

Primena i značaj molekularno bioloških tehnika u mikrobiološkoj dijagnostici

Asist. dr Danijela Miljanović
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet u Beogradu

Molekularno biološke tehnike

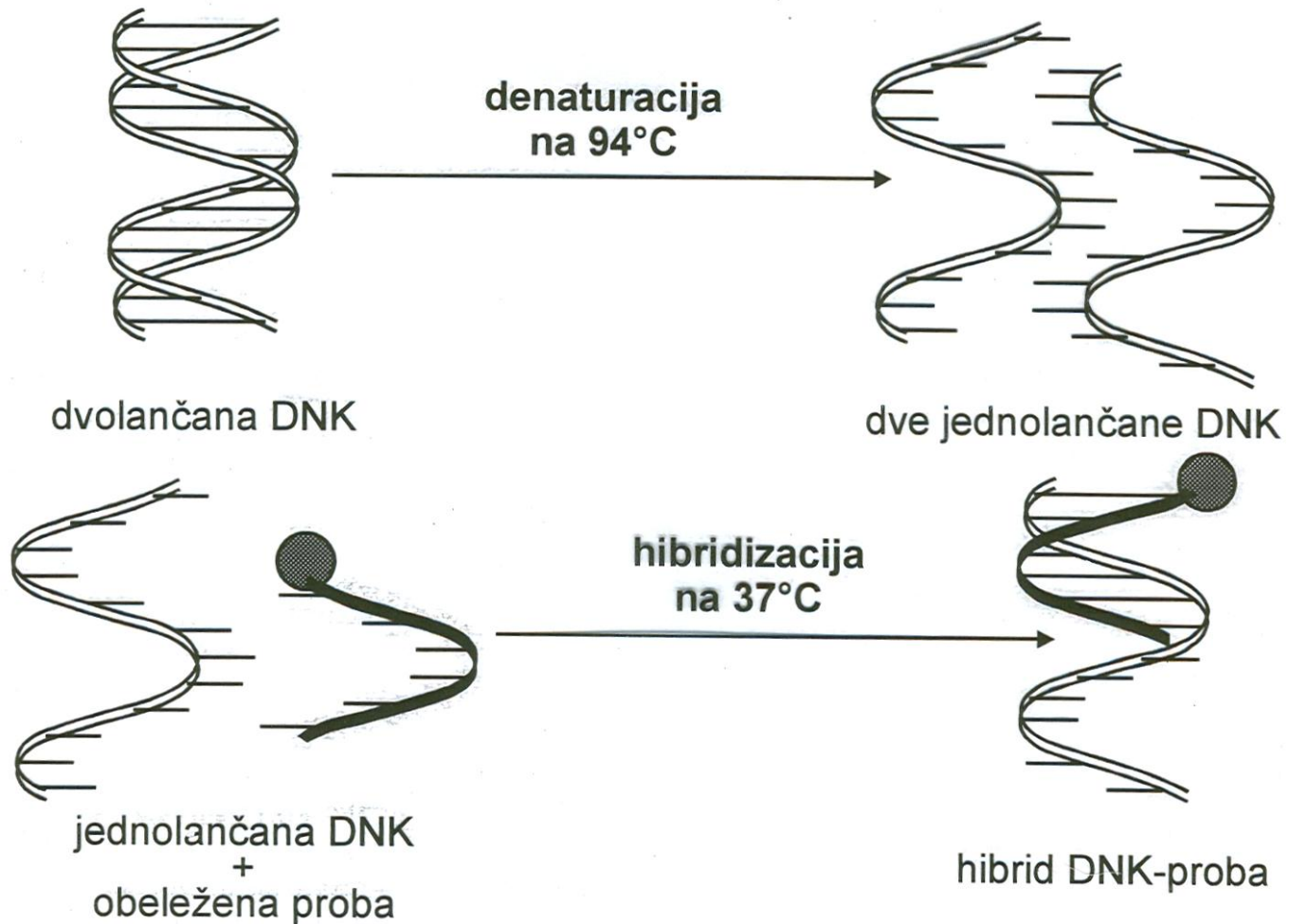
Koje se najčešće primenjuju u dg oboljenja izazvanih infektivnim agensima su:

- **Hibridizacija**
- **PCR** (*engl. polymerase chain reaction*) - reakcija lančanog umnožavanja
 - **Real Time PCR (RTQ PCR)**
- **Sekvenciranje nukleinskih kiselina**



