

PCR – ТЕХНОЛОГИИ ВО ДИЈАГНОСТИКА НА ВИРУСНИТЕ ИНФЕКЦИИ

*ЈЗУ ЗС Железара, Скопје
Едукација во клиничка болница Токуда, Софија, Р.Бугарија (Ноември-
Декември 2015 година)
Прим.д-р Оливера Давчева, Специјалист по медицинска биохемија
Датум на презентација:*

- ✓ Едукацијата е изведувана во клиничката лабораторија во болницата Токуда, Р. Бугарија, оддел за вирусологија со кој раководи проф. д-р Ратка Аргирова,
- ✓ Голем дел од инфективната патологија денес одпаѓа на вирусните инфекции. Опасноста од брзо и масовно ширење на истите, неминовно ја наметнува потребата од добро познавање и постојано проучување на етиопатогенезата, дијагностиката, лекување и профилакса.
- ✓ Благодарение на научните сознанија и проучување во областа на вирусологијата и користење на вирусите како експериментален модел, настана интензивен развој и фундаментални достигнувања во молекуларната биологија, генетика и биотехнологија.
- ✓ Како резултат на тоа постојано се откриваат и нови типови на вируси кои за жал се користат како основно оружје во биотероризмот.
- ✓ До денес се идентифицирани околу 2000 видови, 287 родови, 73 семејства и 3 разреди на вируси кои според последната класификација на Меѓународниот комитет по таксономија на вируси од 2008 година при СЗО, поделени се во седум групи:

- ✓ I група вируси кои содржат двојна верижна DNA (dsDNA),
- ✓ II група вируси кои содржат едновержна DNA (ssDNA),
- ✓ III група вируси кои содржат двојновержна RNA (dsRNA),
- ✓ IV група RNA вируси кои содржат едновержна RNA која во процесот на репликација врши функција на iRNK,
- ✓ V група RNK вируси чија RNK нема својства на iRNK,
- ✓ VI група RNA-RT вируси чија RNK се реплицира во обратна транскриптаза.
- ✓ VII група DNA – RT вируси кои содржат DNK која во процесот претрпува обратна транскрипција.

✓ Молекуларно-биолошките методи кои се користат за дијагностика на вирусните инфекции постојано се усовршуваат и подобруваат, па така од квалитативни се повеќе се користат квантитативни, од заразување и култивирање во клеточни култури се почесто се преминува на директно користење на клинички материјал за вирусолошки испитувања.

✓ Со современите дијагностички методи за пократко време се изолира и идентификува причинителот на инфекцијата-вирусот, што е од голема важност за докторите клиничари навреме да постават дијагноза и да започнат со соодветна терапија.

✓ Молекуларно-биолошките методи може да се класифицираат во 5 групи и тоа:

1. Методи за добивање на рекомбинантна DNA. Рестриктази,
2. DNA хибридизација In situ хибридизација. DNK чипови,
3. Blot –техники – Southern blot, Northern blot, Western blot.
4. Методи за идентифицирање на редоследот на нуклеотидите во молекулата на DNK (секвенционирање на DNK)-електрофореза, дидезоксинуклеотиден метод на Sanger, автоматско секвенционирање.
5. Методи за умножување (амплифицирање) на DNK-Бактериски системи за размножување на нуклеински киселини (химери) PCR –полимеразна верижна реакција

✓ Техниката на полимеразната верижна реакција се употребува за умножување (амплификација) на DNK секвенци. Со употреба на оваа техника од мало почетно количество на DNK молекули се добиваат милијарди идентични копии кои се означуваат како ампликони. Добиените ампликони понатаму можат да се користат за секвенционирање, детекција на генски мутации и полиморфизми, како и за идентификација на микробиолошки агенси.

✓ Во основа PCR претставува повторувачка, двонасочна ензимска синтеза на одредени сегменти на DNK молекулата. За започнување на PCR неопходни се прајмери кои представуваат кратки иницирачки олигонуклетотиди кои се комплементарни со 5` краевите на двете вериги на DNK регионот кој се амплифицира. Ова подразбира дека однапред треба да е позната секвенцата на страничните краеве на регионот кој се умножува, тоа се добива преку секвенционирање или користење на базите на генски податоци од веќе обработениот генетски материјал.

✓ Полимеразната верижна реакција се одвива во *in vitro* услови со серија на три инкубациски чекори кои циклично се вршат промени на температурата во реакциските епрувети и тоа во точно определени временски интервали со што се овозможува верижно одвивање на ензимската реакција.

- I. **Денатурација** на двоверижните DNK молекули, при која доаѓа до раскинување на водородните врски помеѓу комплементарните вериги, се одвива при зголемување на температурата на 95 °C ,
- II. **Анилација** е чекор во кој прајмерите се поврзуваат (анилираат) со страничните почетни краеве на сегментот од раздвоените DNK молекули кои треба да се амплифицираат. Овој чекор се изведува со односно екстензија на анилираните прајмери се врши со термснижување на температурата на 48 до 72 °C
- III. **Полимеризација**, остабилна Taq полимераза на темпретатура од 68 до 72 °C . Ензимот користејќи ги слободните дезоксирибонуклеотиди dNTP (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), кои претходно се додадени во епруветата ја продолжува веригата на прајмерите при што ново синтетизирани делови се комплементарни со секвенцата на DNK што следува по прајмерите.

✓ Овие три чекори циклично се повторуваат и посекој следен циклус бројот на ампликони експоненцијално расте. Технички PCR амплификацијата се врши во специјални апарати наречени **термосајклери**. Тие всушност представуваат прецизни суви инкубатори кои даваат можност за програмирана прецизна промена на инкубациската температура за многу краток временски период.

-ОРГАНИЗАЦИЈА НА PCR- ЛАБОРАТОРИЈА-

- ✓ Просторија за припремање на реактивите-„чисто“ од нуклеински киселини
- ✓ Дел за екстракција на нуклеинските киселини-ламинарен бокс
- ✓ Дел за амплификационите реакции
- ✓ Дел за анализа на PCR продуктите

-ОРГАНИЗАЦИЈА НА РСР- ЛАБОРАТОРИЈА-



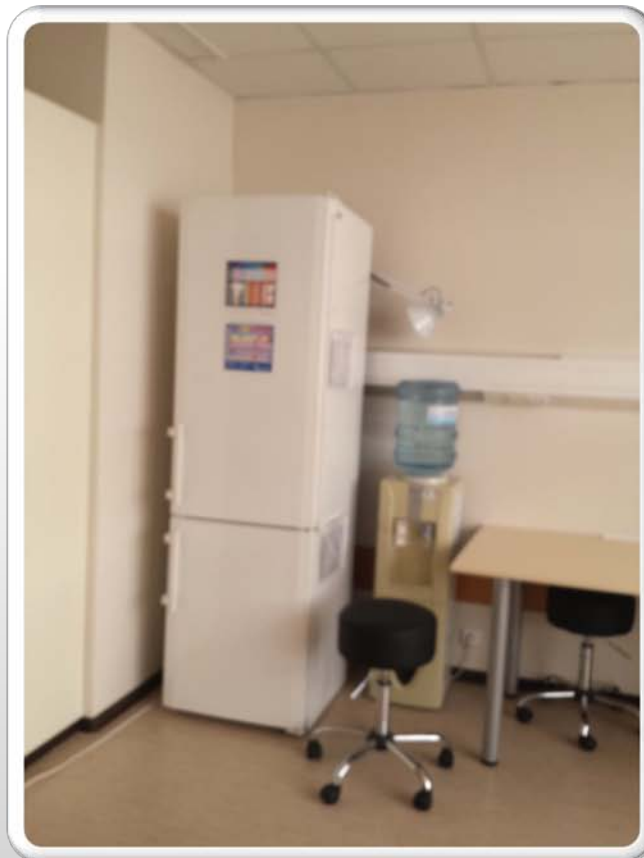
МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА



-ОРГАНИЗАЦИЈА НА РСР- ЛАБОРАТОРИЈА-



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА





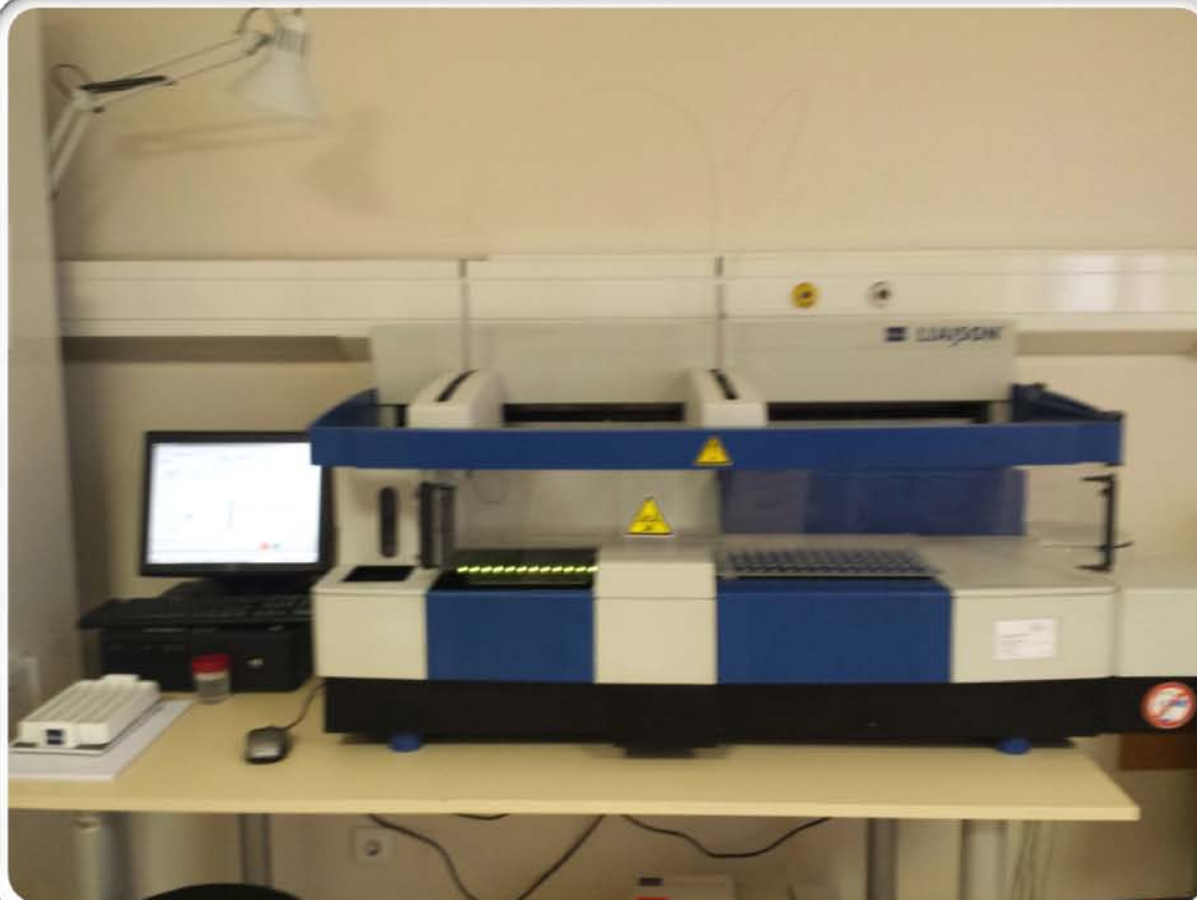
-ОРГАНИЗАЦИЈА НА РСР- ЛАБОРАТОРИЈА-



-ОРГАНИЗАЦИЈА НА РСР- ЛАБОРАТОРИЈА-



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА



DNK дијагностика



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО

Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing

M. J. Espy,* J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter,
J. D. C. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt,
F. R. Cockerill III, and T. F. Smith

*Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology,
Mayo Clinic, Rochester, Minnesota*

Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR

Shu Zhang^{1,3}, Yi-Hua Zhou^{2,3}, Lei Li², Yali Hu^{1,3*}

Molecular diagnostics of gliomas: state of the art

Markus J. Riemenschneider · Judith W. M. Jeuken ·
Pieter Wesseling · Guido Reifenberger

Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages

Dan Diego-Alvarez¹, Maria Garcia-Hoyos, Maria Jose Trujillo,
Cristina Gonzalez-Gonzalez, Marta Rodriguez de Alba, Carmen Ayuso,
Carmen Ramos-Corrales and Isabel Lorda-Sanchez

mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay

L.Ramón¹, J.Gilabert-Estellés², R.Castelló¹, J.Gilabert³, F.España¹, A.Romeu¹,
M.Chirivella⁴, J.Aznar⁵ and A.Estellés^{1,6}

Heterozygosity mapping by quantitative fluorescent PCR reveals an interstitial deletion in Xq26.2-q28 associated with ovarian dysfunction

Giorgia Fimiani, Carmela Laperuta, Geppino Falco, Valerio Ventruto, Michele D'Urso,
Matilde Valeria Ursini and Maria Giuseppina Miano¹

Preliminary analysis of AZFb region duplication by quantitative real-time PCR

K.Writzl¹, B.Zorn² and B.Peterlin^{1,3}

High Resolution Melting Analysis for Gene Scanning

Maria Erali^a and Carl T. Wittwer^{a,b}

^a ARUP Institute for Clinical and Experimental Pathology, Salt Lake City, UT, 84108

^b Department of Pathology, University of Utah Medical School, Salt Lake City, UT, 84108

High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine

Maria Erali¹, Karl V. Voelkerding^{1,2}, and Carl T. Wittwer^{1,2}

¹ARUP Institute for Clinical and Experimental Pathology, University of Utah, Salt Lake City, UT 84108.

²Department of Pathology, University of Utah, Salt Lake City, UT 84108.

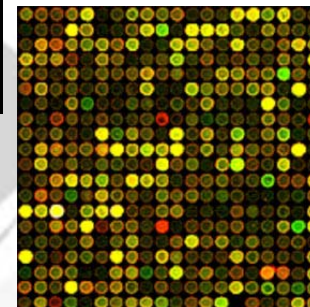
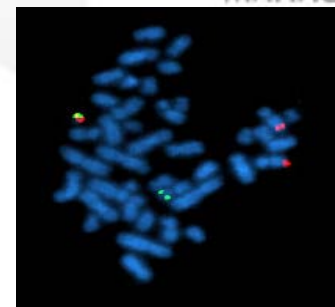
DNK дијагностика



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

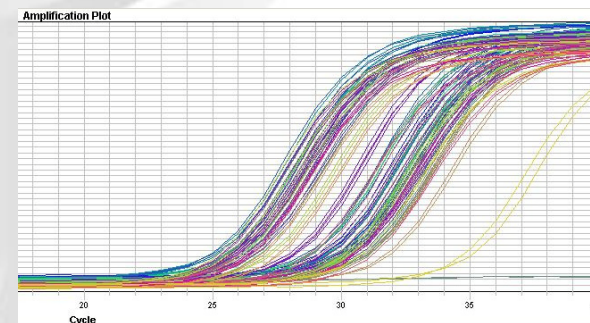
- **Хибридизациони техники**

- FISH;
- Microarrays;



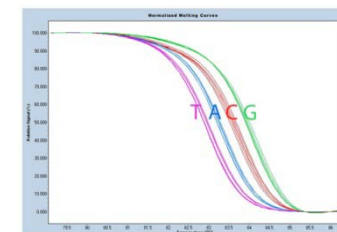
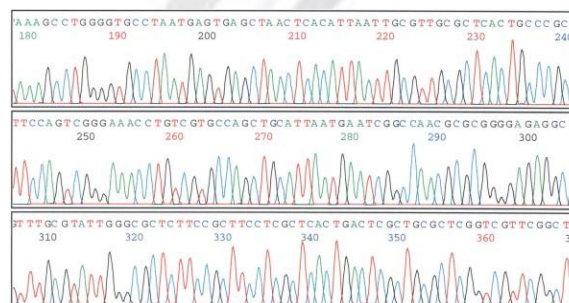
- **Амплификациони техники**

- PCR - видови;



- **Постамплификациони техники**

- HRM
- Sequencing





АМПЛИФИКАЦИОНИ ТЕХНИКИ

Полимеразна верижна реакција Polymerase Chain Reaction - PCR

Компоненти на реакцијата:

✓ *Матрица – ДНК со специфична секвенција*

✓ *Прајмери – и придаваат специфичност на реакцијата- при нови или необични вирусни варијанти и треба точно да се знаат;*

✓ *Да се избегнуваат комплементарни прајмери – т.н. primer-dimer amplification artefacts*

✓ *Дезоксинуклеотид трифосфати – градивни елементи;*

✓ *Ензим + кофактор – амплификација на таргентана последователност;*

Параметри на реакцијата:

➤ *Температура на хибридизација – специфична е за раличните протоколи. Подлежи на оптимизација;*

➤ *Број на циклуси – обично се помеѓу 30 и 40. Неопходни се и дополнителни етапи;*



