

Кафедра: Дерматовенерология иммунология курсымен

ПРЕЗЕНТАЦИЯ

Тақырып: ЖЖБА, ПЦР Диагностикасы



Орындаған: 545 ЖМ. Гаукар Н.

Тексерген: Амантаев Д.М.

КІРІСПЕ

Қазіргі кезде жыныстық жолмен жұғатын 20 астам аурулар анықталған. Олар жоғары жұққыштығымен және тұрғындардың белгілі топтарының арасында тез тарағыштығымен сипатталады. Венерологияда «классикалық» венерологиялық аурулар (І ұрпақтық аурулар): мерез, соз, жұмсақ шанкр, венерологиялық лимфогранулематоз, венерологиялық гранулеманы бөледі. ДДҰ жіктеуі бойынша негізгі жұғу жолы жыныстық болып табылатын жыныстық жолмен жұғатын аурулардың екінші тобына (ІІ ұрпақтық аурулар): хламидиоз, трихомониаз, кандидозды вульвовагинит, микоплазмоз, генитальды ұшық, бактериалды вагиноз және т.б. жатады. Жұғу жолы жыныстық қана емес, жыныстық емес болып табылатын папилломавирусты аурулар, генитальды контагиозды моллюск, қасаға педикулезі, қышыма қотыр, В гепатиті, цитомегалия аурулары бар.



ЖАЛПЫ ТҮСІНІКТЕМЕ

Полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) —

биологиялық материалдағы анықталатын нуклеин қышқылдарындағы (ДНҚ) аз концентрациялы фрагменттердің айтарлықтай ұлғайтылуын қамтамасыз ететін молекулярлық биологиядағы эксперименталды әдіс. ДНҚ-ны амплификациялаудан басқа ПТР нуклеин қышқылдарына әр түрлі әсер етуге мүмкіндік береді (мутация, ДНҚ фрагменттерін тұтастыру). Сонымен қатар, ПТР биологиялық және медициналық практикада кеңінен пайдаланылады, мысалы, мирастық немесе инфекциялық ауруларды анықтау, әкелікті орнату, гендерді клондау, жаңа гендерді бөліп шығару, т.б.



Міндеті

- ДНК фрагменттерінде өсу
- Жасушалық ДНК тексереді- ол бактерияның ДНК
- Адамның ДНК тексереді- генетикалық ерекшелігің яғни геном



ЕРЕКШЕЛІГІ

Параметр	Характеристика
Жоғарғы сезімталдық	Бір бірден немесе одан көп жасушаны көрсетеді
Жоғарғы спецификалық	Қоздырғыштың ДНК фрагмент анықтайды, детерминирован түрлерін, токсигендігің және басқа ерекшелігін
Универсальді әдіс, анализдің жауабын жедел түрде алу	Барлық қоздырғышты анықтауда 2-6 сағат
Тексеру клиникалық материалы	Биомассасын өсіру міндетті емес.
Микроорганизм түрлері	Культивирленген, культивирленбеген, персистирленген



ДНҚ ЖАСУШАДА ӨСУІ

- Денатурация(плавание)-95 градустан астам ыстықта ДНҚ тізбегі екіге ажырай бастайды.
- Кейінгі кезеңінде керісінше температураны түсіреміз (отжиг этап) сосын екі тібекке қысқа праймерлер келіп орналасады.
- ДНҚ полимераза қосылады температура 72ге дейін көтеріледі.Оның нуклеотидтері екі еселейді (репликация) немесе синтез этап.

30-45 циклдан кейін осы ДНҚ фрагменттер ампликон кұрайды 1-2 миллиардка дейін.

