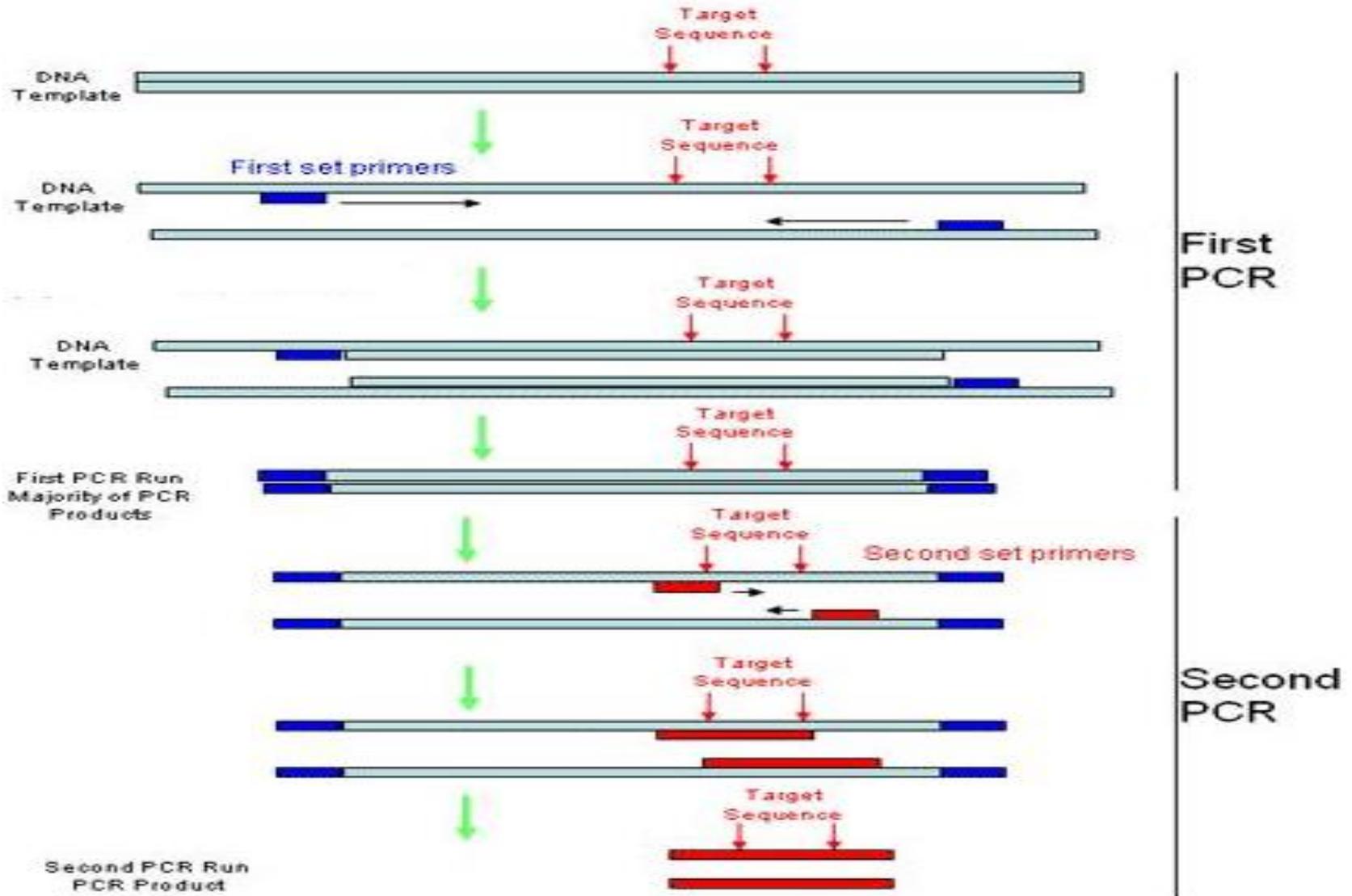
Амплификат

- содержит ПЦР-продукты, иначе называемые – **ампликоны** (один или несколько):
 - а) специфические (ожидаемые) ампликоны**
 - б) неспецифические ампликоны** (пример – протекание RAPD PCR, когда достаточно **одного** праймера)
 - в) другие ДНК-цепи, образовавшиеся в ходе синтеза (элонгации) второй цепи по причине образования несовершенных дуплексов**
 - г) димеры**

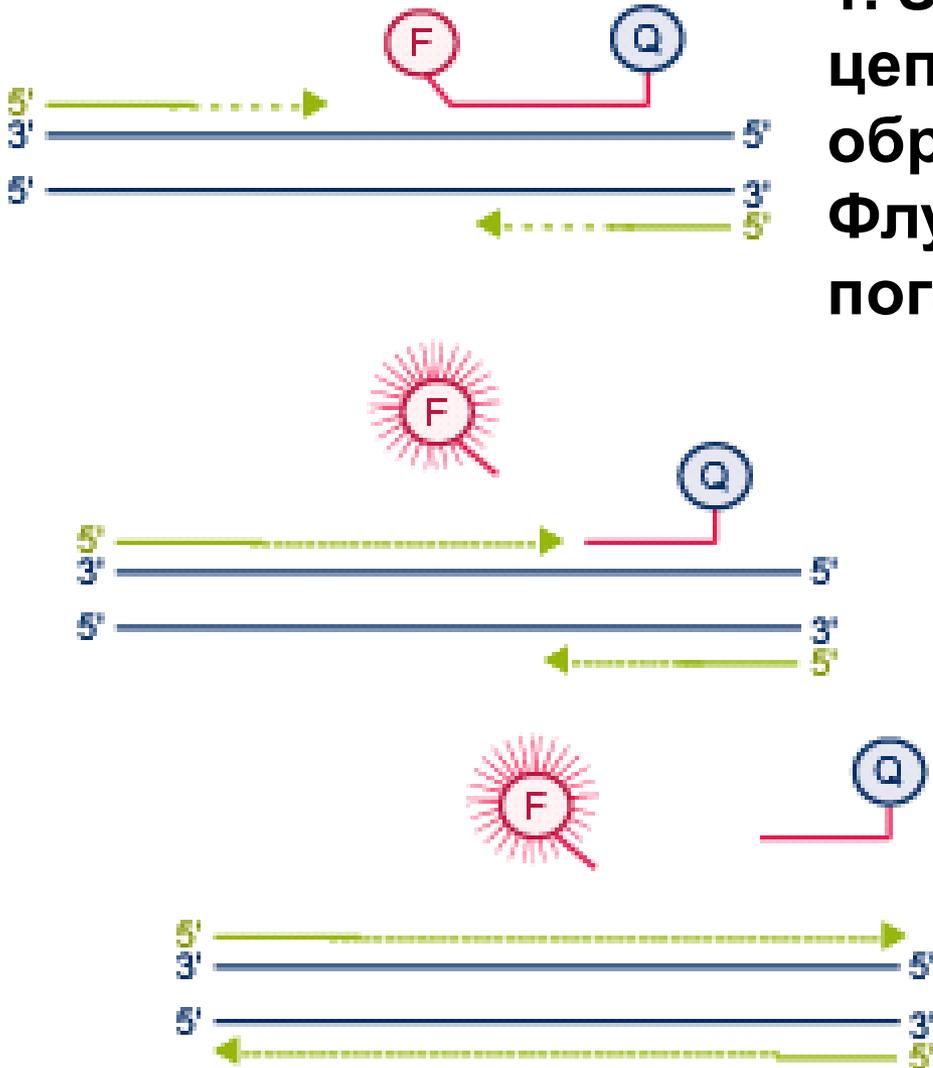
Основные варианты ПЦР, сводящие к минимуму образование неспецифических продуктов

