**Краткое содержание лекций дисциплины**

### «Специальные методы выделения и изучения вирусов»

# Модуль 1. Неамплифицированные зонды нуклеиновых кислот

**Лекция 1. Введение в молекулярную диагностику**

Методы молекулярной диагностики для вирусного тестирования быстро развивались в последние годы и были внедрены в большинстве лабораторий в качестве нового способа диагностики патогенов человека, таких как вирусы. Эта область молекулярной микробиологии представляет множество проблем для практики лабораторной медицины, прежде всего внедрение автоматизированной методологии. Внедрение полностью автоматизированных устройств с более быстрым временем выполнения работ позволило клиническим лабораториям получить необходимые инструменты для предоставления врачам чувствительных и точных результатов. Цели при проведении микробиологических тестов на нуклеиновые кислоты (NAT) заключаются главным образом в том, чтобы обеспечить своевременные результаты, полезные для оказания высококачественной медицинской помощи пациентам по разумной цене. Быстрые результаты, полученные с помощью NAT, связаны с улучшением ухода за пациентами. Эмпирические данные и исследования моделирования показывают, что более быстрое выявление энтеровирусного менингита с использованием NAT связано с сокращением продолжительности пребывания и продолжительности введения антибиотиков, а также существенной экономией затрат. Использование методов амплификации, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени или амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA) для обнаружения вирусов, генотипирования и количественной оценки, имеет некоторые преимущества, такие как высокая чувствительность и воспроизводимость, а well также широкий динамический диапазон. Большое количество of качественных и количественных молекулярных вирусных анализов, в основном были описаны методы, основанные на технологии ПЦР. Анализы NASBA могут идентифицировать активную инфекцию путем обнаружения вирусной РНК-мессенджера (мРНК), но наиболее широко используемыми тестами в клинической диагностике вирусов являются количественные методы ПЦР в реальном времени. Многие методы молекулярной диагностики были заменены автоматизированными устройствами, которые потребляют меньше времени, управляют меньшими объемами жидкостей и обеспечивают количественные результаты с большей точностью. Молекулярные методы произвели революцию в диагностике инфекционных заболеваний, особенно в диагностике вирусных заболеваний. Автоматизация этих методов обеспечивает сокращение времени выполнения работ, низкий риск загрязнения, простоту выполнения и скорость, а также возможность иметь более низкие пределы обнаружения и снизить затраты на один тест.

**Лекции 2-4. ДНК-ДНК гибридизация. Жидкофазная ДНК гибридизация.** **Твердофазная и *in situ* ДНК гибридизация**

Зонды нуклеиновых кислот представляют собой сегменты ДНК или РНК, меченные радиоизотопами, ферментами или хемилюминесцентными молекулами, которые могут связываться с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот микроорганизмов. Эти зонды могут быть использованы для идентификации некоторых вирусов. The Обычно используемые форматы для зондирования гибридизация включает жидкофазную, твердофазную и *in situ.* В целом, эти методы обладают низкой аналитической чувствительностью, поэтому их можно использовать только в тех ситуациях, когда количество микроорганизмов велико.

Анализ жидкофазной гибридизации-это метод, при котором одноцепочечный ДНК-зонд мечен эфиром акридиния и затем инкубируется с целевой нуклеиновой кислотой. После стадии гибридизации связывание с зондом измеряют в люминометре.

При твердофазной гибридизации целевая нуклеиновая кислота связывается с нитроцеллюлозой или нейлоном и гибридизуется с раствором зонда. Затем идентификация проводится с помощью флуоресценции, люминесценции, проявления цвета или радиоактивности. Основным ограничением этого анализа является трудоемкость и сложность методики, поэтому его применение в клинической практике очень ограничено.

Наконец, *in situ* гибридизация in situ представляет собой твердофазную гибридизацию, при которой нуклеиновая кислота содержится в клетках или тканях, зафиксированных на предметных стеклах микроскопа. Основным недостатком *in situ* гибридизации in situ является ограничение доступности целевой нуклеиновой кислоты в клетках.