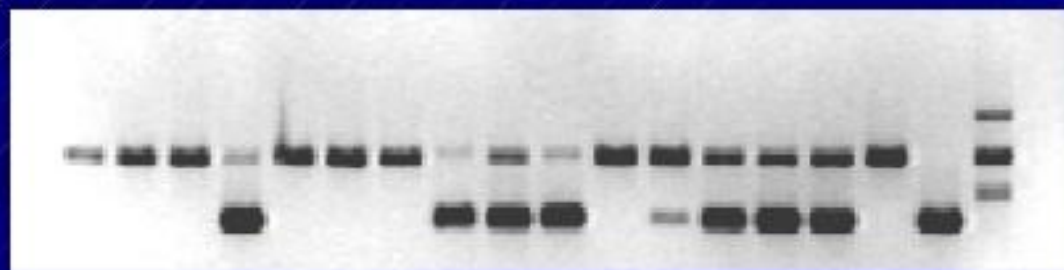
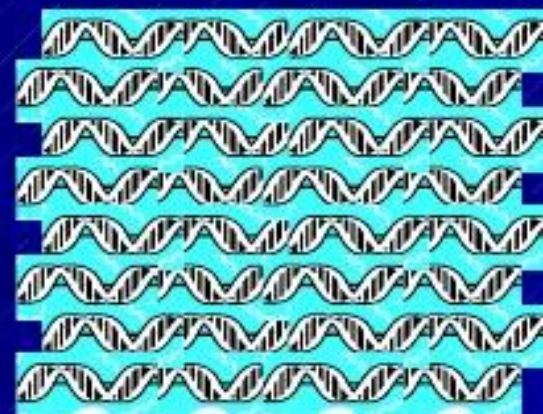


Полимеразная цепная реакция

1 копия
фрагмента ДНК



амплификация
(копирование)
фрагмента ДНК



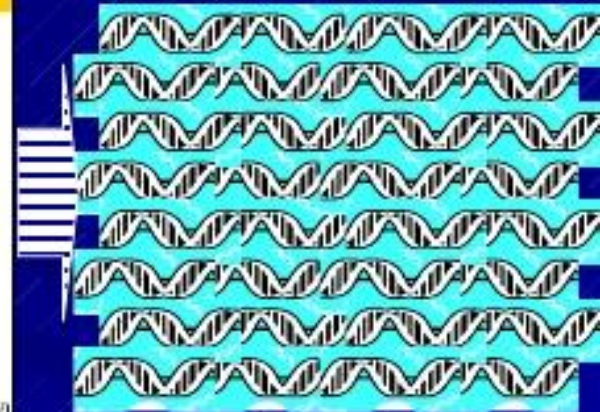
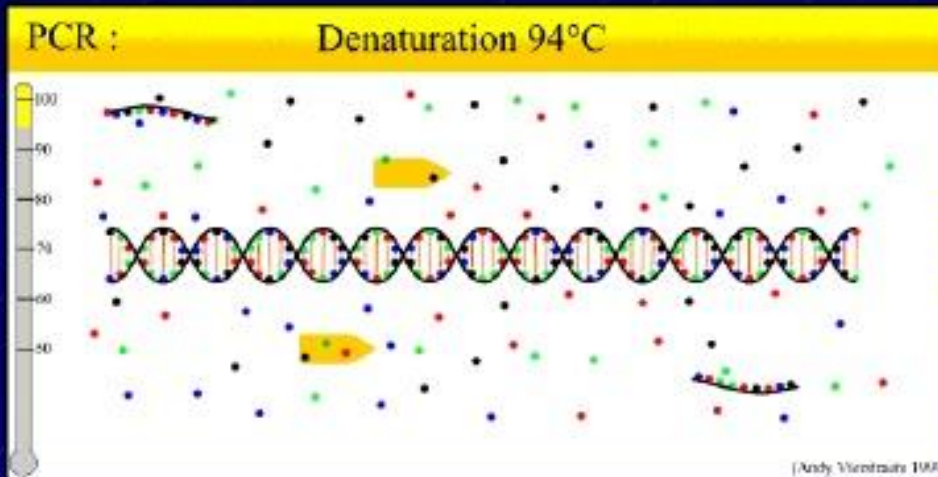
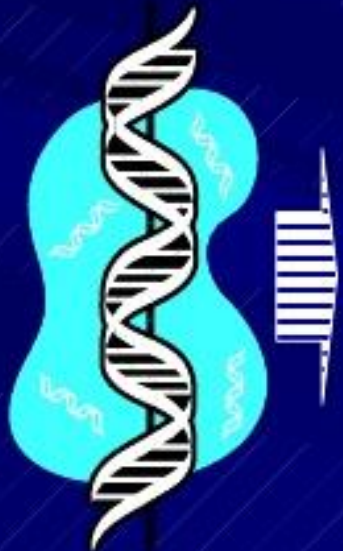
10^{10} - 10^{12} копий
фрагмента ДНК