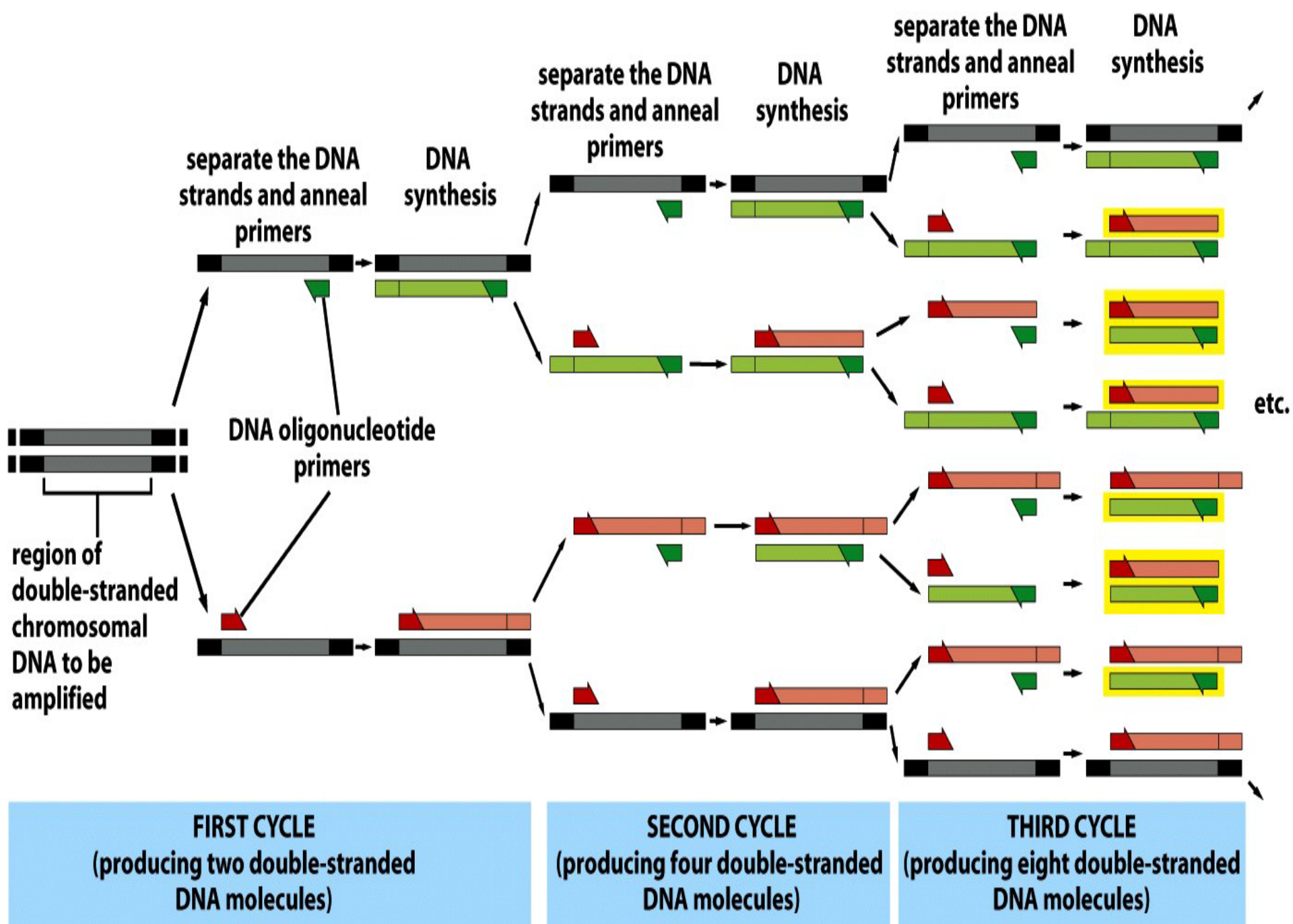
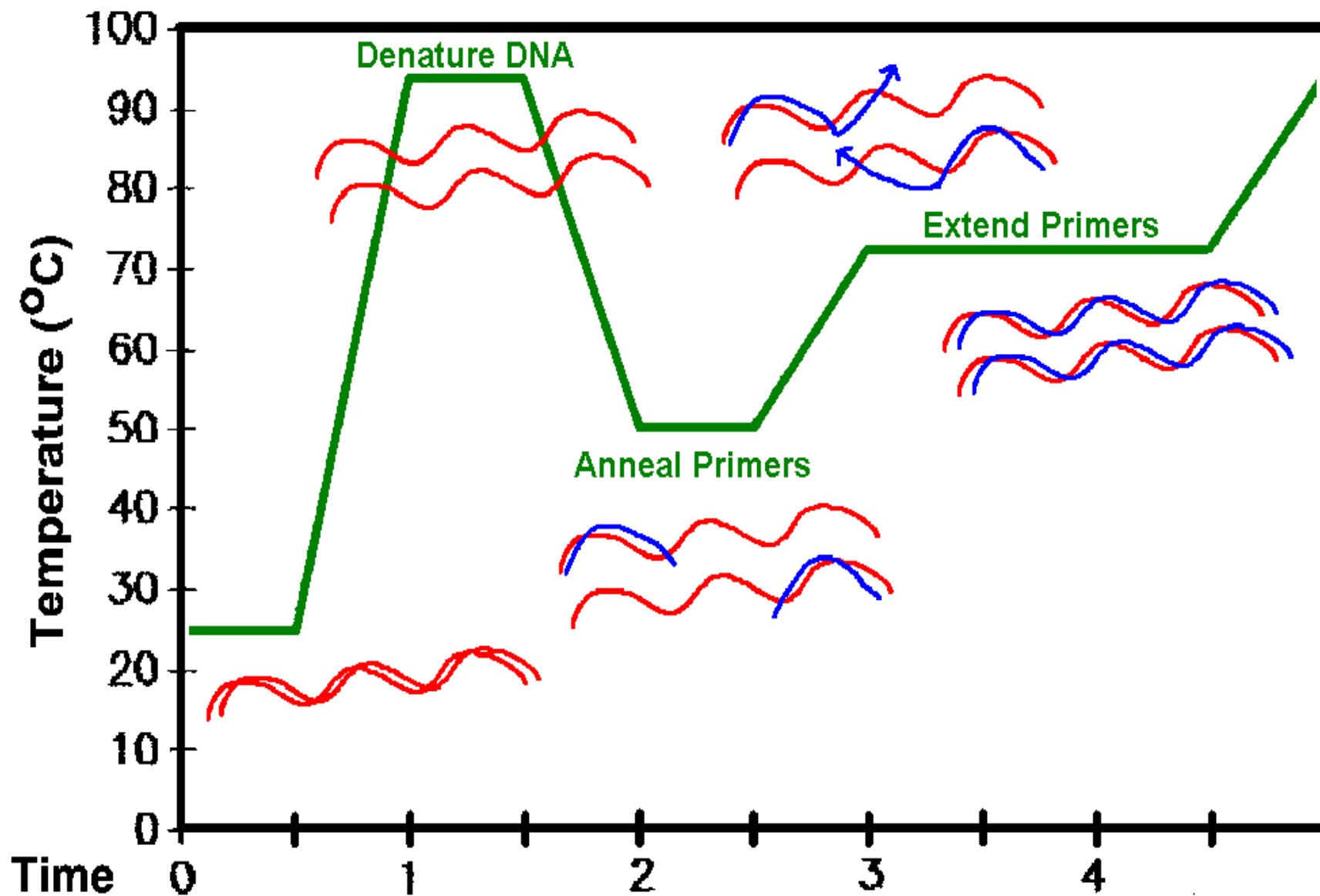


Figure 8-45b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Температурен профил на реакцијата



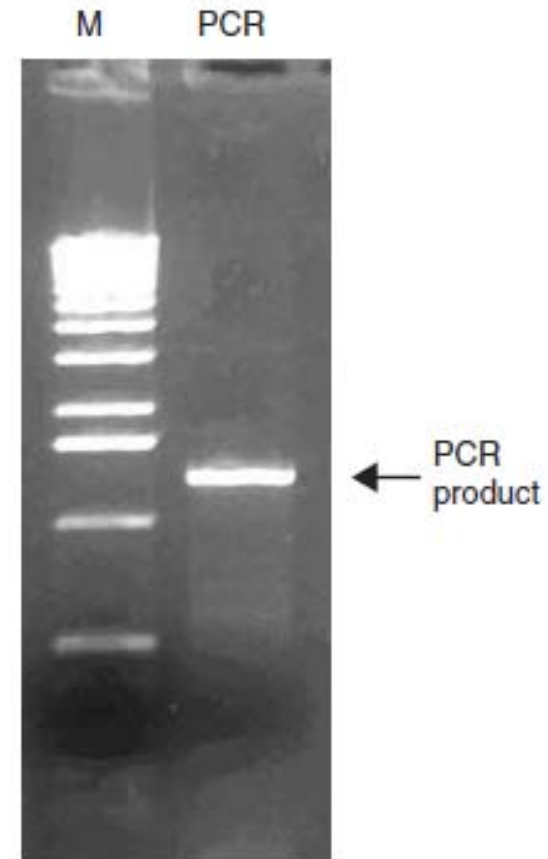
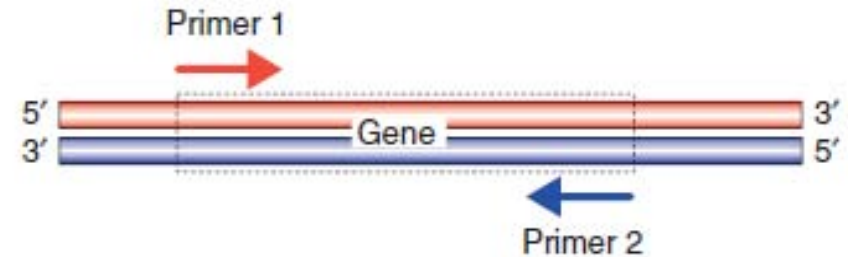
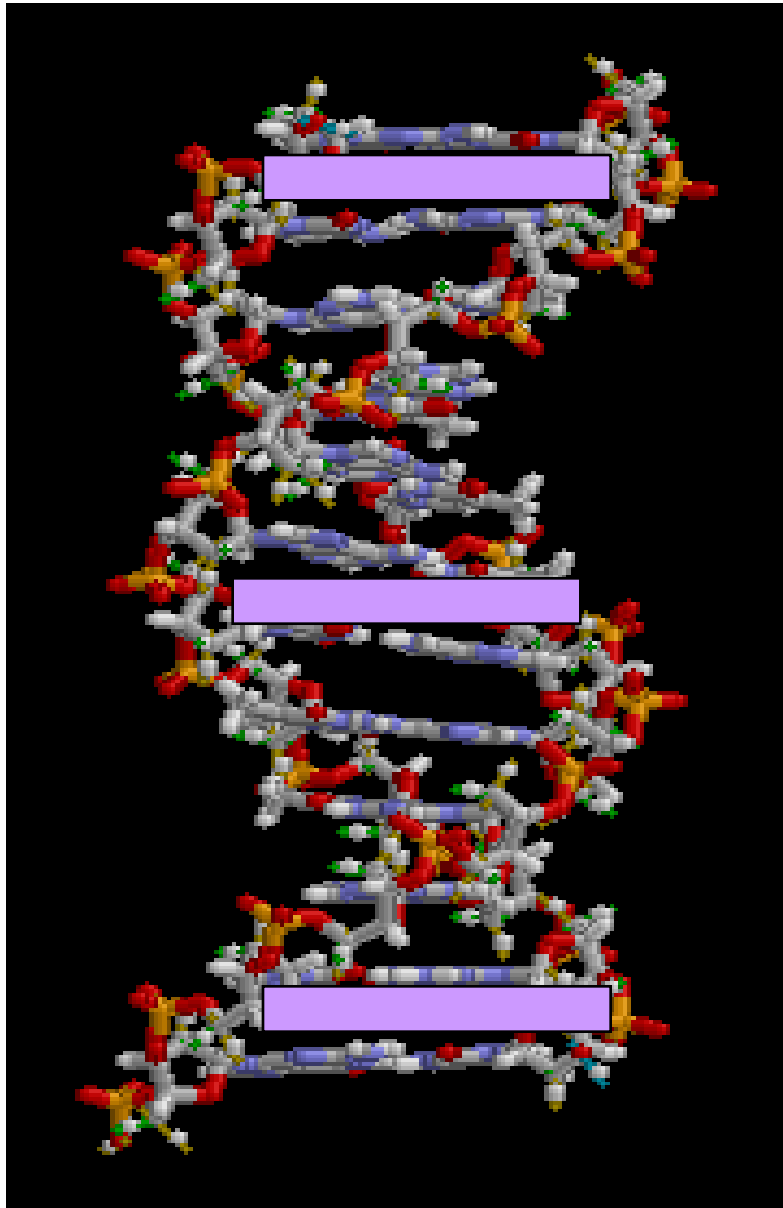
МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО



Визуализација и анализа на реакцијата



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА СРБИЈА



ЕФИКАСНОСТ НА РЕАКЦИЈАТА

$$Y = 2^n$$

$$Y = (1+X)^n$$

Cycle number

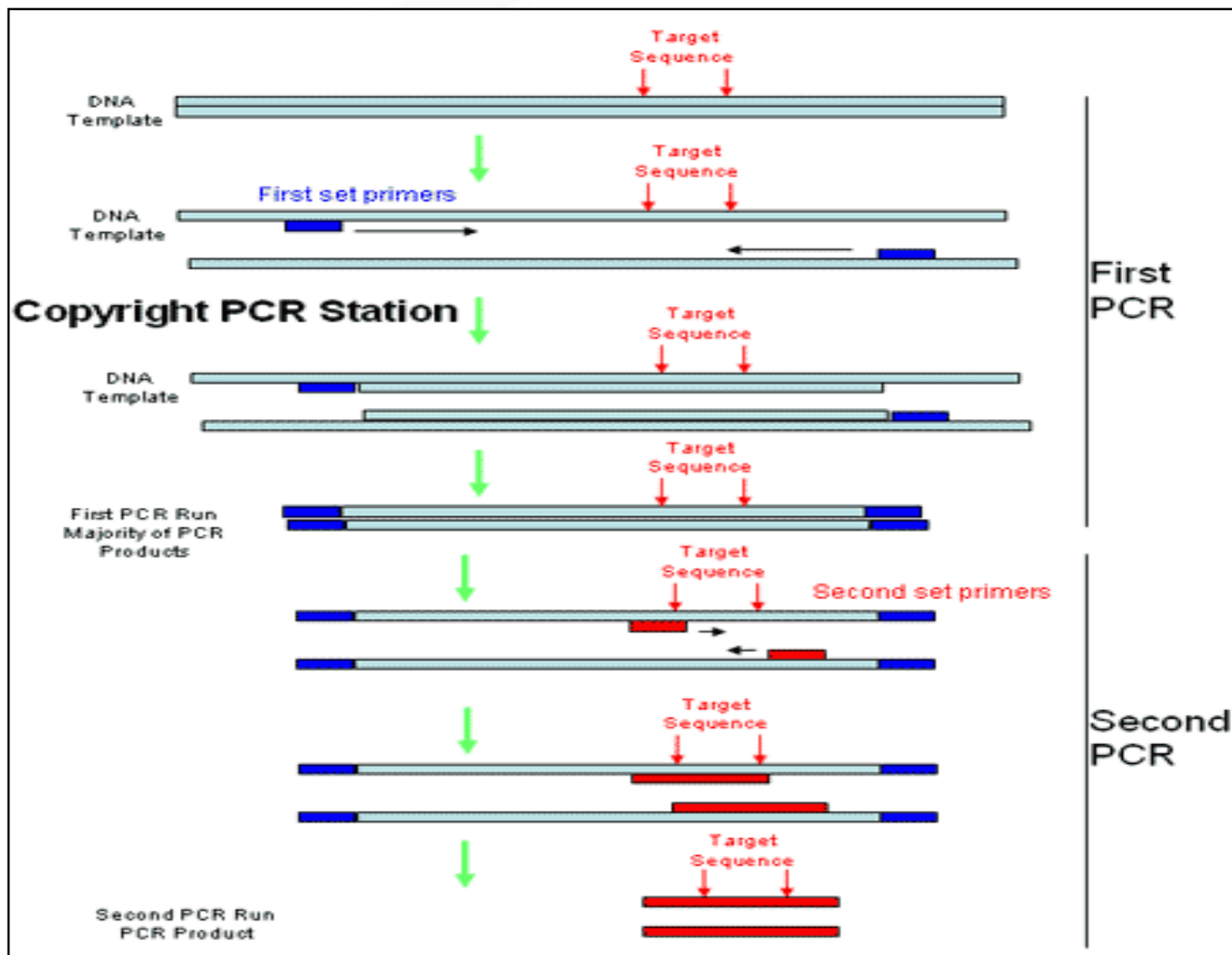
Number of double-stranded
target molecules

1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16,384
17	32,768
18	65,536
19	131,072
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
23	2,097,152
24	4,194,304
25	8,388,608
26	16,777,216
27	33,554,432
28	67,108,864
29	134,217,728
30	268,435,456



Nested PCR

- Модификација на класичната PCR реакција



ОБРАТНО ТРАНСКРИПТАЗЕН PCR/ REVERSE TRANSCRIPTASE PCR



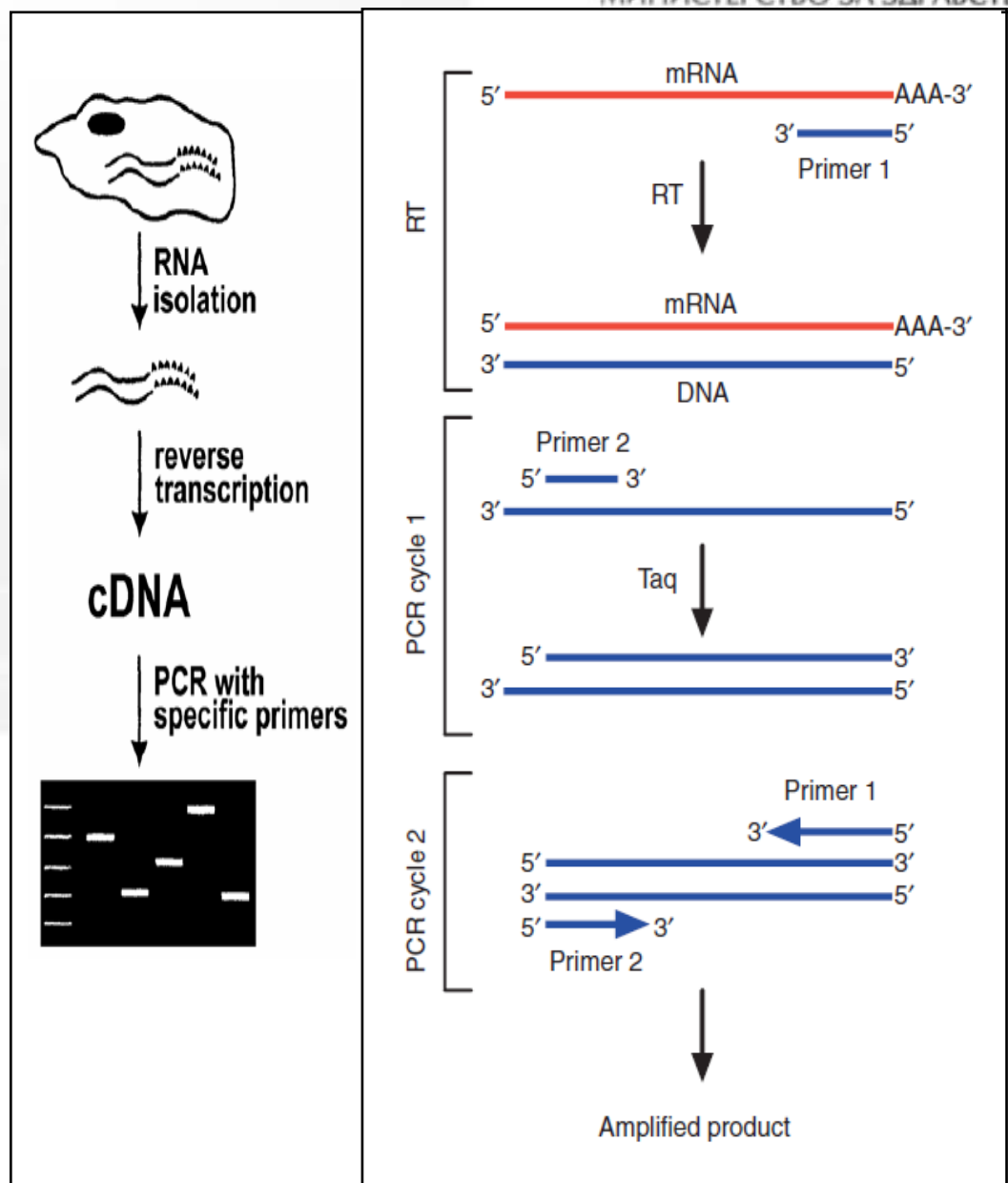
МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО

Едночекорен RT PCR

- Таq полимераза – термостабилна полимераза;
- Сайт-специфични прајмери.