**Модуль 2. Методы амплификации нуклеиновых кислот**

**Лекция 7. Методы сигнальной амплификации**

Методы сигнальной амплификации:

* Анализ разветвленной ДНК
* Метод гибридного захвата

Эти методы используют ферментативно-опосредованные процессы, при которых ферменты синтезируют несколько копий целевой нуклеиновой кислоты. Продукты амплификации детектируются двумя олигонуклеотидными праймерами, которые связываются с комплементарными последовательностями. Конечным результатом является производство миллионов of копий целевой последовательности. Существует вероятность of загрязнения, поэтому ложноположительные результаты должны быть уменьшены с помощью специального лабораторного проектирования, практики и рабочего процесса.

Метод гибридного захвата - система представляет собой метод гибридизации раствора-захвата антител, в котором используется система обнаружения хемилюминесценции гибридных молекул. ДНК из образца денатурируется, а затем гибридизуется со специфическим РНК-зондом. Гибриды ДНК-РНК улавливаются антителами против гибридов. Конъюгат антитела детектируют с помощью хемилюминесцентной подложки, а люминометр служит устройством для измерения испускаемого света. В настоящее время коммерчески доступны гибридные анализы захвата для выявления вируса папилломы человека (ВПЧ) и цитомегаловируса (ЦМВ) в клинических образцах.

**Лекция 8. Методы ПЦР**

Начало молекулярной диагностике было положено в конце восьмидесятых годов с развитием ПЦР. Хотя этот метод является наиболее широко используемым методом амплификации нуклеиновых кислот, были клинический образец, снижающий ложноположительные результаты из-за перекрестного загрязнения; кроме того, разработка количественных анализов более надежна.

ПЦР позволяет синтезировать миллионы копий целевой последовательности нуклеиновых кислот. Эта химическая реакция происходит благодаря действию ДНК-полимеразы, которая может копировать нить ДНК. ПЦР состоит из смеси ДНК-мишени, двух олигонуклеотидных праймеров, ДНК-полимеразы, смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (DNTP), MgCl2, KCl и буфера Трис-HCl. The Реакционная смесь нагревается и охлаждается в течение нескольких циклов в программируемом термоциклере, и после *n* циклов целевая последовательность может быть усилена в 2nраз. После ПЦР-реакции of следует определить продукт амплификации с помощью нескольких методов (например, гель-анализ, колориметрическое обнаружение).

**Лекция 9. Методы амплификации на основе транскрипции**

В эту группу входят два метода: амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA) и амплификация, опосредованная транскрипцией (TMA). Это изотермические методы амплификации РНК, моделируемые после ретровирусной репликации. В обоих методах цель РНК реверсно транскрибируется в кДНК, а затем копии РНК синтезируются с помощью РНК-полимеразы. Системы амплификации на основе транскрипции обладают рядом характеристик, таких как отсутствие необходимости в термоциклере, быстрая кинетика и одноцепочечный продукт РНК, который не требует денатурации до обнаружения. Gen-Зонд разработал анализы на основе ТМА для обнаружения ВГС и ВИЧ-1, в то время как наборы на основе NASBA (bioMérieux) разработали коммерчески доступные наборы для обнаружения и количественного определения РНК ВИЧ-1 и РНК ЦМВ и обнаружения of РНК энтеровируса и респираторно-синцитиального вируса.

**Лекция10. Методы амплификации зонда**

Эти методы отличаются от тех, которые используют целевое усиление, в которых продукты усиления содержат только последовательность, присутствующую в исходных зондах. Некоторые примеры методов усиления зонда-это лигазная цепная реакция, технология циклического зонда и технология захватчика.

Анализы на *захватчиков* (Технологии третьей волны, Мэдисон, WS) основаны на методе амплификации зондов со специфическим распознаванием определенных структур ДНК с помощью кливазы, члена семейства ДНК-полимераз FEN-1. В этих анализах разработаны два праймера, которые гибридизируются с целевой последовательностью. Для обнаружения продуктов расщепления можно использовать несколько методов, но наиболее распространенным используемым методом являются зонды резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) и вторая инвазивная реакция расщепления для обнаружения целевых продуктов. ЛАД возникает из-за взаимодействия между электронно-возбужденными состояниями двух молекул красителя. Датчики ЛАДЫ-это пара флуоресцентных зондов, расположенных в непосредственной близости. The Возбуждение передается от одной dye молекулы красителя к другой без испускания фотона. The Флуорофор-акцептор излучает свет, который обнаруживается в определенных каналах. В настоящее время эта технология доступна для HCV генотипирования HCV.