АмплиСенс
biotechnologies

Полимеразаны тізбекті реакцияның бір циклінде фрагменттердің көлемі 2 есе ұлғаяды. Реакцияның N циклі ішінде амплифицирлеуші фрагмент көлемі 2 есе ұлғаяды. Қазіргі таңда ПТР –ға термофильді бактерияны *Thermus aquaticus* ДНҚ- полимеразасы қолданылып жүр. Бұл әдіс 1980 жылғы кеңес ғалымдары мен генетиктері А.С Каледин, А.Г. Смоларенко және С.И. Городецкийдің зерттеулеріне сүйенеді. Tag-полимеразалы реакцияның температуралық оптимумы 70 С шамасында. Бұл реакцияның тағы бір маңызды қасиеті аталған полимераза +95 С-да ұзаққа созылған инкубация кезінде инактивтелмейді. Tag-полимеразасын қолдана отырып бірден 2 мәселені шешуге болады. Біріншіден, термотұрақты полимераза ДНҚ денатурациясы кезеңінде инактивтелмейді, сондықтан реакцияның әр циклынан соң жаңа фермент қосудың қажеттілігі жоқ. Бұл жеңілдік ПТР-ны жүргізуді автоматтандыруға мүмкіндік береді. Екіншіден реакцияның жоғары температуралық оптимумы зерттелініп отырған геномда праймерлердің гибридтенуін қамтамасыз етеді. Бірақ Tag полимеразаның кемшілігі де бар мысалы, салыстырмалы төмен дәлділік сонымен қатар ДНҚ соңында аденозинмонофосфат қосу қасиеті. Tag-полимеразадан басқа қазіргі уақытта көптеген термотұрақты полимеразалар қолданып жүр. Соның ішінде жоғары дәлдікке арналған *Pycococcus furiosus* ішінен pfu . Реакция өнімдері агарлы геледе бөлініп бромды этидиймен боялып визуалданады. Бромды этидий ДНҚ-мен әсерлесіп оның флуоресценциясына әкеледі, сәулеленгенде ультракөгілгін түске өнеді.

Полимеразная цепная реакция



1 копия
фрагмента
ДНК

10^{10} - 10^{12} копий
фрагмента ДНК

Қоздырғыш	МКБ -Х	Диагностика әдіс
<i>Treponema pallidum</i>	Сифилис	Серология ПЦР
<i>N.gonorrhoeae</i>	Гонорея	Микроскопия посев МАНК
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Урогенитальды трихомоноз	Микроскопия посев , МАНК,ИФА
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Урогенитальды хламидоз	Микроскопия ПИФ, ИФА аг,ИФА ат, МАНК
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	МАНК
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	посев ,МАНК,ИФА



Материалды алу және сақтау

Клиникалық қолданылуы мынадай материалды аламыз:

1. Әйелдерде: Үрпіден цервикальды канал, уретра, қынаптан жағынды , тәңертеңгі несептін тәңертеңгі бірінші салымы, транспорттық ортада 300мкл .
 2. Ерлер—уретрадан жағынды, транспорттық ортада 300 мкл, қуық асты безінен секрет— 300-500 мкл.
 3. Балалар—несептін тәңертеңгі бірінші салымы, конъюнктивадан жағынды, транспорттық ортада 300 мкл.
- Материалды бір тәуліктен көп емес 2-8градуска дейін , жылына сақтаған жағдайда 68 °С ден кем емес және де жоғарыда емес болу керек. Бір рет қатырып сақтауға болады.