Hibridizacija

HIBRIDIZACIJA NUKLEINSKIH KISELINA

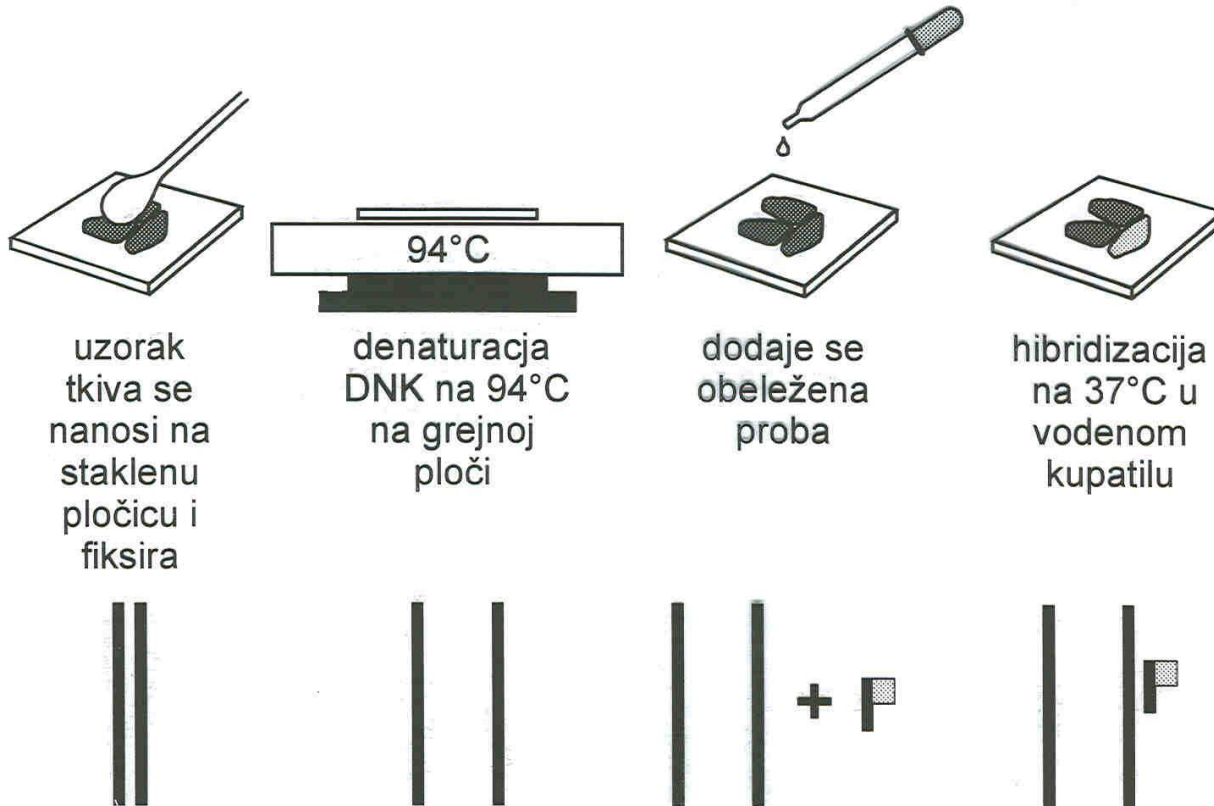


Hibridizacija *in situ*

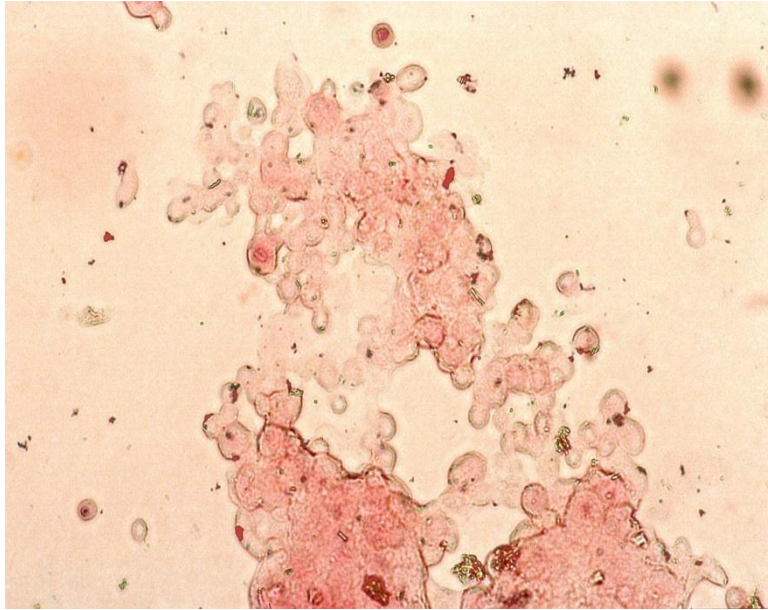
Dokazivanje nukleinske kiseline infektivnih agenasa direktno u:

- svežim tkivima
- razmazima svežih ćelija
- histopatološkim preparatima (fiksiranim formalinom i ukalupljenim u parafin)

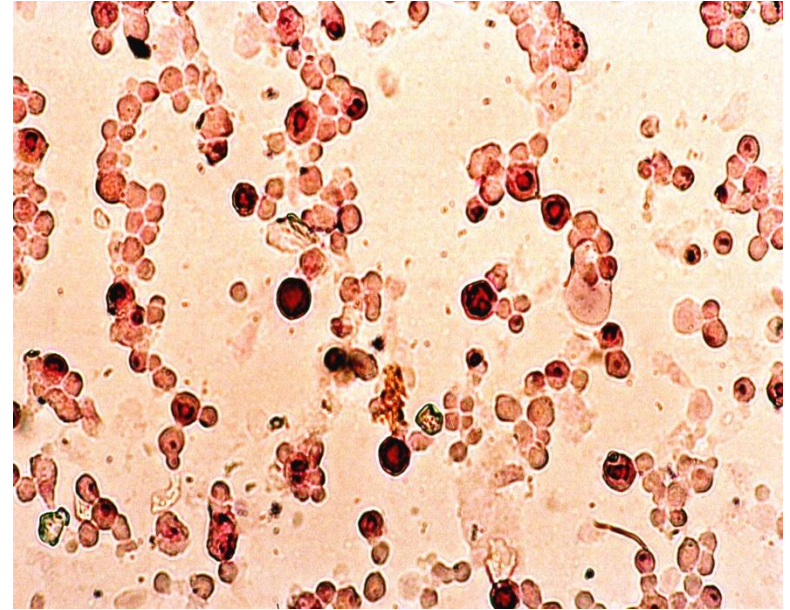
In situ hibridizacija



In situ hibridizacija - HPV



Negativan nalaz



Pozitivan nalaz

Skrining testovima u dijagnostici HPV infekcije **dokazuje se prisustvo virusa**, dok se testovima za **tipizaciju** dokazuju HPV tipovi (nisko i visoko onkogeni).