Анализ *лигазной цепной реакции* основан на лигировании двух соседних синтетических олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с одной нитью целевой ДНК. Вторая пара of праймеров используется в циклической реакции с использованием термостабильной лигазы ДНК. Оба лигированных продукта могут затем служить шаблонами для следующего цикла реакции, приводя к экспоненциальному процессу амплификации, аналогичному ПЦР-амплификации. Обнаружение продукта лигазной цепной реакции может быть выполнено с помощью нескольких методов, таких как авторадиография и флуоресценция. Одним из преимуществ флуоресцентной системы обнаружения является то, что относительно легко определить количество продукта лигазной цепной реакции. Также используются другие методы обнаружения продуктов лигазной цепной реакции в пластинах микротиттера. LCR Тесты LCR были разработаны для обнаружения таких вирусов, как ВПЧ, ВПГ и ВИЧ.

Технология *циклического зондирования* - это метод обнаружения и количественного определения малых количеств целевой ДНК. Реакция проводится при температуре, которая позволяет химерному зонду отжигать до одноцепочечной ДНК-мишени. РНКаза Н, фермент, который специфически разрушает часть РНК гибридов ДНК-РНК, разрезает часть РНК химерного зонда, и более короткие фрагменты зонда отделяются от мишени, регенерируя мишень для дальнейшего цикла. В результате может быть обнаружено скопление фрагментов зонда. Поскольку ДНК - мишень не амплифицируется, это техника показывает низкий фон. Кроме того, технология циклического зондирования является быстрой, линейной, изотермической и простой по сравнению с другими методами обнаружения ДНК.

**Модуль 3. Новые молекулярные тесты для вирусологической диагностики**

**Лекция 11. Микрочипы**

Массив ДНК (или ДНК-чип) представляет собой набор пятен, прикрепленных к твердой подложке, где каждое пятно содержит один или более одноцепочечных фрагментов олигонуклеотида ДНК. Массивы высокой плотности, которые позволяют присоединять сотни или тысячи олигонуклеотидов, называются микрочипами. Меченый продукт усиления гибридизируется с зондами, и сигналы гибридизации отображаются в нескольких положениях в массиве. По характеру гибридизации можно идентифицировать последовательность ПЦР, если количество зондов достаточно велико. Результаты гибридизации между связанным зондом и мечеными последовательностями в примененном и протестированном образце выявляются путем сканирования или визуализации поверхности массива. Конфокальная микроскопия используется для сканирования чипа, обнаруживая флуоресцентные сигналы, которые выявляют гибридизацию в точных местах на чипе. Поскольку на слайде может присутствовать множество последовательностей ДНК, анализ микрочипов позволяет одновременно проверять наличие нескольких вирусов.

Первым применением в диагностической вирусологии стало быстрое секвенирование для выявления мутаций ВИЧ, связанных с устойчивостью к антиретровирусным препаратам. С тех пор некоторые исследовательские группы разработали микрочипы, которые обнаруживают несколько вирусов, таких как респираторные вирусы, вирус гепатита С и вирус, вызывающий инфекцию ЦНС

**Лекция 12. Мультиплексированная матрица на основе микросфер**

Технологии суспензионных матриц на основе микросфер, такие как система Luminex ® xMAPTM, предлагают платформу для обнаружения нуклеиновых кислот, которая обладает рядом преимуществ, включая быстрый сбор данных, отличную чувствительность и специфичность, а также возможность мультиплексированного анализа. По сравнению с плоскими микрочипами, массивы суспензий обладают преимуществами of простоты использования, низкой стоимости, статистического превосходства, более быстрой кинетики гибридизации и большей гибкости при подготовке массива.