Для проведения исследования на наличие ДНК определенного микроорганизма анализируется следующий клинический материал:

- для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma spp.*, *U. parvum* / *U. urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans* и *Gardnerella vaginalis* - соскобы (мазки) со слизистых оболочек урогенитального тракта, клеточный осадок мочи;
- для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* возможно также использовать мазки с конъюнктивы, синовиальную жидкость;
- для выявления ДНК HSV I,II, HSV-typing - соскобы и мазки со слизистых оболочек урогенитального тракта, отделяемое везикул (пузырьковых высыпаний);
- для выявления ДНК CMV - соскобы и мазки со слизистых оболочек урогенитального тракта, клеточный осадок мочи, слюна;
- для выявления ДНК *Treponema pallidum* – отделяемое (серозный экссудат) эрозивно-язвенных элементов, везикул, соскобы и мазки со слизистых оболочек урогенитального тракта.

При использовании секрета предстательной железы для анализа на наличие возбудителей ИППП (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*) для выделения ДНК рекомендуется использовать набор реагентов «ДНК-сорб-В».



ГОНОРЕЯ АНЫҚТАУДАҒЫ ЕҢ ТИІМДІ ӘДІС

Используемые методы диагностики гонореи в КВД РФ (86 лабораторий-100%)*

Метод диагностики	Применение в КВД	ДЧ метода
Микроскопия (по Граму)	96.3 (%) 13 (%) - единст. метод	80-95% (М) 30-50% (Ж)
Бак. посев.	75(%)	95-98 (М) 80-87% (Ж)
ПЦР	35%	95-98% (М и Ж)
Два метода	87%	?

ХЛАМИДИЯ АҢЫҚТАУДАҒЫ ЕҢ ТИІМДІ ӘДІС

Используемые методы диагностики хламидиоза в КВД РФ (86 лабораторий-100%)*

Метод диагностики	Применение в КВД (%)	ДЧ метода
Микроскопия (по Романовскому)	33 %	10-12%
ПИФ	96.3 %	40-60%
ИФА (серолог.)	79.3%	50%
Бак. посев.	3.7%	60-80%
ПЦР	46%	95-98%
Два метода	87%	?