- 1. ПЦР с горячим стартом (Hot start PCR)
(постановка пробирок на горячую матрицу, использование восковой перегородки или полимеразы, активирующейся при высокой температуре (напр. Taq-полимераза, связанная с МКА 8С1 или 12G1), Hot Start Compound)
- 2. Вложенная (гнездовая) ПЦР (nested PCR)
внешняя пара праймеров
внутренняя пара праймеров
- 3. ПЦР с флуоресцентными зондами

Вложенная («гнездовая») ПЦР (принцип)



ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

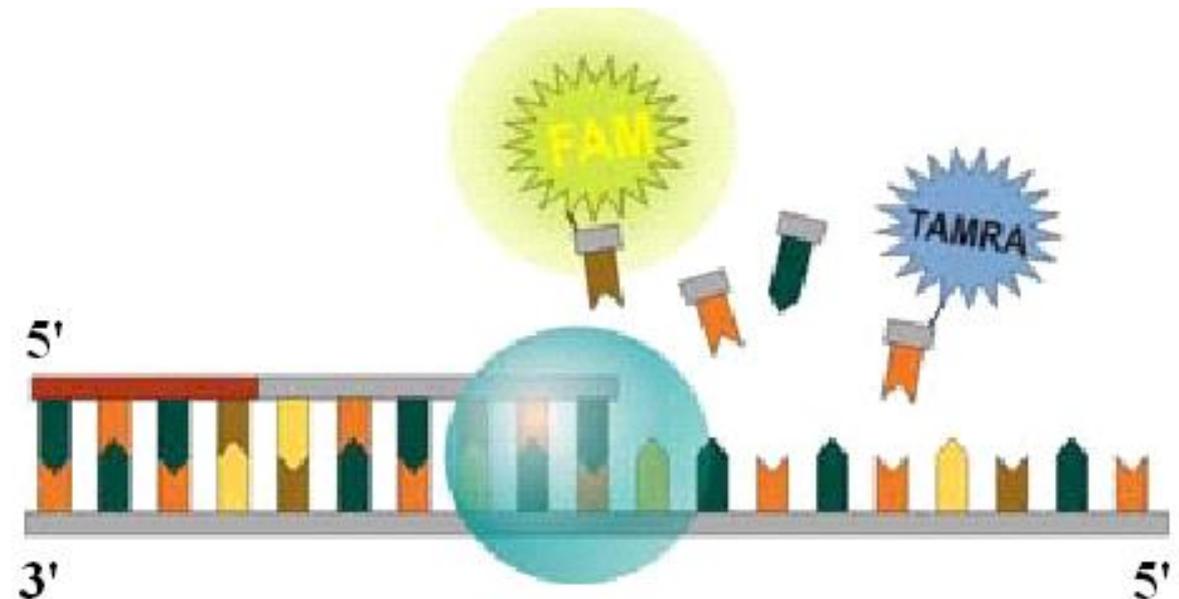
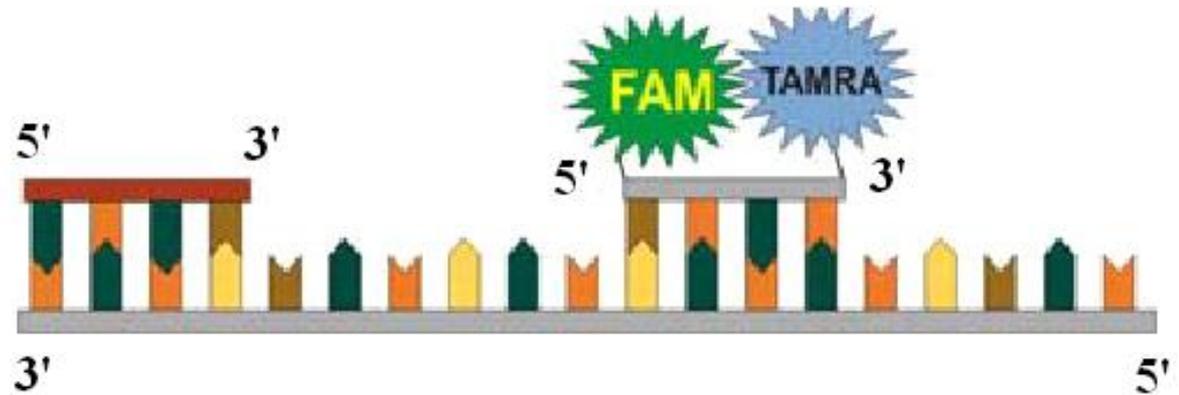


1. Зонд отжигается на одной из цепей ДНК между прямым и обратным праймерами. Флуоресценция флуорофора погашена.