Эта система включает микросферы, окрашенные двумя спектрально различными флуорохромами. Создается массив, состоящий из 100 различных наборов микросфер с определенным спектром. Третий флуорохром количественно определяет биомолекулярное взаимодействие, которое произошло на поверхности микросферы. Микросферы проходят через отдельные лазеры в анализаторе Luminex. Высокоскоростная цифровая обработка сигналов классифицирует микросферу на основе ее спектрального сигнала и количественно оценивает реакцию на поверхности. Тысячи микросфер анализируются в секунду, в результате чего создается аналитическая система, способная анализировать и сообщать о множестве различных реакций. Анализ может быть использован в качестве прямой гибридизации ДНК, конкурентной гибридизации ДНК и химии на основе растворов с захватом микросфер.

Мультиплексный анализ для обнаружения и количественного определения вирусных нуклеиновых кислот с использованием этой системы был разработан для ВИЧ, ВГС и ВПГ с высокими специфическими результатами.

**Модуль 4. Внедрение молекулярных тестов в клиническую вирусологическую лабораторию**

**Лекция 13. Требования к персоналу**

Внедрение платформ молекулярных методов в клинической вирусологической лаборатории для диагностики требует определенных требований, таких как требования к персоналу и оборудованию, а также правильная организация рабочего процесса.

Лабораторные работники должны быть обучены как предварительному анализу (извлечение и обработка образцов), так и аналитическим процедурам. Специалисты, работающие в такого рода лабораториях, должны иметь соответствующую подготовку или опыт работы в молекулярные методы, а также должны обладать теоретическими знаниями в области молекулярной вирусологии. Большинство of производителей предоставляют обзорные презентации по молекулярной биологии, а также техническую информацию о своей конкретной платформе тестирования. Директор Вирусологической лаборатории должен обеспечить индивидуальное обучение молекулярной вирусологии для всех лабораторных работников для успешного выполнения правильного молекулярного тестирования. Очень важно уделять особое внимание строгому соблюдению стандартных операционных процедур (SOP) и избегать загрязнения образцов с использованием асептических методов.

В лаборатории должны быть доступны подробные СОП, учебные материалы и контрольные списки для каждой методики, выполняемой в лаборатории. В связи с этим фактом было бы очень важно, чтобы технический эксперт предоставил референтное лицо для применения этой методологии в клинической лаборатории. Разработанные в лаборатории тесты требуют наличия технических ресурсов для решения проблем, связанных с анализом, в лаборатории.

**Лекция 14. Требования к оборудованию**

Для того чтобы свести к минимуму или уменьшить риск загрязнения образцов, необходимо физическое разделение of процессов, а также наличие реагентов и оборудования для использования только в молекулярной лаборатории. Каждая лаборатория должна определить свои области работы, но, в общем, четыре разных рабочих зонах рекомендуется использовать реагент подготовка зона для приготовления ПЦР-микс, образец обработки области, где различные процедуры выполняются (например, нуклеиновая кислота, вытяжки), целевой нагрузки районе, где образец добавляется к ПЦР смеси Мастер и усиление уголок, где термоциклирования и зонд обнаружения выполнено.

В зоне подготовки реагентов не должно быть никаких образцов и экстрактов ДНК/РНК. Количество пробирок, которые следует открывать одновременно, должно быть минимальным, чтобы избежать перекрестного загрязнения между различными образцами. Важным вопросом является то, что различные устройства, используемые при ПЦР, такие как пипетки, пробирки, реагенты, должны быть предназначены исключительно для каждой рабочей зоны. Реагенты должны быть приготовлены и аликвотированы в одноразовом или небольшом объеме.

Все рабочие поверхности следует очищать до и после каждого использования реагентом, устраняющим нуклеиновую кислоту. При очистке инструментов, обрабатывающих блоков и других поверхностей и деталей приборов необходимо соблюдать рекомендации производителей.

Перчатки следует часто менять, по крайней мере, перед началом каждой процедуры, и их всегда следует менять при переходе из одной рабочей зоны в другую.

**Лекция 15. Проектирование рабочего процесса**

После выбора и успешного внедрения платформы молекулярного тестирования в вирусологическую лабораторию рабочий процесс должен осуществляться одновременно с внедрением этой технологии. Основные факторы для создания эффективного рабочего потока определяются временем прибытия of образцов, количеством образцов каждого теста, клинической срочностью результатов и функциональностью лаборатории. Каждая лаборатория должна устанавливать свой собственный рабочий процесс в зависимости от каждой методики и каждого определения вируса, поэтому этот факт должен быть индивидуализирован.