Napomena: danas se za dokazivanje DNK HPV i tipizaciju pre svega koriste PCR i metoda sekvenciranja

PCR

Reakcija lančane polimerizacije (*engl. polymerase chain reaction, PCR*) je tehnika za enzimsko umnožavanje DNK fragmenata in vitro.



Komponente PCR reakcije

- Voda
- Pufer
- DNK uzorak
- Nukleotidi (dNTPs)
- Mg²⁺ joni
- DNK polimeraza
- Prajmeri



Komponente PCR reakcije

□ **Voda**

- predstavlja medijum za sve ostale komponente
- sterilna, dejonizovana



□ **Pufer**

- obezbeđuje adekvatnu hemijsku sredinu za PCR reakciju
- stabilizuje DNK polimerazu, DNK i nukleotide



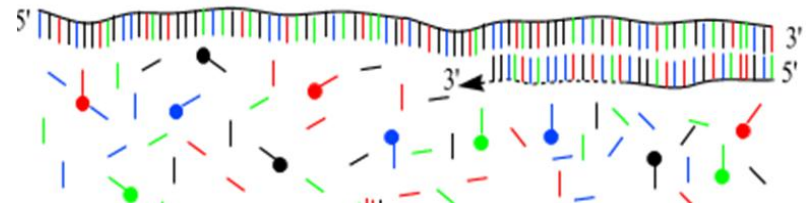
Komponente PCR reakcije

□ DNK uzorak

- sinonim matrica ili template
- sadrži DNK region (*target*) koji se amplifikuje

□ Nukleotidi

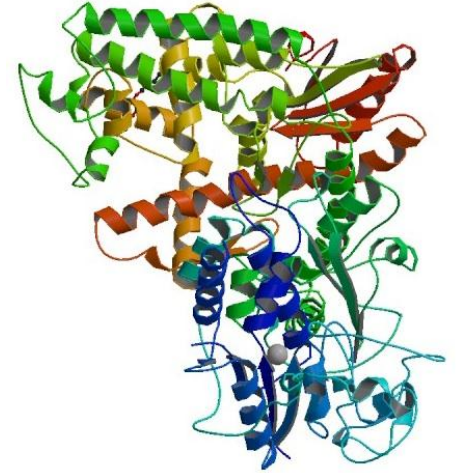
- gradivni materijal (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- neophodni za umnožavanje DNK lanca



Komponente PCR reakcije

□ DNK polimeraza

- enzim koji omogućava ekstenziju DNK lanca
- termostabilna DNK polimeraza
- izolovana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*
- optimalna temperatura 72°C



Komponente PCR reakcije

☐Magnezijum

- Mg^{2+} joni esencijalni kofaktor DNK polimeraze
- stabilizuje DNK heliks

☐Prajmeri

- oligonukleotidi (dužine15-30nukleotida)
- specifični za određeni region koji ograničavaju (konzervirani deo genoma)
- treba da imaju sličan C/G sastav i dužinu

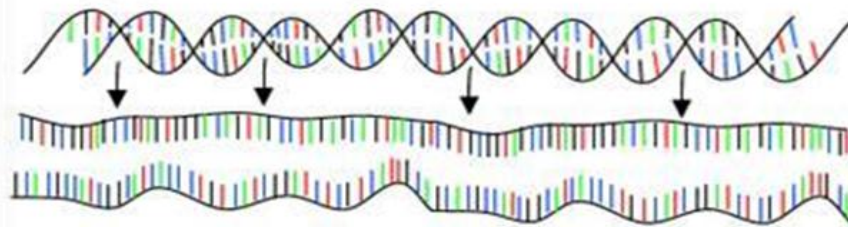


Please...just send the Taq. No more little tubes of magnesium!



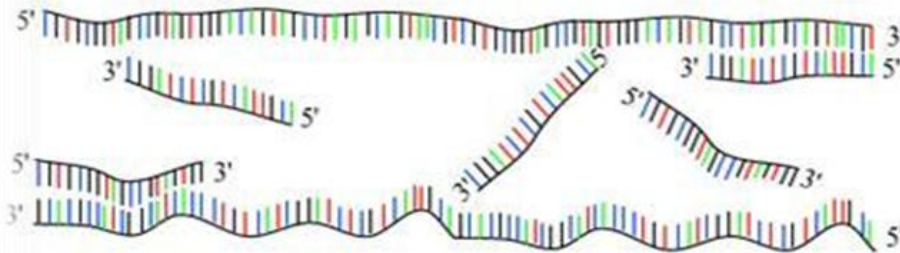
Etape PCR ciklusa

30-40 ciklusa u 3 koraka:



Korak 1 - Denaturacija

1 minut na 94C



**Korak 2 - Vezivanje
prajmera**

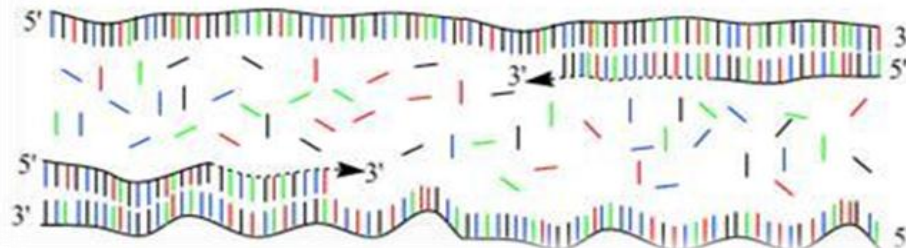
45 sekundi na 54C

Forward prajmer

5' - 3'

Reverse prajmer

5' - 3'



Korak 3 - Ekstenzija

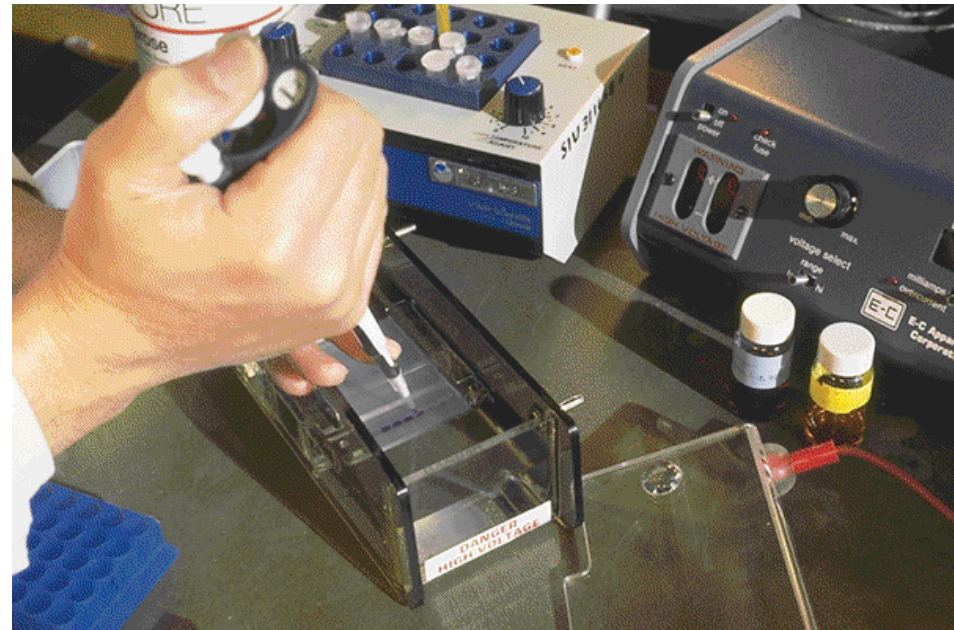
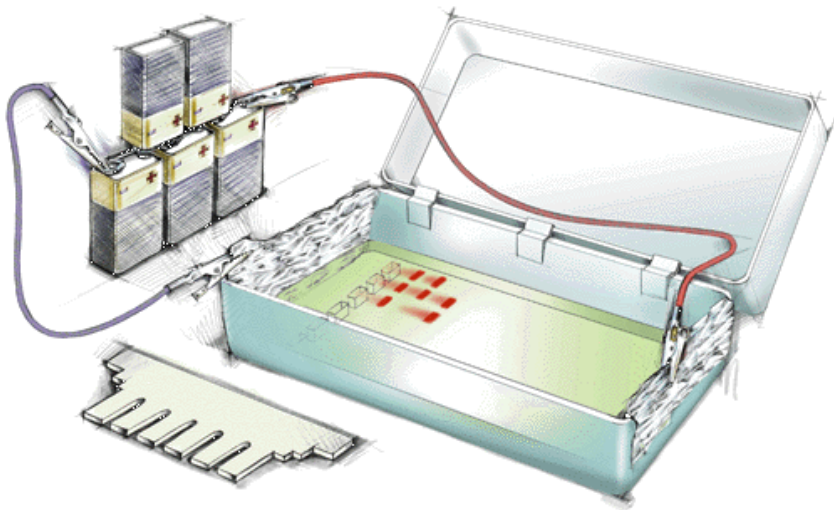
2 minuta na 72C