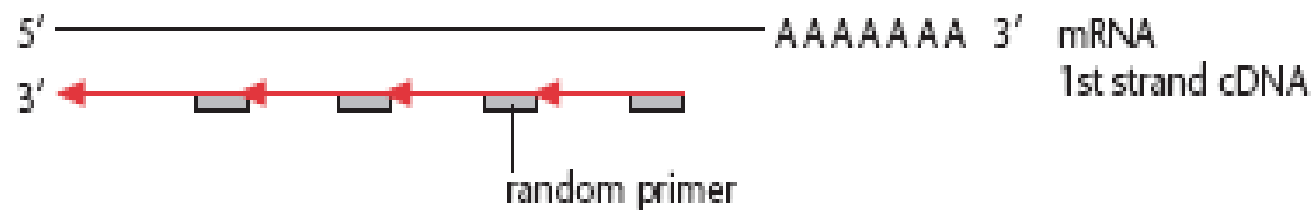
Двочекорен RT PCR

- Во една епрувета – се врши еден циклус со неспецифични прајмери и потоа се додаваат специфичните прајмери;





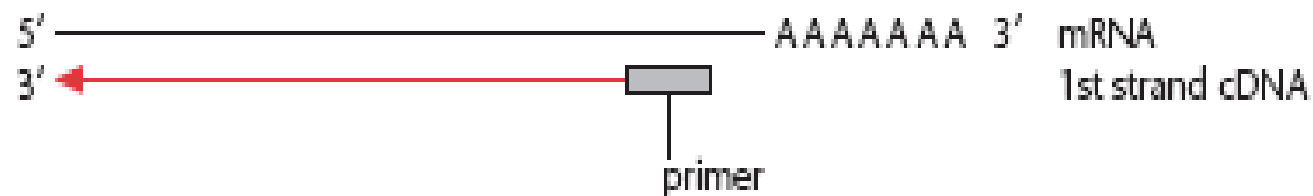
Random primer



Oligo (dT) primer



Sequence-specific primer



Едночекорен

RT PCR

Двочекорен

RT PCR



Услови при спроведување на RT PCR

- Квалитативно изолирање на мРНК;
- Ензимот треба да има РНКазна активност.

Можности на RT PCR

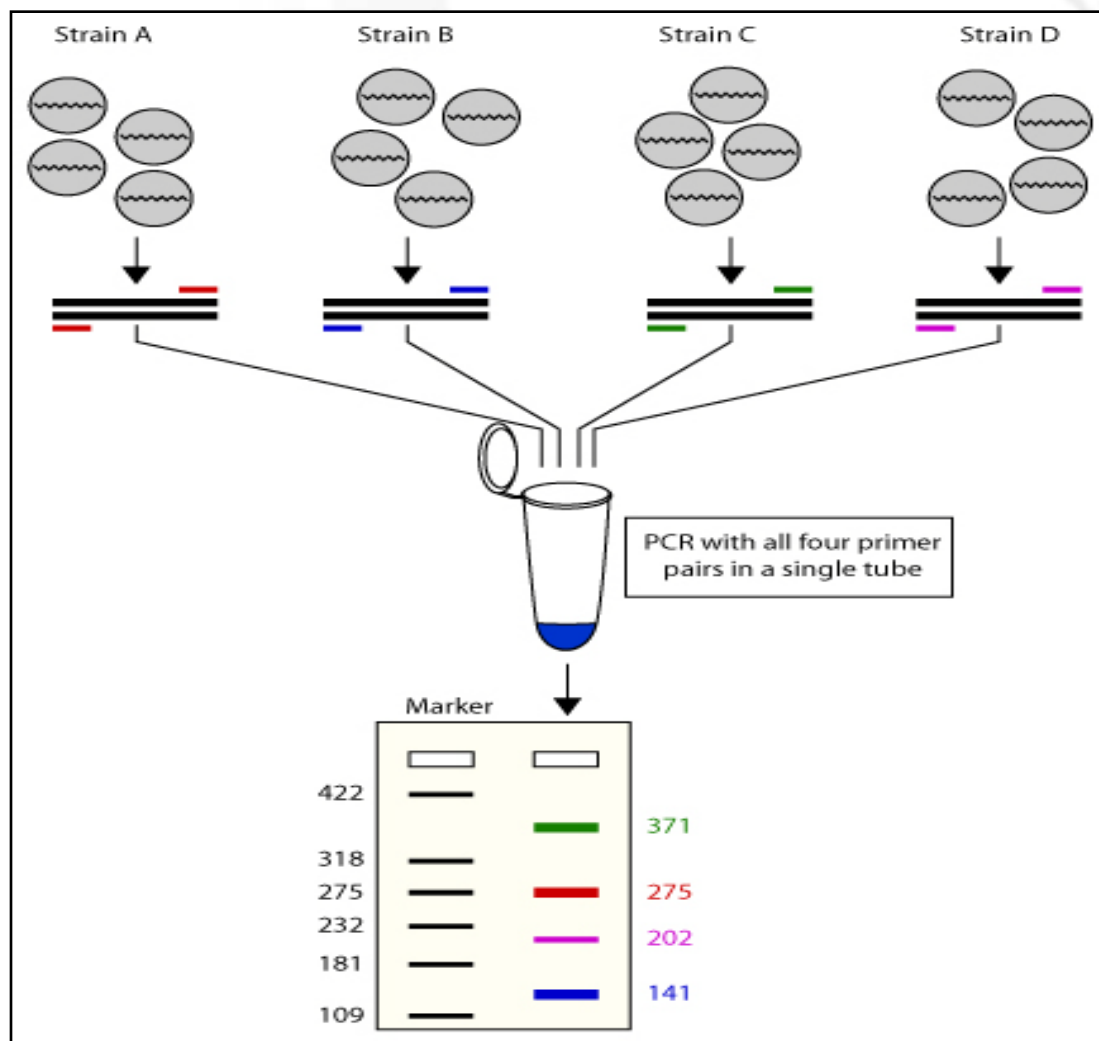
- Определување на даден транскрипт;
- Детекција на ретровируси;
- Експресиони анализи;
- Синтеза на специфични проби, кои што се користат за диагностика;
- Определување на секвенцијата на РНК.

Мультиплексен PCR / Multiplex PCR



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

- Мультиплексниот PCR е модификација на класичната реакција, при која што се користат множество на прајмери со дадена специфичност;
- Реакцијата се врши во еден ист реакционен микс, но со различни прајмери.
- Идентификацијата на специфичните продукти (ампликоните) се базира на различните размери.

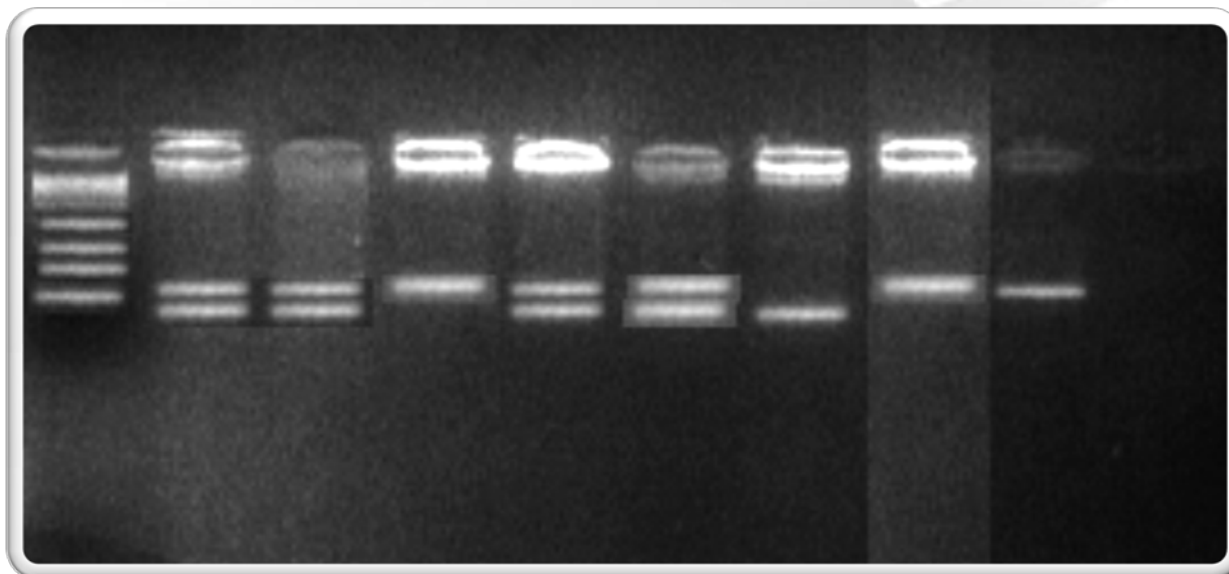


www.mzh.gov.mk



МОЖНОСТИ НА МУЛТИПЛЕКСЕН PCR

- Генотипирање на различни субтипови на еден ист вирус (напр. HPV) или патогени микроорганизми;
- Откривање на патогенни делеции во различни гени;
- Генотипирање на база на полиморфизам;





1. Denaturation and Hybridization

PCR primer sequence X



PCR primer sequence Y



Hybridization sequence (left)