2. Taq-ДНК-полимераза расщепляет зонд. Отщеплённый флуорофор испускает свет с характерной для него длиной волны.

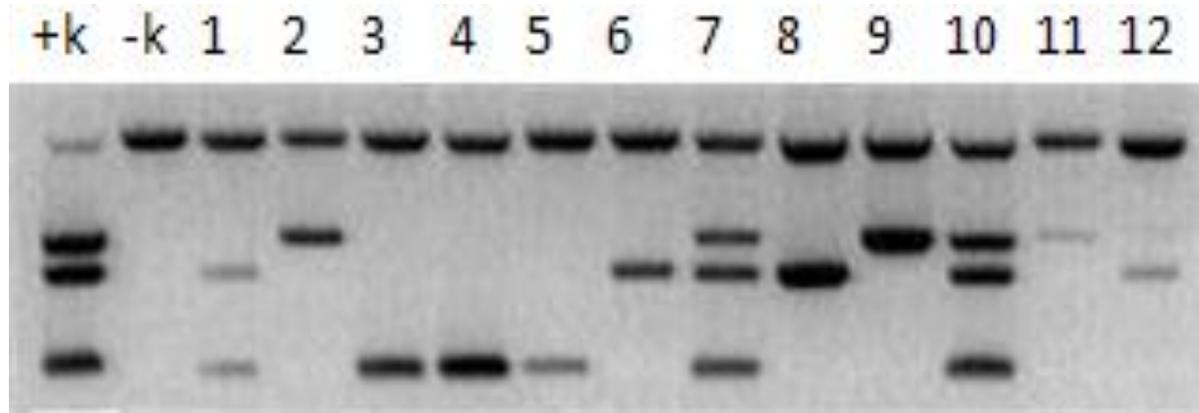
3. Удвоение ампликона вызывает разгорание одного флуорофора.

ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR)



Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР (пример 1)

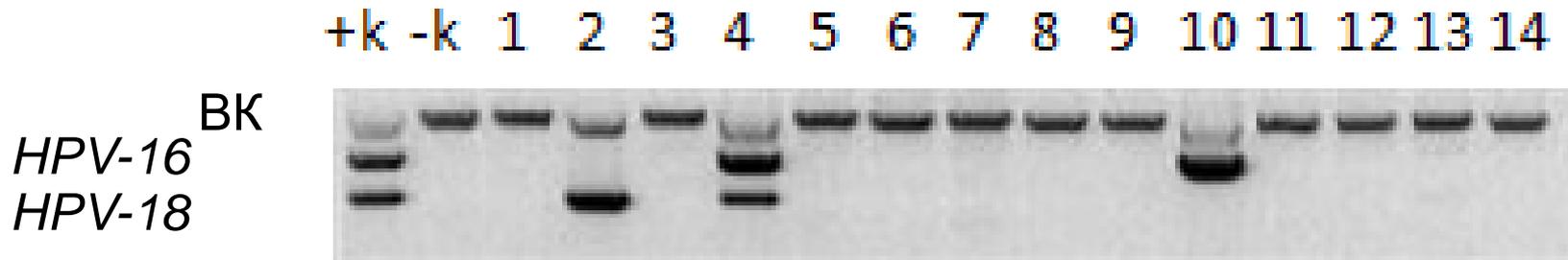
- *Mycoplasma hominis*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Ureaplasma parvum*
- *Chlamydia trachomatis*



Мультипраймерный ПЦР-набор «Мультиген-3»
(ООО НПФ «Генлаб», Москва; www.rugenlab.ru)

Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР (пример 2)

- *Human papillomavirus-16*
- *Human papillomavirus-18*



Мультипраймерный ПЦР-набор «Мультивир-2»
(ООО НПФ «Генлаб», Москва; www.rugenlab.ru)

Способы детекции продуктов ПЦР

- Электрофоретическое разделение в агарозном геле с УФ-детекцией при окрашивании бромистым этидием
- ГИФА (гибридизационно - ферментный анализ)
- Флуоресцентная метка (детекция «по конечной точке» или «в режиме реального времени»)

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле



- ТАЕ-буфер, 1,2–2,5 % агароза + бромистый этидий
- <http://www.helicon.ru>

Вертикальный электрофорез в ПАА-геле (полиакриламидный гель)



VE-10 €420.00



VE-20 €450.00

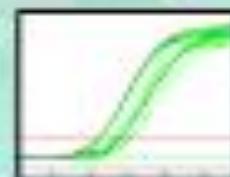
- TBE-буфер <http://www.helicon.ru>

Варианты гибридизационно-флуоресцентной детекции

Детекция конечной
флуоресценции –
Fluorescence of End Point
(*FEP*)



Детекция флуоресценции
в ходе реакции –
Fluorescence In Real-Time
(*FRT*)



Детекция флуоресценции в режиме «реального времени»



Преимущества

- Объективность исследования
- Возможность количественного анализа
- Высокая скорость исследования
- Минимальный риск контаминации
- Высокая эффективность анализа
- Автоматический учет результатов
- Менее жесткие требования к организации ПЦР лаборатории

Цветовая гамма флуорофоров

Сокращенное обозначение		Полное название
<u>Acridine</u>		2-(N-акридинил-4-аминобутил)-1,3-пропандиол
<u>Pyrene</u>		1-пирен-бутановая кислота
<u>Dansyl</u>		6-(5-диметиламинонафталин-1-сульфонил)аминопропанол
<u>FAM</u>		5(6)-карбоксифлуоресцеин
<u>R110</u>		5(6)-карбоксиродамин 110
<u>JOE</u>		6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин
<u>R6G</u>		5(6)-карбоксиродамин R6G
<u>TAMRA</u>		5(6)-карбокситетраметилродамин
<u>ROX</u>		5(6)-карбокси-X-родамин
<u>Dabsyl</u>		4-((4-(диметиламино)-фенил)азо)-бензолсульфоновая кислота

<http://www.syntol.ru/productm.htm>

Ошибки при проведении ПЦР-диагностики

Можно разделить на 3 типа:

- ошибки на этапе взятия биологического материала и пробоподготовки (преаналитический этап);
- ошибки на этапе проведения (ОТ)-ПЦР (аналитический этап);
- ошибки постаналитического этапа.