ПТР АРҚЫЛЫ АҢЫҚТАҒАН ҚОЗДЫРҒЫШТЫҢ УНИВЕРСАЛЬДЫ ПРОТОКОЛ

Универсальный протокол выявления возбудителей с помощью ПЦР



ПЦР на *N.gonorrhoeae*

ПЦР на *C.trachomatis*

ПЦР на *T.vaginalis*

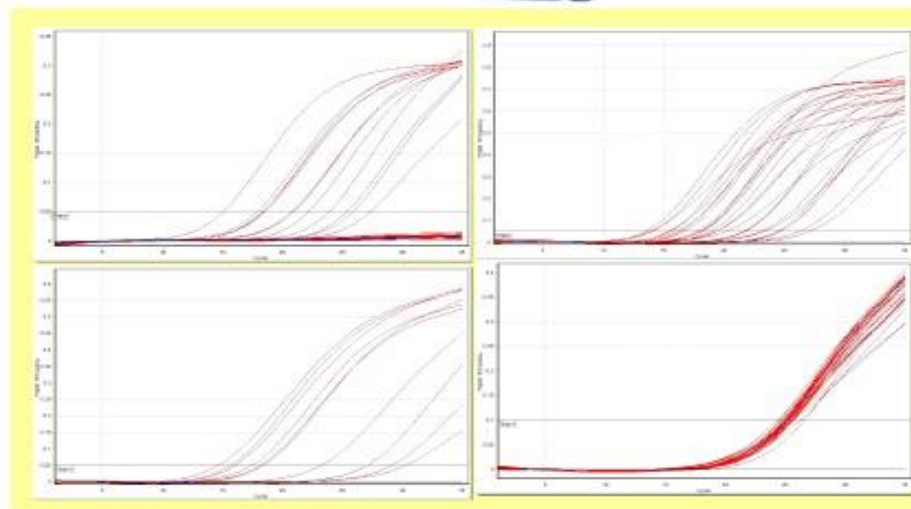
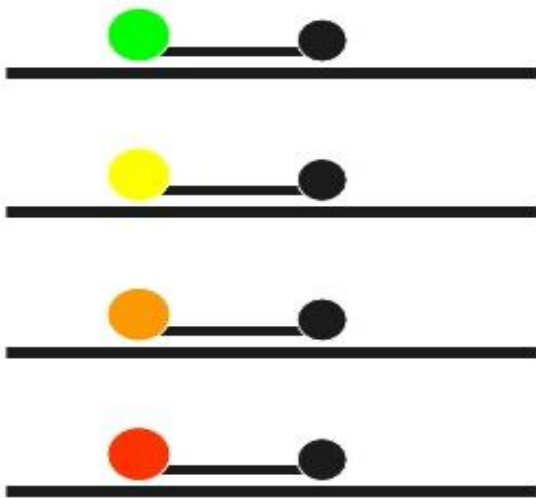
ПЦР на *M.genitalium*