Hybridization sequence (right)

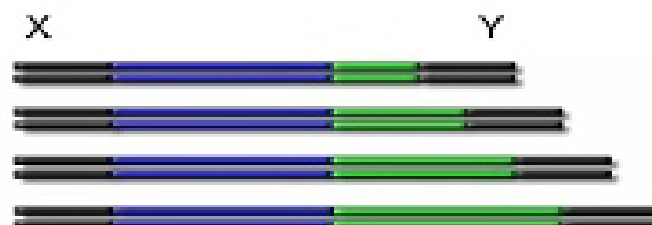


2. Ligation

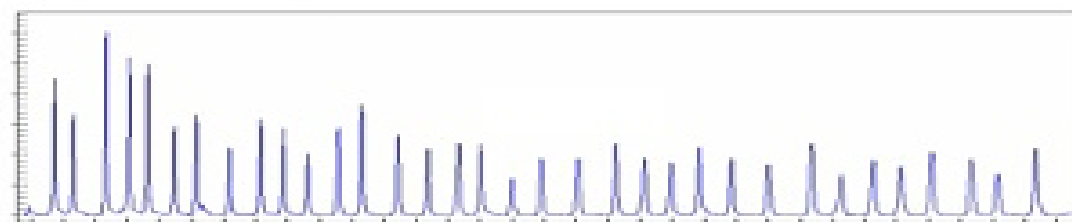


3. PCR with universal primers X and Y

exponential amplification of ligated probes only



4. Fragment analysis



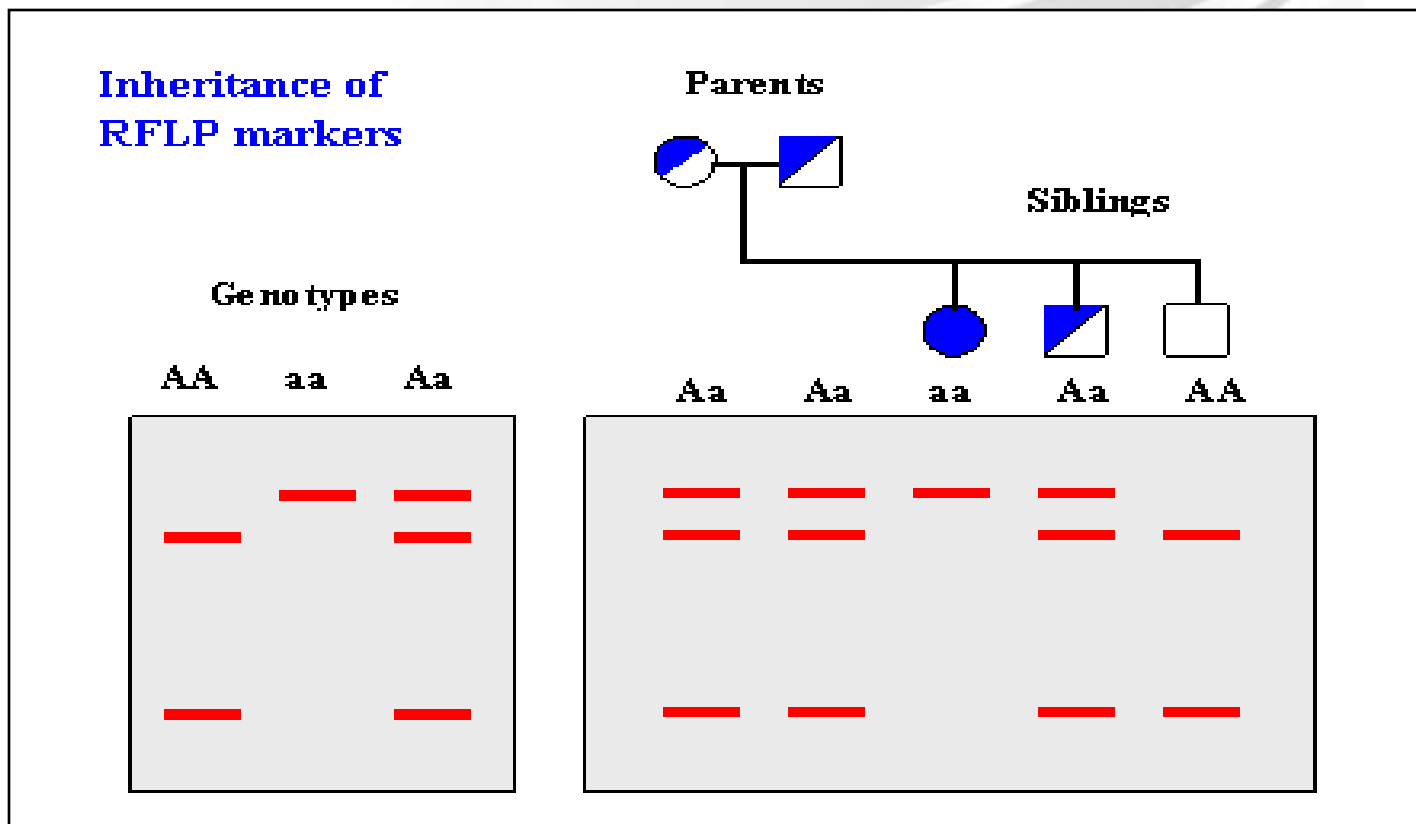
PCR реакцијата може да биде комбинирана и со други ензимни системи – PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Специфичноста на анализата доаѓа од специфичен рестриктазен ензим, кој што ја реже последователноста на ДНК во точно определена таргетна секвенца;

При наод на промени (патогена мутација) во таргетната секвенца ќе се промени афинитетот на рестриктазата кон ДНК.





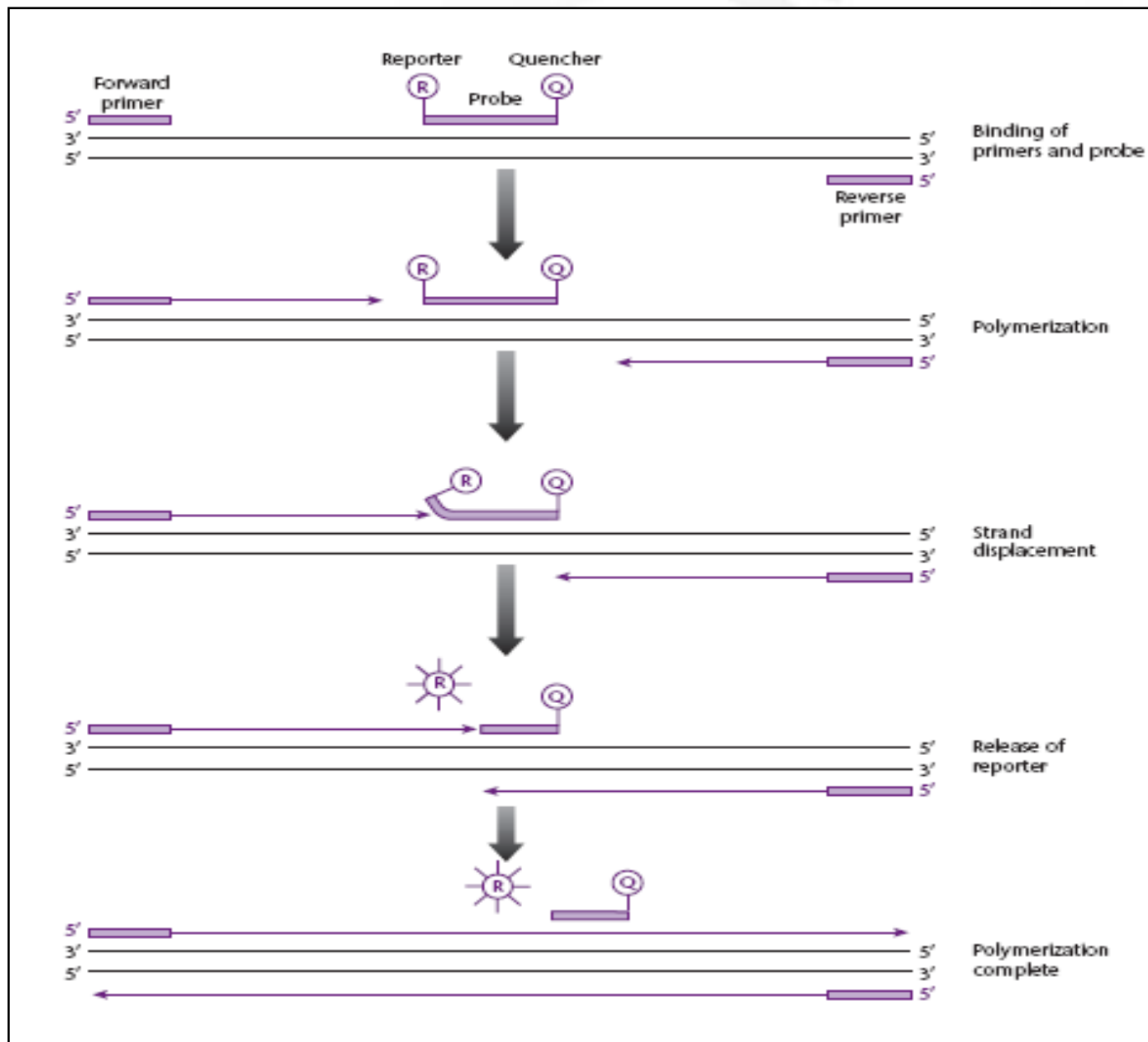
PCR анализа во реално време / Real Time PCR