Ошибки преаналитического этапа

- 1. Неправильный выбор места взятия диагностического материала
- 2. Неправильное взятие материала
- 3. Неправильная обработка взятого материала (крови, мочи и др.)
- 4. Несоблюдение правил хранения материала (сроки и способ доставки)

Ошибки аналитического этапа (ПЦР-диагностики)

1. Невнимательное чтение инструкции

- а) неправильный выбор системы пробоподготовки
- б) неправильно приготовленные фоновые пробирки для тест-систем с флуоресцентной детекцией по конечной точке

2. Контаминация

- а) неправильная организация лаборатории (мест в лаборатории)
- б) неаккуратное обращение с положительными образцами (ЭФ-детекция в геле агарозы или ПАА-геле)
- в) неконтролируемое повторное использование наконечников с целью их экономии
- г) кросс-контаминация (использование наконечников без аэрозольного барьера)

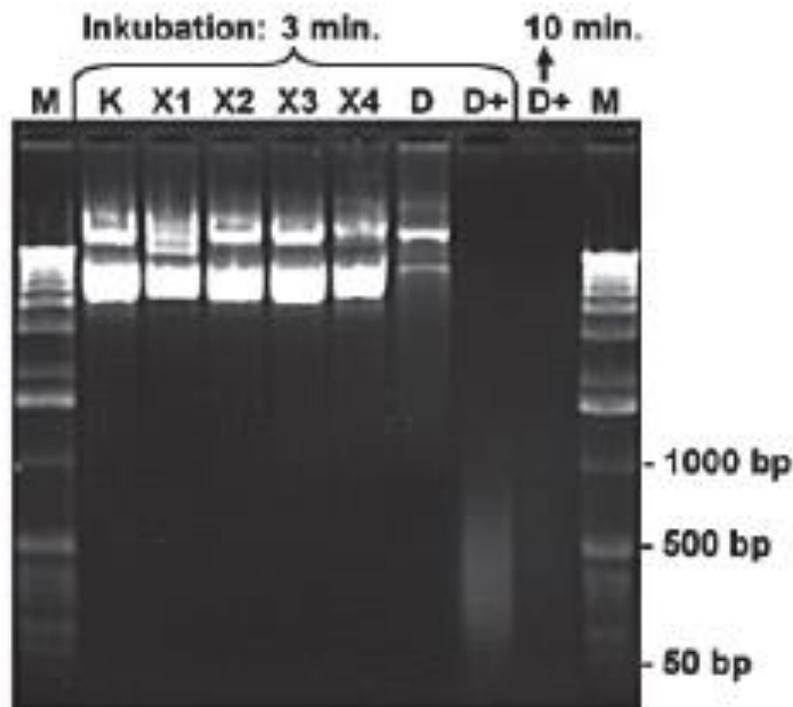
Ошибки постаналитического этапа ПЦР-диагностики

- **Врачебные ошибки**, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов



Средства деконтаминации от ДНК/РНК

- Средство для деконтаминации от ДНК, РНК оборудования, расходных материалов **DNA-ExitusPlus**
- Средство для деконтаминации от РНК **RNase-ExitusPlus** (AppliChem, Германия www.dia-m.ru)



200 нг плазмидной ДНК выдерживали в 10 мкл воды с добавлением 5 мкл соответствующих средств 3 и 10 мин при комн. температуре. На электрофореграмме выявлено, что в образцах X1-X4 разрушения тестируемой ДНК не произошло. При использовании средства DNA-ExitusPlus (D+) наблюдается полное разрушение ДНК через 3 минуты, а через 10 минут – и небольших фрагментов.

Особо опасные инфекции

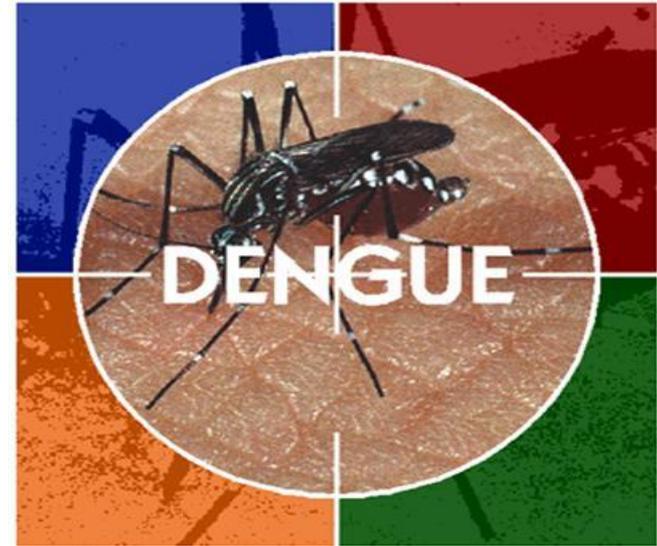
- Чума (*Yersinia pestis*)
- Туляремия (*Francisella tularensis*)
- Миелозидоз
- Геморрагические лихорадки (вирусы)
- Вирус натуральной оспы
- Вирус герпеса В обезьян
- Желтая лихорадка (вирус жёлтой лихорадки)
- Холера (*Vibrio cholerae*, серовары – O1 и O139)
- Генерализованная форма сибирской язвы (*Bacillus anthracis*)

Обнаружение возбудителей ООИ (с помощью ПЦР-РВ)

- Набор реагентов “ООМ-скрининг-*Bacillus anthracis*” – возбудитель сибирской язвы
- Набор реагентов “ООМ-скрининг-*Yersinia pestis*” – возбудитель чумы
- Набор реагентов “ООМ-скрининг-*Orthoroxvirus*” – вирус оспы

• <http://www.syntol.ru/>

Лихорадка денге (костоломная лихорадка, суставная лихорадка, лихорадка денди) – это вирусное трансмиссивное заболевание, передающееся комарами и характеризующееся лихорадкой, миалгией и артралгией, сыпью, лейкопенией и лимфаденопатией.



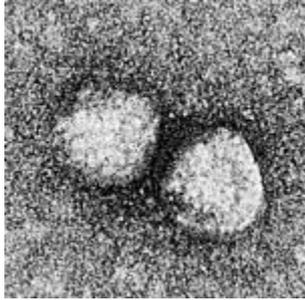
Геморрагическая лихорадка денге (Филиппинская, Тайская или Сингапурская геморрагическая лихорадка, инфекционная тромбоцитопеническая пурпура) – это осложнение лихорадки денге, характеризующееся нарушениями в системе гемостаза, увеличением проницаемости капилляров и развитием **шокового синдрома денге.**

Introduction of the term “dengue”

➤ На языке суахили **“ki-dinga pero”** – раскачиваться, шататься или ковылять. Использовался для обозначения заболевания в Восточной Африке во время вспышки в 1823 году.

➤ Слово **“dengue”** (от испанского) – шататься, колебаться.

➤ Термин **“dandy fever”** (лихорадка денди) – впервые был использован в английских колониях.