**Taq polimeraza
dNTPs**

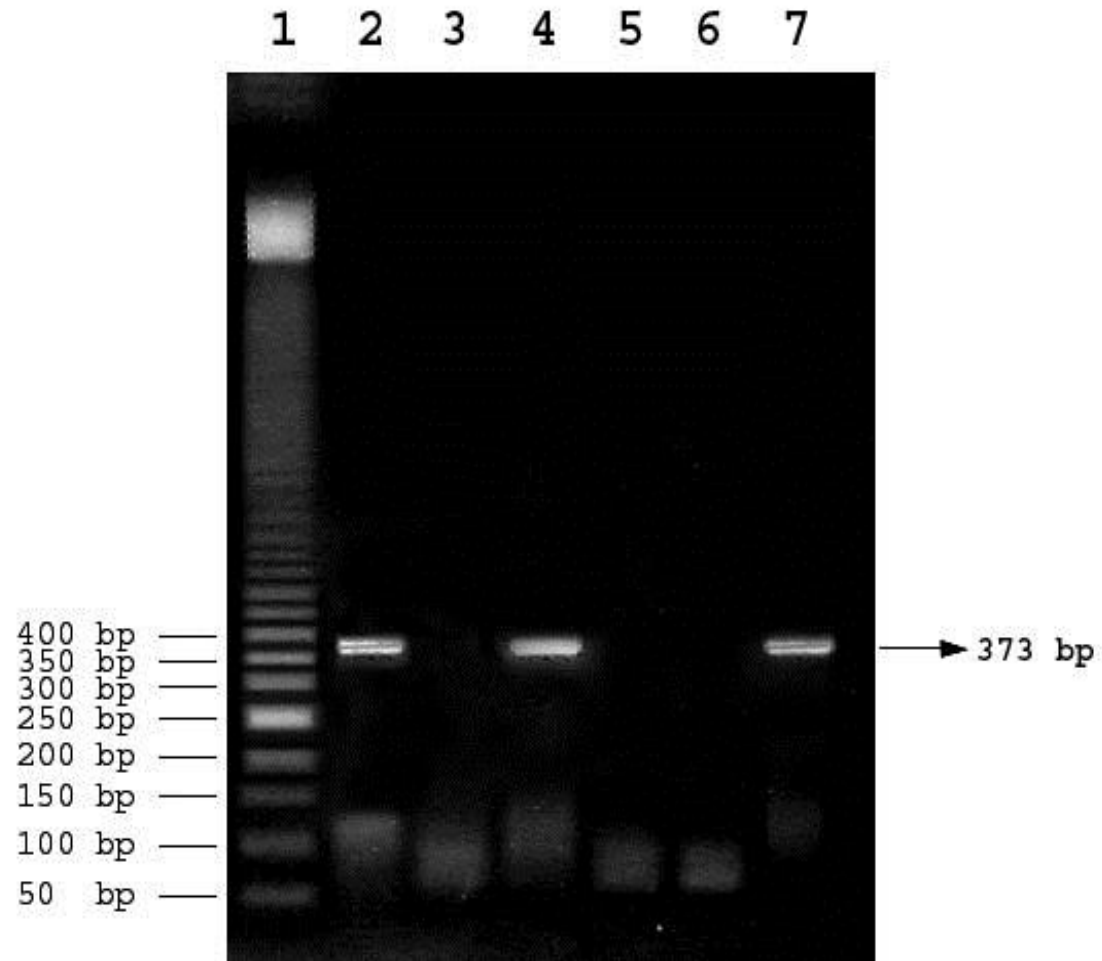
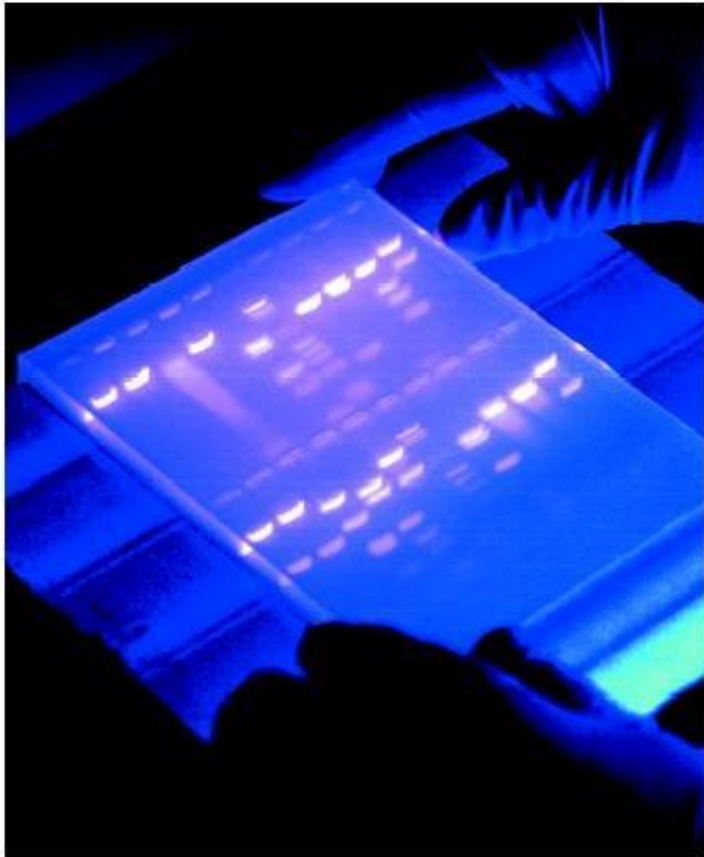
PCR Demo