По брз, помоќен и поквалитетен метод од класичниот PCR, истовремено амплифицира и количински мери број на копии

- **Нема потреба од спроведување на електрофореза;**
- **Пробите се накапуваат веднаш при што е помала можноста од контаминирање на реакцијата**
- **Анализата е на база на флуорофори,**
- **Во секој момент од реакцијата може да се мониторира, а не само на крај од образувањето на ампликонот;**
- **Методот може да се користи и за квантитавно определување;**
- **Ако RT-PCR се комбинира со обратна транскрипција, може да се определи mRNA и некодирана РНК во клетки или во ткива.**

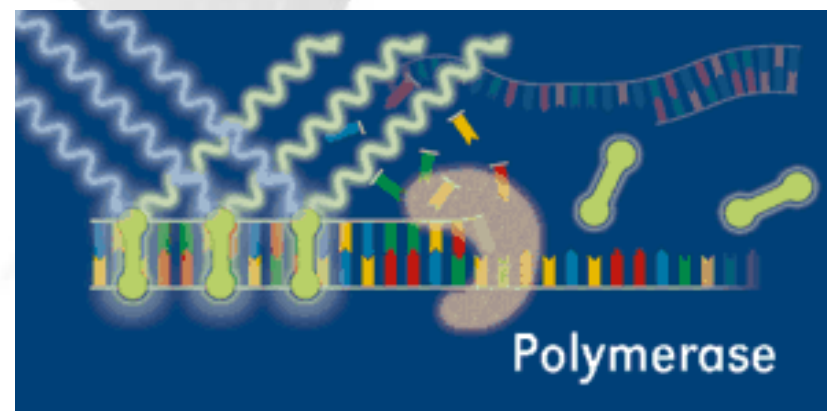
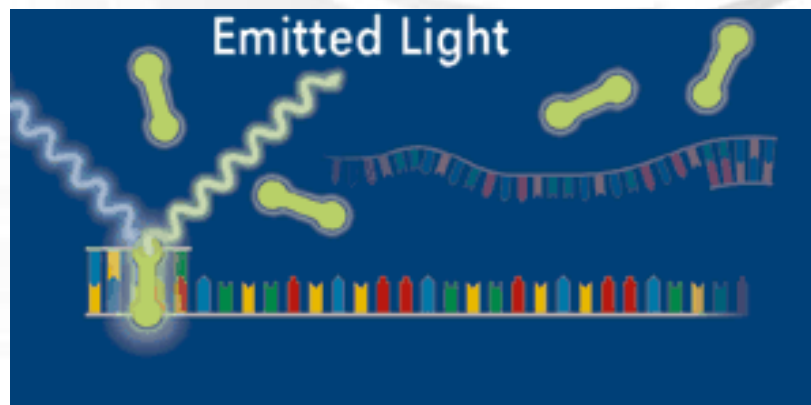
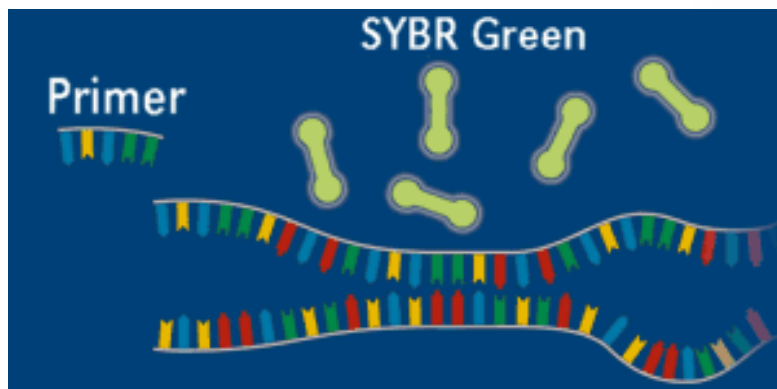


Real Time PCR на база на егзонуклеазна реакција / TaqMan





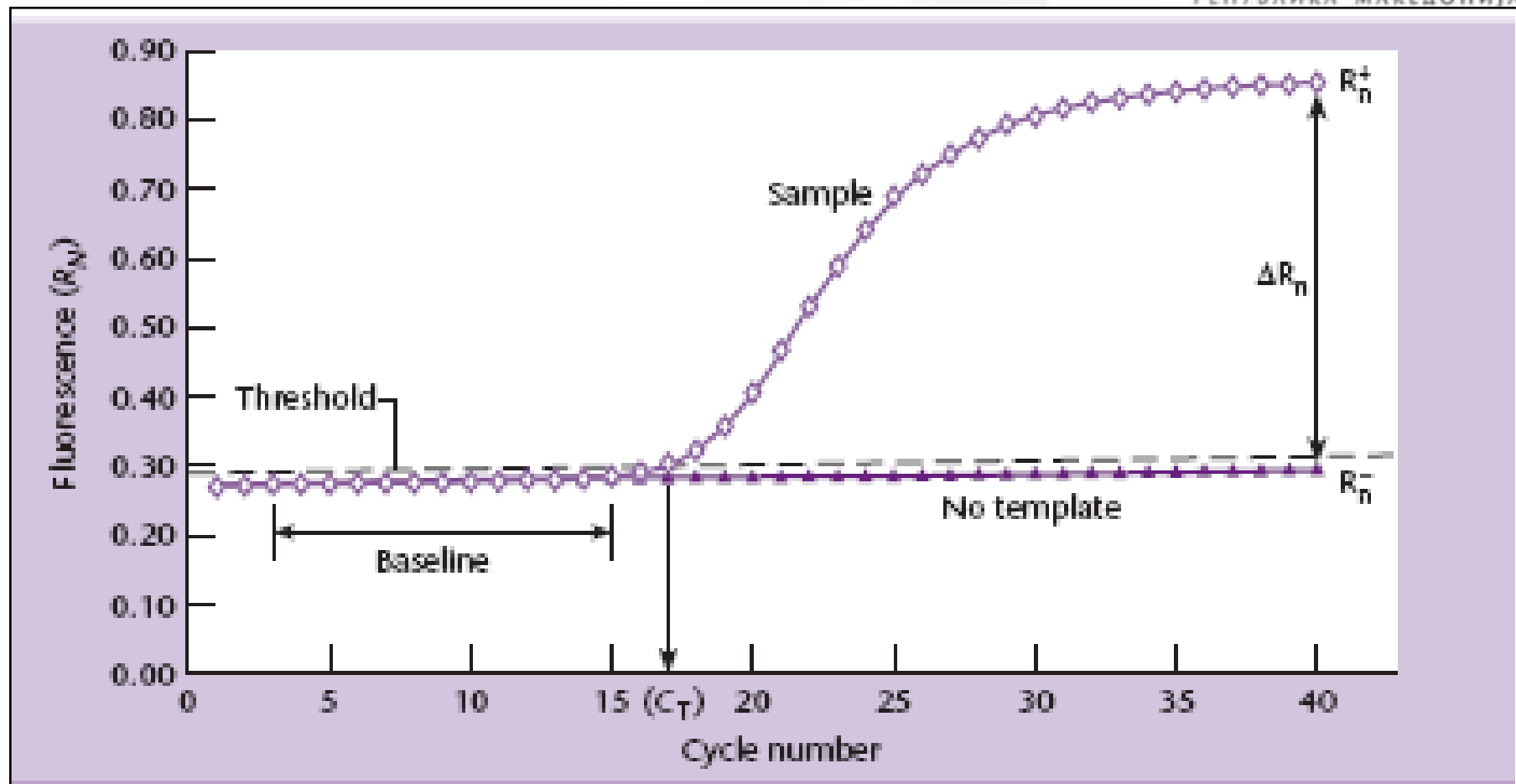
Real Time PCR на база интеркалирачки агенси / SYBR green