Family

00.026. [Flaviviridae](#)

Genus

00.026.0.01. [Flavivirus](#)

Genus

00.026.0.02. [Pestivirus](#)

Genus

00.026.0.03. [Hepacivirus](#)

Genus

00.026.0.00. [unassigned viruses](#)

Mosquito-borne viruses

Dengue virus group

Dengue virus

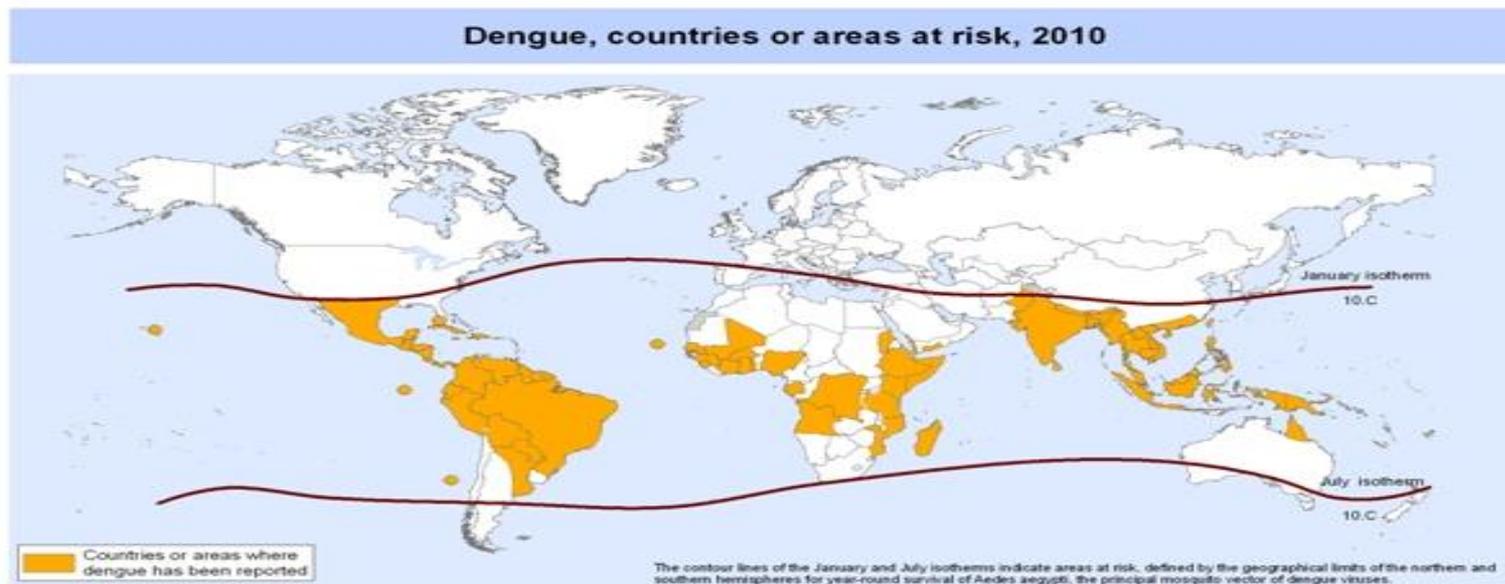
Dengue virus 1 (DENV-1)

Dengue virus 2 (DENV-2)

Dengue virus 3 (DENV-3)

Dengue virus 4 (DENV-4)

В настоящее время около **2,5 миллиарда человек** – каждые **два из пяти** жителей мира – живут в эндемичных по этому заболеванию районах. Ежегодно в мире регистрируется около **50 миллионов случаев** заболевания Денге. Без надлежащего лечения показатели летальности в случаях заболевания ГЛД могут **превышать 20%**.

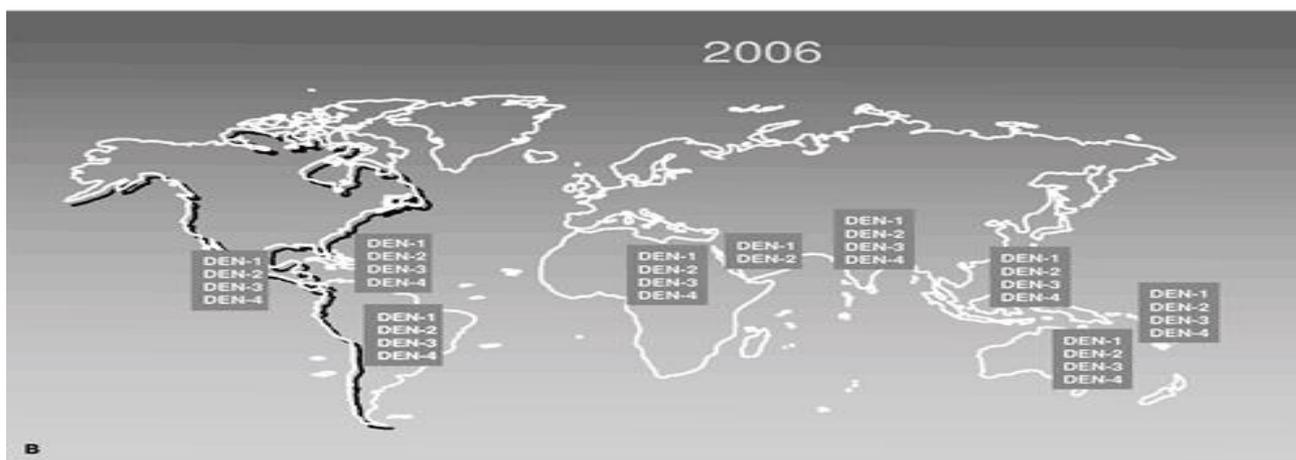


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Public Health Information and Geographic Information Systems (GIS)
World Health Organization

 World Health Organization
© WHO 2010. All rights reserved.

Заболевание лихорадкой денге возникает при заражении одним из 4-х субтипов вируса денге. Перенесенное заболевание, вызванное одним из 4-х субтипов вируса денге, не защищает от повторного заражения другим субтипом.