Elektroforeza u gelu

Detekcija i identifikacija umnoženog ciljnog DNK fragmenta
na osnovu veličine



Elektroforeza u gelu

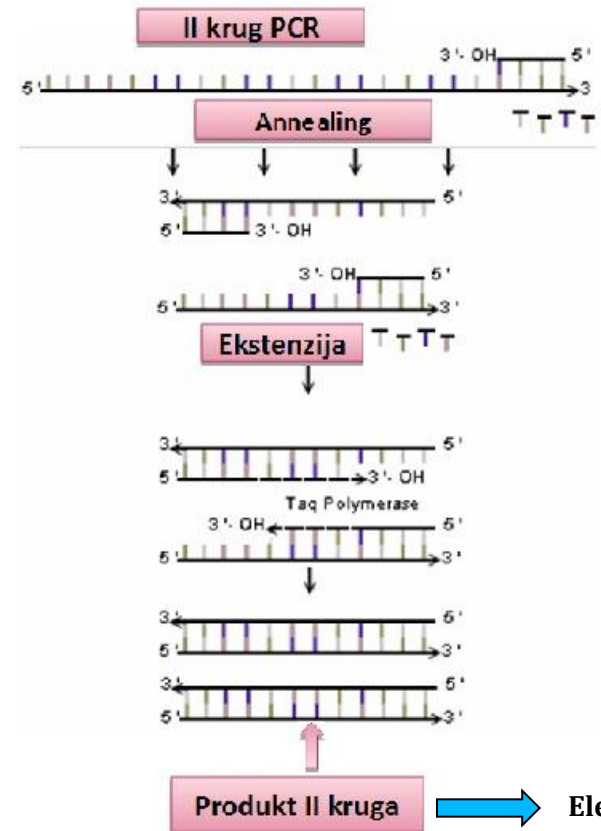
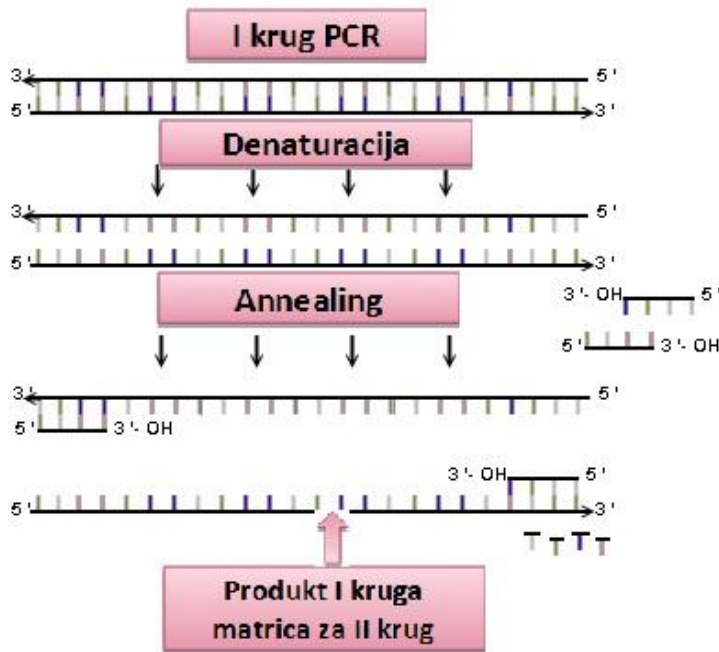


Modaliteti PCR

- Nested PCR
- Multiplex PCR
- RT PCR (reverse transcription) – umnožavanje RNK
- PCR sa reverznom hibridizacijom
- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- ...

Nested PCR

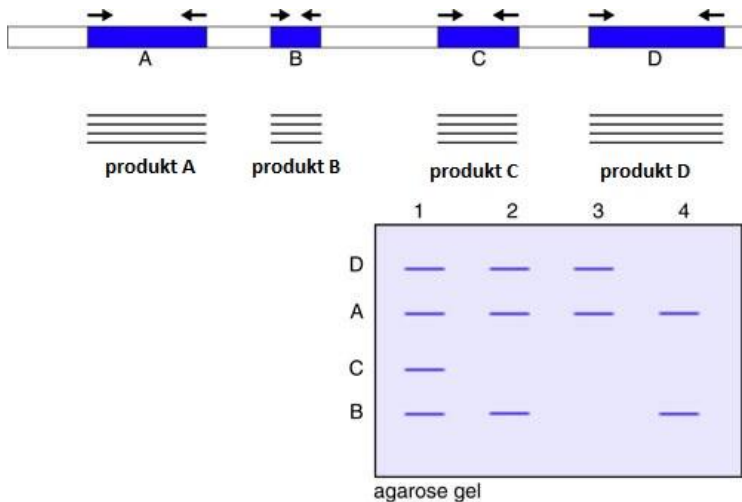
- **dve sukcesivne PCR reakcije** (produkt prvog kruga je matrica za sledeću PCR reakciju)
- **dva kompleta prajmera** (prajmeri za drugi krug PCR se nalaze unutar sekvence koju ograničavaju prajmeri iz prvog kruga PCR-a)
- povećan rizik od kontaminacije