Анализа на резултатите добиени со Real Time PCR / qPCR



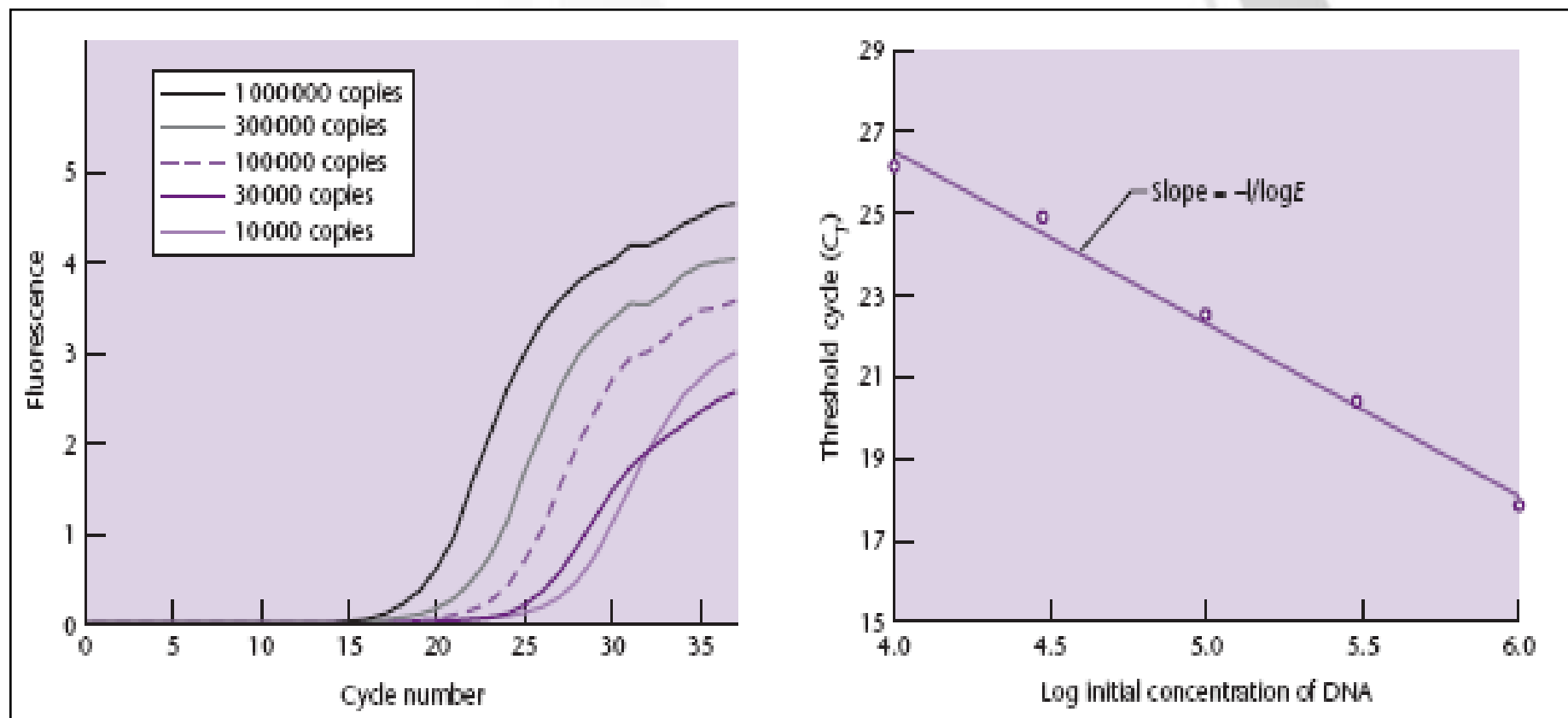
МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА



$$T_n = T_0(E)^n$$



qPCR = квалитативна и квантитативна анализа



Примери за детекција на инфекции и мутации, кои што се користат рутински во клиничката пракса

Инфекции

- HPV;
- HBV;
- HCV;
- EBV;
- CMV;
- HSV;
- HIV
- Ureaplasma/Mycoplasma;
- Neisseria;
- Candida albicans;
- Trichomonas vaginalis
- Treponema palidum;
- Influenza;
- Legionella pneumophila;
- Многу други.

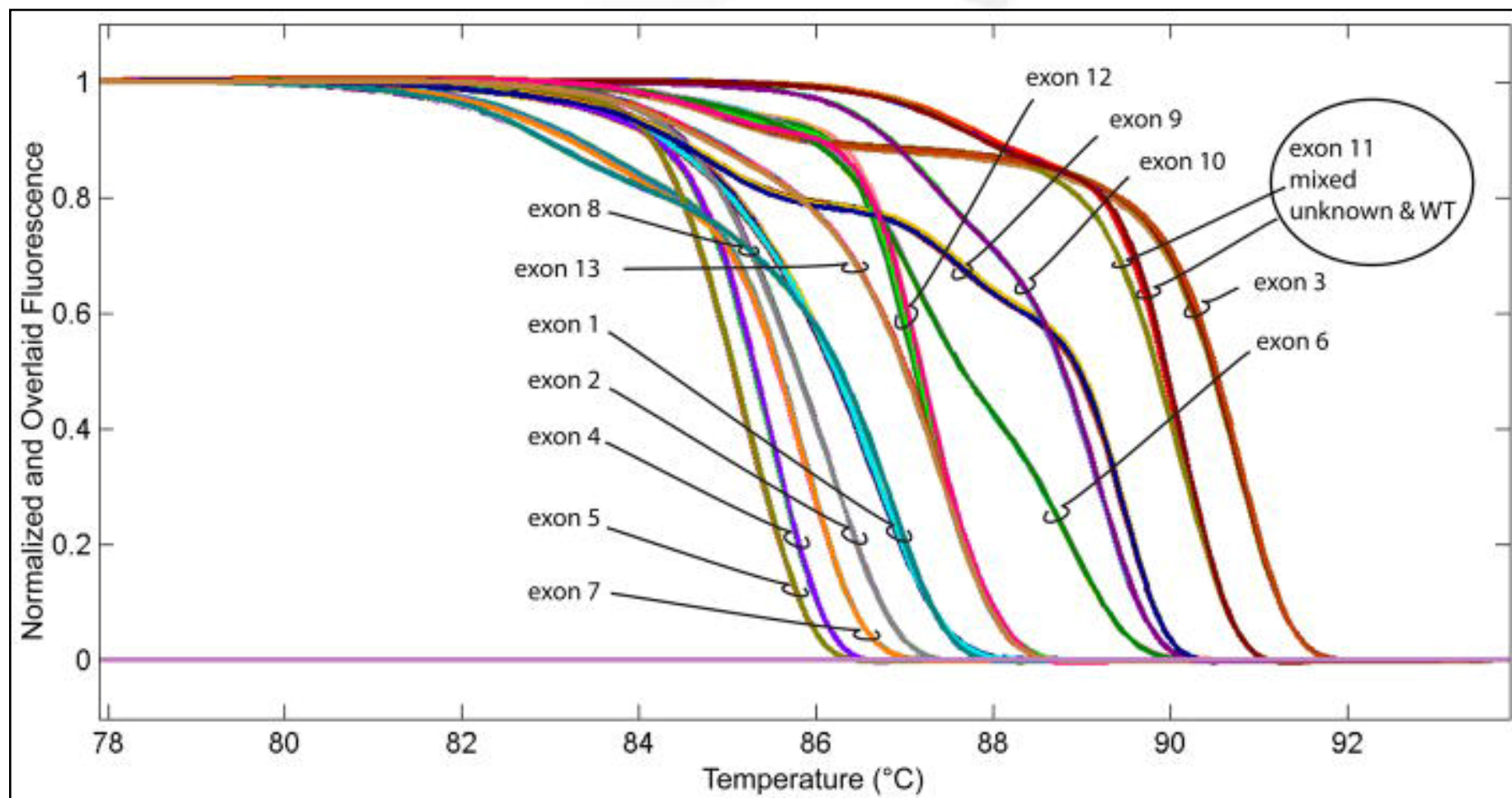
Мутации

- FVL, PT, FXII, PAI-1;
- MTHFR;
- HFE / Haemochromatosis;
- LHB, FSHB;
- LHCGR, GNRHR;
- EPHX1, GSTP1;
- CFTR;
- EGFR;
- Beta globin;
- KRAS;
- Многу други.



ГЕНСКО СКЕНИРАЊЕ

РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА



www.moh.gov.mk

I. Дијагностика на инфективни вирусни заболувања (вируси за HAV, HBV, HCV, HIV, EBV, HSV 1, HSV 2, HZV, Епштајн-баров вирус, и други)

✓ PCR како метода се карактеризира со висока осетливост и дијагностичка специфичност од 90 до 100% во однос на:

✓ Испитување на култури на клетки и ткива, 60 до 80%,

✓ Имунофлуоресценција 55-75%,

✓ ELISA 50-70%

✓ Брзи тестови 40-60 %

✓ Предности на PCR анализата:

✓ Брзина на изработување и давање на резултатот во тек на еден ден,

✓ Користи минимална количина на примерок,

✓ Се изведува од цитолошки материјал, крвни проби, серум урина, созли, ликвор, лаважа и друго,

✓ Со PCR техниката инфективниот причинител може да се открие во најрана фаза од заболувањето кога серолошките анализи сеуште се негативни,



- ПРИМЕНА НА МОЛЕКУЛАРНО-БИОЛОШКИТЕ МЕТОДИ ВО МЕДИЦИНАТА-

II. Дијагностика на генетски и епигенетски болести (пренатална дијагностика), точкасти мутации, делеции и инсерции, а посебен интерес предизвикуваат малигните и невродегенеративните заболувања кои се во пораст

III. Производство на вакцини - Со примена на рекомбинантни DNK технологии се добиват рекомбинантни вакцини кои се високо прочистени со минимални несакани дејствија.

IV. Производство на човечки протеини во терапевтски сврхи- Инсулин, STH (соматотропен хормон на раст), антихемофилен глобулин, еритропоетин, интерлеукини, кои се високо прочистени и се користат во терапија за различни заболувања,

V. Во судската медицина наоѓа широка примена за идентификација на индивидуи, докажување на татковство, при вештачење и друго.

Токуда Болница
София



Tokuda Hospital
Sofia

1407 София, бул. "Н. Вапцаров" 51Б
Тел.: +359 2 403 4000; Факс: +359 2 403 4010

1407 Sofia, 51B "N. Vaptsarov" Blvd
Tel.: +359 2 403 4000; Fax: +359 2 403 4010

CERTIFICATE

This is to certify that
Dr. Olivera Davcheva
has successfully completed individual training course in
PCR technology
from 16th November till 4th December 2015
at the Department of Clinical Laboratory,
Tokuda Hospital Sofia

Dr. Veselina Koleva

Head of Department of Clinical Laboratory

Tokuda Hospital Sofia

Dr. Iavor Drenski



CEO

Tokuda Hospital Sofia

Tokuda Hospital Sofia

Head of Department of Clinical Laboratory

Dr. Veselina Koleva

Tokuda Hospital Sofia

CEO

Dr. Iavor Drenski



www.moh.gov.mk



МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗДРАВСТВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

**ВИ БЛАГОДАРАМ НА
ВНИМАНИЕТО!**



www.mzh.gov.mk