Переносчик заболевания



Ae. albopictus



Ae. aegypti

Ae. polynesiensis

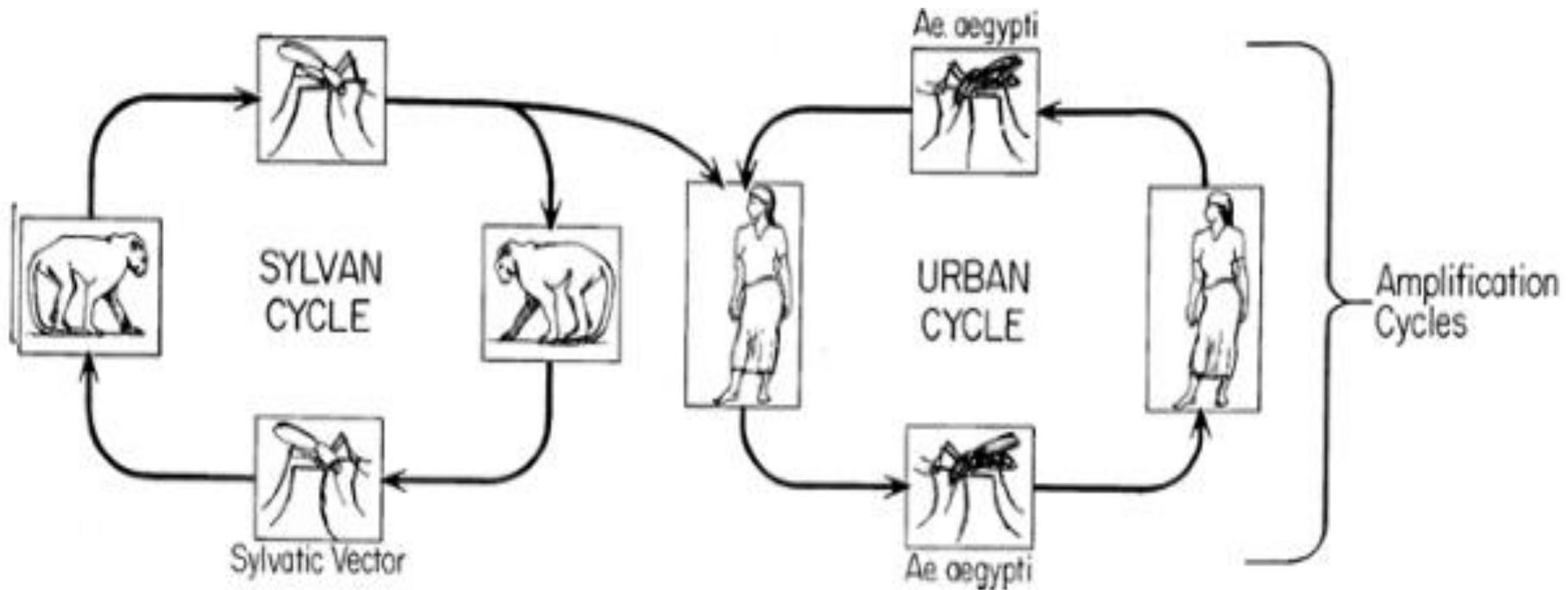


Ae. scutellaris



© 1999 Richard C. Russell

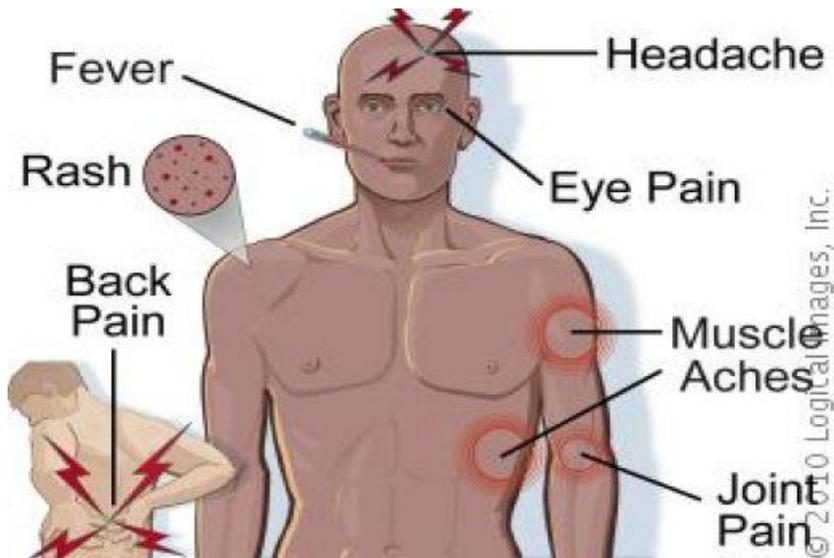
Циклы передачи инфекции



Ae. leutocephalus и *Ae. furcifer*

Ae. aegypti, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* и *Ae. scutellaris*

Клиническая картина



❖ *фебрильная температура*

❖ *головная боль*

❖ *миалгия*

❖ *артралгия*

❖ *сыпь*

✓ *общее недомогание*

✓ *отсутствие аппетита*

✓ *тошнота и рвота*

➤ *боль в горле*

➤ *покраснение конъюнктивы*

Дифференциальная диагностика проводится с:

- желтой лихорадкой
 - японским и клещевым энцефалитом
 - лихорадкой Западного Нила
 - малярией
-
- ❖ гриппом и гриппоподобными заболеваниями
 - ❖ лихорадкой Марбург, Эбола, Ласса, Хунин, Мачупо

Лабораторная диагностика

Лабораторное подтверждение диагноза основывается на наличии хотя бы одного положительного результата на следующие тесты:

- **ПЦР;**
- выделение вируса в культуре клеток;
- положительная реакция нейтрализации бляшкообразования;
- наличие иммуноглобулинов класса М в одном образце сыворотки;
- нарастание титра IgM в парных сыворотках;
- нарастание титра IgG в парных сыворотках более чем в четыре раза.
- титр 1280 и выше в РТГА в одном образце сыворотки.

Транспортирование ПБА I - IV групп между организациями осуществляется почтовой связью или нарочным(и). При получении ПБА нарочный должен представить доверенность и документы, **удостоверяющие личность**. Нарочный несет ответственность за доставку ПБА в установленном законом порядке.

ПБА I – II групп пересылают спецсвязью или с двумя нарочными, знакомыми с требованиями биологической безопасности, причем один из них должен иметь медицинское (биологическое, ветеринарное) образование и быть допущен к работе с ПБА I – II групп.

ПБА III - IV групп разрешается пересылать обычной почтовой посылкой или с одним нарочным.

При транспортировании ПБА I - IV групп в целях исключения всех видов досмотра и контроля нарочному должна быть выдана справка установленного образца .