Elektroforeza

Multiplex PCR

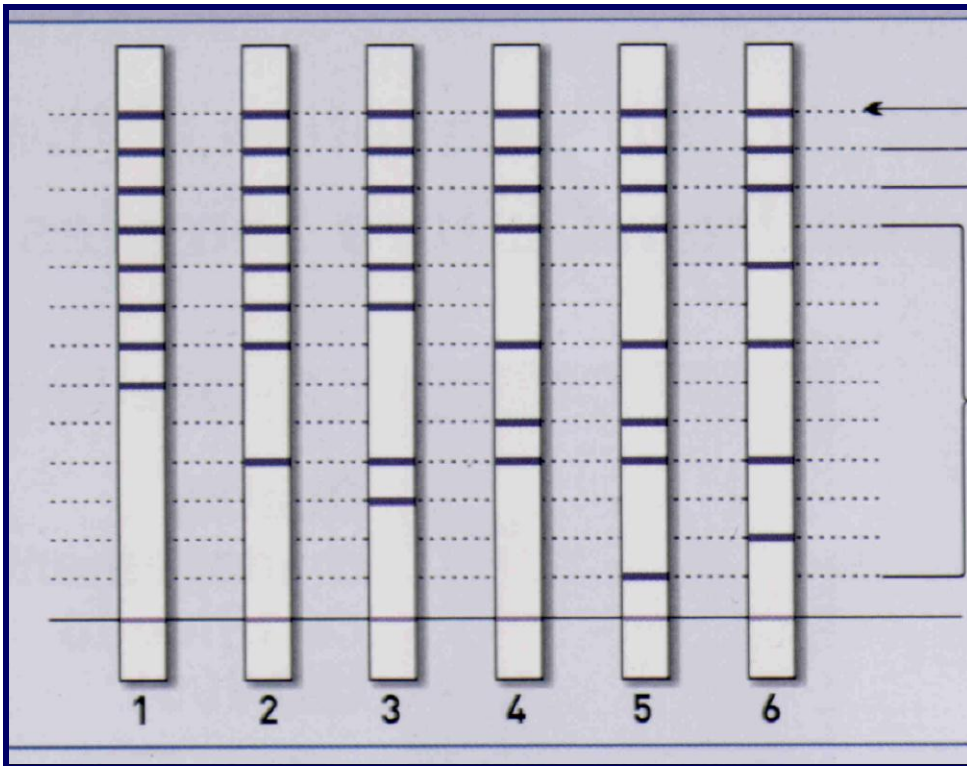
- PCR reakcija **simultanom primenom višestrukih parova prajmera**
- za svaki par prajmera po jedan produkt



- ekonomično (ušteta i materijala i vremena)
- brzo i zgodno za rad
- simultana detekcija nekoliko mikroorganizama u jednom uzorku tokom jedne PCR reakcije**

PCR sa reverznom hibridizacijom

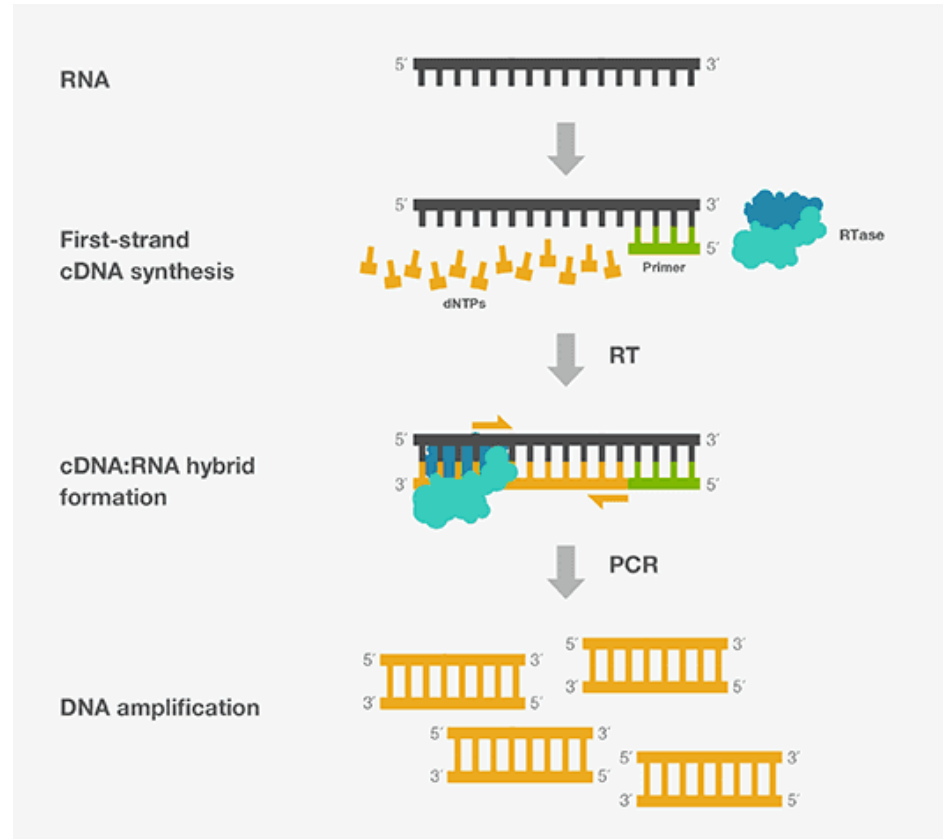
- Ekstrakcija DNK iz kulture ili uzorka
- Multipleks PCR sa prajmerima obeleženim biotinom
- Reverzna hibridizacija PCR produkata za probe fiksirane na membrani
- Kolorimetrijska detekcija hibridizovanih amplikona



1. *M. tuberculosis*
2. *M. africanum*
3. *M. microti*
4. *M. bovis ssp. bovis*
5. *M. bovis* BCG
6. *M. bovis ssp. caprae*

RT PCR

- umnožavanju RNK
- značajnu primenu u virusologiji
- za dijagnostiku RNK virusa
- tako i u određivanju ekspresije gena infektivnih agenasa, detekcijom njihovih iRNK



Primena PCR metode u dg virusnih oboljenja

- Virusnih infekcija CNS-a (HSV, VZV, mumps, enterovirusi (coxsackievirus, poliovirus, echovirus)
- Kongenitalnih virusnih infekcija (CMV, Rubella, VZV...)
- Virusnih infekcija respiratornog i gastrointestinalnog trakta (influenza virus (H1N1....), SARS-CoV, Norwalk virus, Rotavirus...)
- Virusnih infekcija imunokompromitovanih pacijenata (CMV, EBV, BK, JC)
- U dijagnostici HIV, HBV, HCV, ...

jedan od glavnih dg metoda koja se koriste u lab dg virusnih oboljenja

Primena PCR metode u dg bakterijskih oboljenja

Brza dijagnostika u uzorku (komercijalno dostupni testovi):

- *M. tuberculosis*
- *C. trachomatis*
- *N. gonorrhoea*
- *H. pylori*
- *S. aureus*
- *C. difficile* (bakterija i toksini)
- ...