ПЦР на *Urealasma*

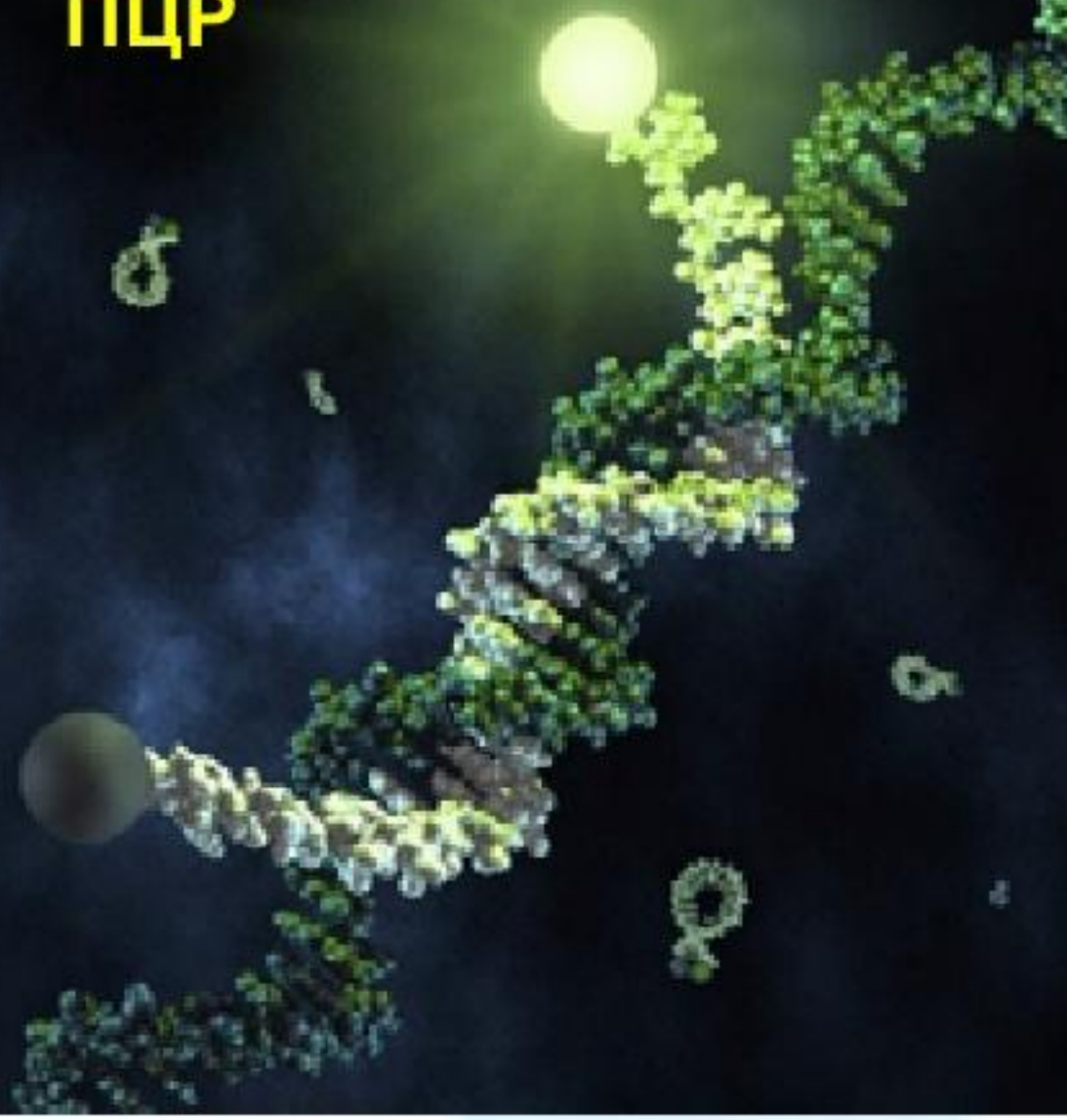
БІРНЕСЕ НЫСАНАНЫҢ БІРМЕЗГІЛДІК АМПЛИФИКАЦИЯ ЖӘНЕ ДЕТЕКЦИЯСЫ REAL-TIME

Одновременная амплификация и детекция нескольких мишеней

Real-time



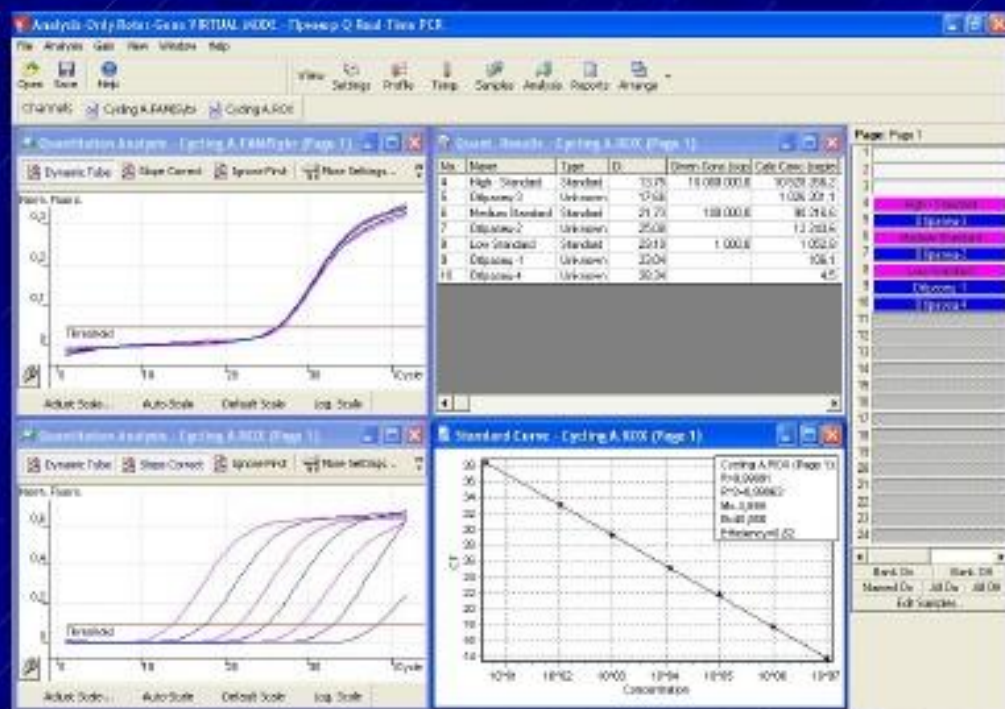
Гибридизационно-флуоресцентная детекция – расширение возможностей ПЦР