WHO/CDS/CSR/LYO/2005.22
**ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**

Рекомендации по правилам
Перевозки инфекционных
материалов

WHO/CDS/CSR/LYO/2005.22

Рекомендации по правилам перевозки инфекционных материалов



Рис. 1. Пример принципа тройной упаковки для упаковки и маркировки инфекционных материалов категории А (рисунок был любезно предоставлен ИАТА, Монреаль, Канада).

Учет ПБА

Подразделения, проводящие диагностические исследования по выделению ПБА I - IV групп и работающие с ними

- **ф. N 512/у** - журнал регистрации патогенных биологических агентов, поступающих для исследования (идентификации) и хранения;
- **ф. N 513/у** - журнал учета выделенных штаммов микроорганизмов;
- **ф. N 514/у (514а/у)** - журнал учета движения патогенных биологических агентов;
- **ф. N 518/у** - журнал учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции;
- **ф. N 520/у** - журнал обеззараживания патогенных биологических агентов.

СОП «Порядок выноса продуктов амплификации из контура “Г” в чистую зону»

Сыворотки крови обрабатывают в соответствии с СМБ («Выделение РНК по методу SDS/EDTA/фенол» № СМБ 2\20\01-02) **мертиолятом натрия и лизирующим буфером**. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным [2]. Ответственность за точное соблюдение настоящей методики по получению копии ДНК (кДНК) с вирусной РНК несёт лицо, проводившее данную процедуру

[2] - Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп при работе методом ПЦР. Сост. Куличенко А.Н., Касьян И.А., Гаранина С.Б. (Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" г.Саратов.). Утверждено в качестве Методических указаний Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации МУ 3.5.5.–1034-01 от 23.05.2001 г. Издание официальное. 2001.

Риск инфицирования после укола иглой, контаминированной вирусом, составляет 5-40% для ВГВ, 1-10% для ВГС и менее 0,5% для ВИЧ.

Данные о риске инфицирования вирусами геморрагических лихорадок отсутствуют, однако известно, что в лихорадочном периоде заболевания в крови больного обнаруживаются высокие концентрации вируса.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Даже если работа производится с инактивированным материалом, работать с ним надо в перчатках, в халате и в респираторе, не трогать руками лицо, не чесать глаза, не поправлять волосы.

Принципиальная схема организации ПЦР-лаборатории

Зона приёма, разбора и первичной обработки материала



Обработка клинического материала



- Ламинарный шкаф 2-го класса защиты
- Центрифуга 12000-14000 об/мин
- Вортекс
- Термоблок
- Отсасыватель медицинский

1 зона

Аmplификация



- ПЦР-бюкс
- Термоциклер
- Вортекс

2 зона

Детекция продуктов амплификации



в агарозном геле:

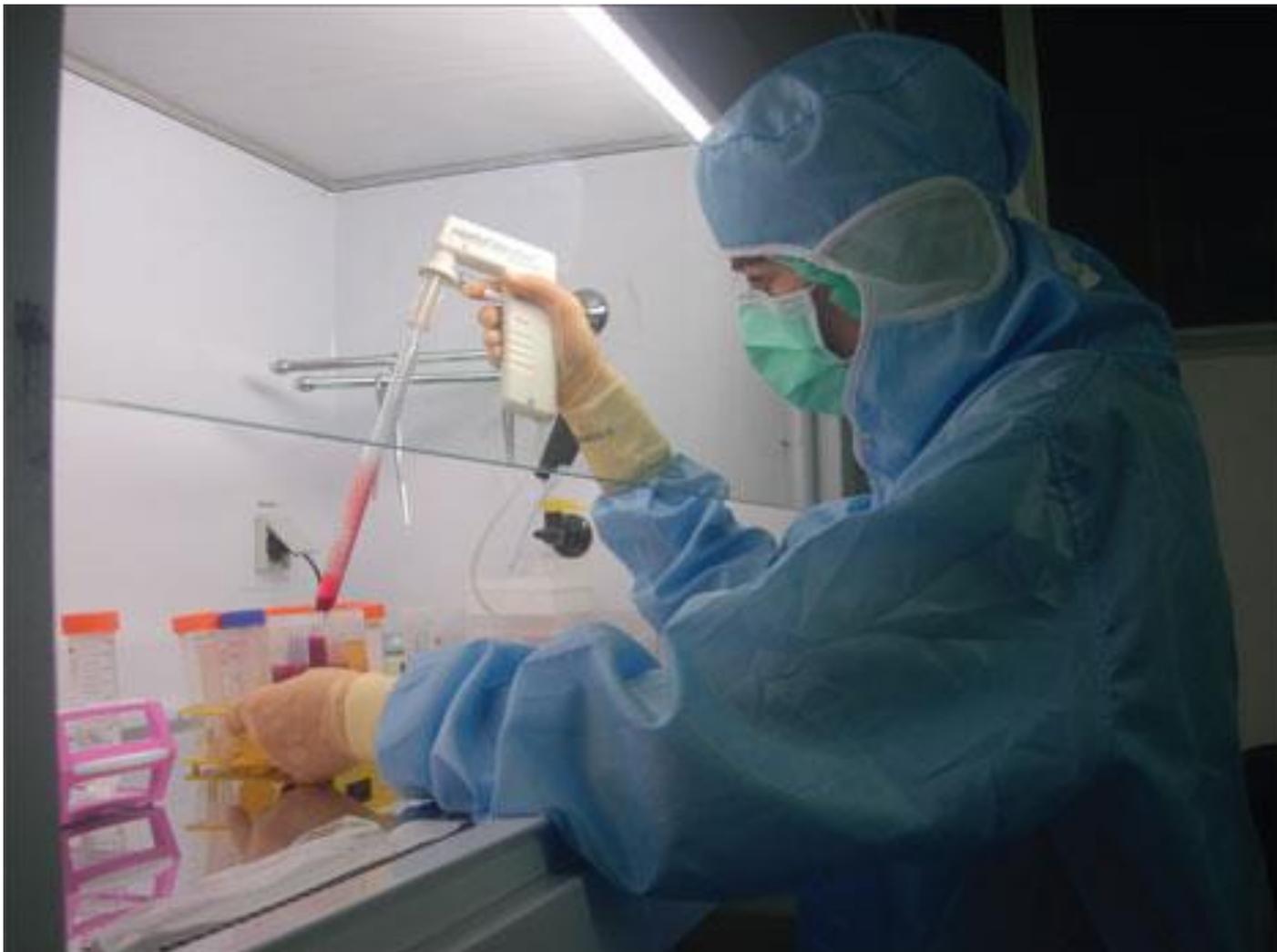
- Камера для горизонтального электрофореза
- Источник питания
- Трансillюминатор
- Система видеодокументирования

методом ГИФА:

- Ридер
- Вошер
- Термостат (термошейкер)

3 зона

Работа в БББ II класса



Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

ROBERT S. LANCIOTTI,* CHARLES H. CALISHER, DUANE J. GUBLER,
GWONG-JEN CHANG, AND A. VANCE VORNDAM†

*Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases,
Centers for Disease Control, P.O. Box 2087, Fort Collins, Colorado 80522*

Received 4 September 1991/Accepted 2 December 1991

TABLE 1. Oligonucleotide primers used to amplify and type dengue viruses

Primer	Sequence	Genome position ^a	Size, in bp, of amplified DNA product (primers) ^b
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	616-644	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482 (D1 and TS1)
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119 (D1 and TS2)
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290 (D1 and TS3)
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392 (D1 and TS4)

^a The genome positions of D1 and D2 are given according to the dengue type virus 2 published sequence (2), and the map positions of the dengue virus type-specific primers (TS1, TS2, TS3, and TS4) are given according to their respective published sequences (2, 9, 12, 15).

^b The size of the amplified product obtained with each of the type-specific primers (TS1 to TS4) was determined from the priming position of primer D1 within each respective genome. The priming position for D1 in each dengue virus genome was as follows: type 1, 105; type 2, 134; type 3, 132; and type 4, 136.

Результаты двухраундовой гнездовой ПЦР с праймерами к вирусу лихорадки Денге

548 LANCIOTTI ET AL.

J. CLIN. MICROBIOL.

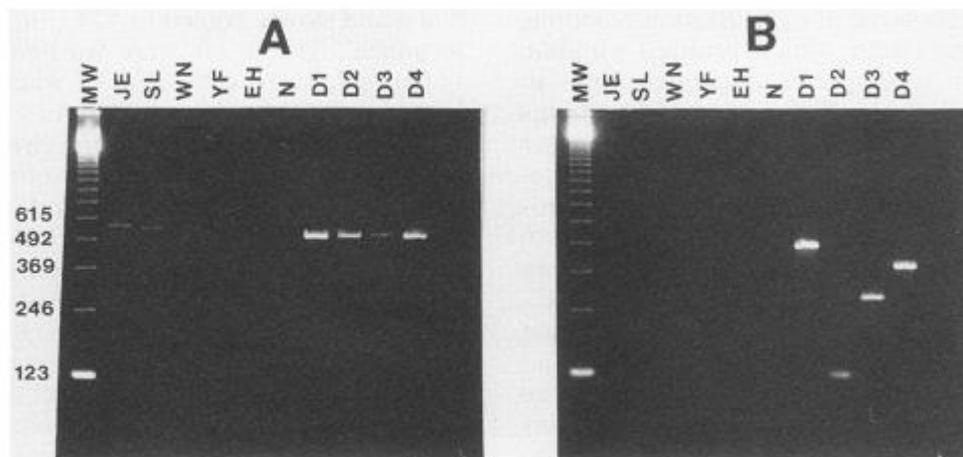


FIG. 1. Agarose gel analysis of the DNA product from RT-PCR of RNA samples isolated from dengue viruses and related flaviviruses. (A) After amplification with consensus primers D1 and D2. (B) After second-round amplification with type-specific primers TS1, TS2, TS3, and TS4. Molecular weight (MW) markers are shown on the left; DNA sizes are given in base pairs. Lanes show amplification of RNA from the following viruses: JE, Japanese encephalitis; SL, St. Louis encephalitis; WN, West Nile; YF, yellow fever; EH, Edge Hill; N, western equine encephalitis (negative control); D1, dengue type 1; D2, dengue type 2; D3, dengue type 3; and D4, dengue type 4.

Спасибо за внимание!



Вакцинация

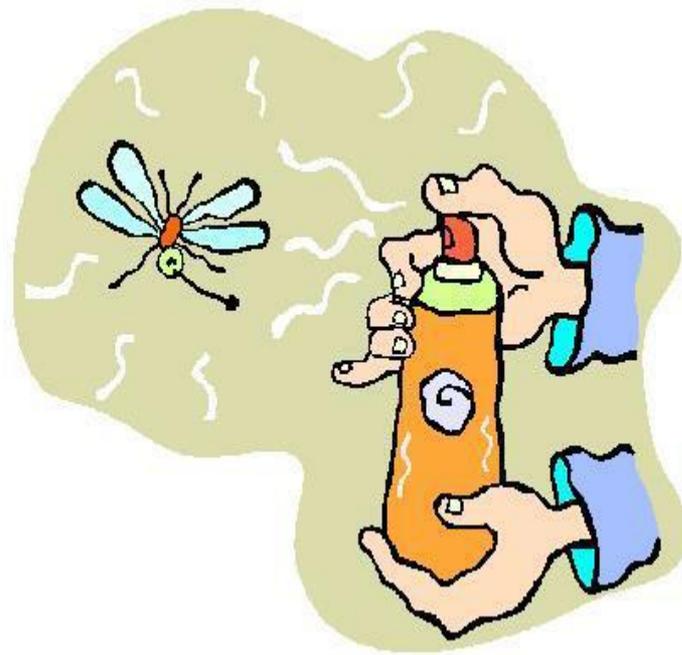
На сегодняшний день лицензированных вакцин против лихорадки денге нет.

Две вакцины-кандидата находятся на стадии клинических испытаний в эндемичных странах, а около восьми вакцин-кандидатов – на более ранних стадиях разработки.

Санофи Пастер начала разработку вакцины против лихорадки денге в 90-е годы. Клинические исследования усовершенствованной четырехвалентной вакцины-кандидата начались в 2000-е гг. Четырехвалентная вакцина-кандидат, разработанная Санофи Пастер, изучалась в рамках клинических исследований I и II фазы с участием взрослых и детей из неэндемичных (США) и эндемичных (Мексика, Филиппины) стран.

Профилактика

Борьба с комарами-переносчиками
и их личинками



Надлежащая
утилизация твердых
отходов и улучшенная
практика хранения воды