Нақты уақыттағы ПТР-ның маңызды параметрі болып босағалық циклдың мағынасы есептеледі. Ең оңайы оны амплификация өнімдерінің жиынтығының тіркеуі басталатын цикл ретінде анықтау. Оңтайлы жағдайда, 1-үлгідегі нысананың ДНҚ концентрациясы 2-үлгіге қарағанда 2 есе үлкен болса, онда 1-үлгінің босағалық мағынасы 2-үлгінікіне қарағанда 1 бірлікке аз болады. Бұл әр циклдың өту барысында реакция өнімдерінің екі еселенуі жнруіне байланысты. Осыған орай оңтайлы жағдайда үлгілер арасындағы босағалық мағынаның циклдері N есе айырмашылық болса, онда алғашқы ДНҚ-нысананың саны 2^n есе өзгеше болғаны.

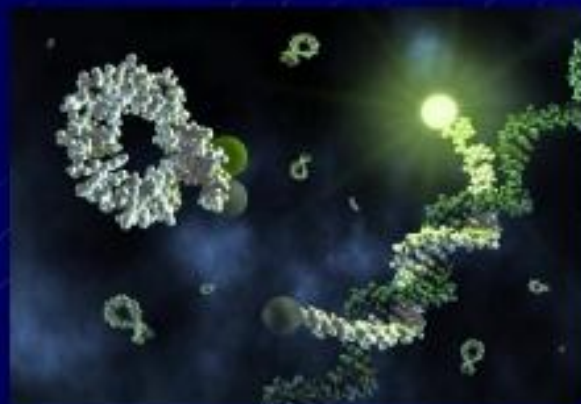


Измерение концентрации ДНК с помощью ПЦР в реальном времени – оценка плотности колонизации возбудителем

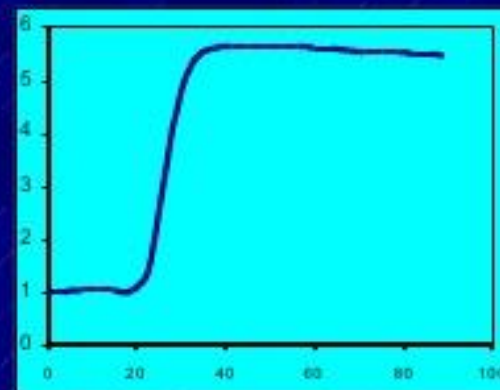


NASBA-Real-Time

Leone G., et al, 1998



РНК-мишень
10-100 копий



Линейная фаза
(получение первых
РНК-ампликонов)

РНК-ампликоны
 10^9 - 10^{12} копий

Фаза амплификации
(экспоненциальное
Нарастание количества
РНК-ампликонов)



Детекция *M.genitalium* с помощью МАНК

gyrB

1 копия / клетка

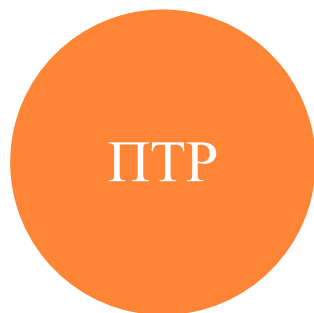
ПЦР

Хромосома

**ТМА
NASBA**

16S-rRNA

$\approx 10^3$ копий / клетка



N.gonorrhoeae: ПЦР, посев + NASBA

N= 213

ПЦР	Бак.посев	NASBA
+	+	+
+	+	+
+	+	+
+	+	+
+	+	+
+	+	+
+	+	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	+
+	-	-
-	+	-

n= 59

Истинно
положительные
результаты

ӘДЕБИЕТТЕР

- ПЦР А.А.Воробьева Москва 2004г.
- Аксенов М.Ю Диагностика Инфекционного заболеваний с помощью ПЦР
- Зигангарова Н.А. Журнал Микробиологии