Geni rezistencije

- MRSA
- *M. tuberculosis*
- ...

Primena PCR metode u dg mikoloških i parazitoloških oboljenja

PCR testovi :

- dokazivanje dermatofita u strugotinam nokatne ploče

Real time PCR :

- *Pneumocystis jirovecii*
- *Toxoplasma gondii*

STD multiplex PCR

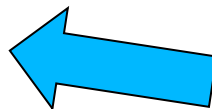
- **Trichomonas vaginalis** + najčešći bakterijski i virusni uzročnici

komercijlno
dostupni
testovi ;

široka
primena

Koriste se i za dokazivanje nukleinske kiseline:

- *Plasmodium* spp.
- *Leishmania* spp.
- *Trypanosoma cruzi*,
- *Entamoeba histolytica*,
- ...



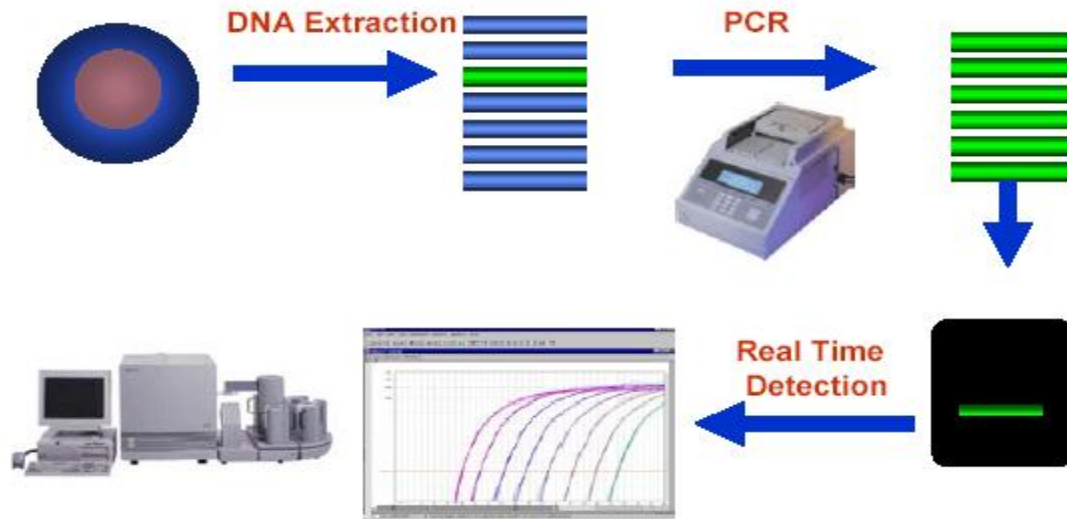
Napomena: PCR u dg parazitskih oboljenja još uvek u začetku; vise za istraživanje; nema još uvek masovne u rutinske primene u kliničkim laboratorijama

Kvantitacija nukleinskih kiselina *in vitro*

- Najčešće u perifernoj krvi (može i likvor, urin, ...)
 - određuje se broj kopija nukleinske kiseline u ml uzorka
- Molekurna tehnika koja se koristi za **kvantitaciju** infektivnih agenasa je **Real Time PCR (RTQ PCR)**
- **Termin viral load (viremija) u virusologije**
 - *broj kopija virusne nukleinske kiseline/ml



Kvantitacija nukleinskih kiselina *in vitro*



Praćenje PCR reakcije u realnom vremenu

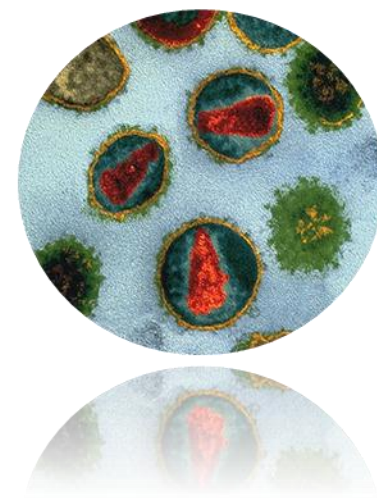
RTQ PCR \neq RT PCR



Značaj kvantitacija nukleinskih kiselina u virusologiji

Za praćenje pacijenata:

- u posttransplantacionom periodu (CMV, BKV, HSV, EBV, VZV, HHV-6...) za predviđanje nastanka aktivne infekcije i praćenje uspeha terapije
- HIV pozitivnih, pre i u toku terapije (praćenje uspeha terapije)
- HCV, HBV pozitivnih, u toku i posle terapije (praćenje uspeha terapije)



Značaj sekvenciranja

Sekvenciranje je određivanje redosleda nukleotida u molekulu DNK.

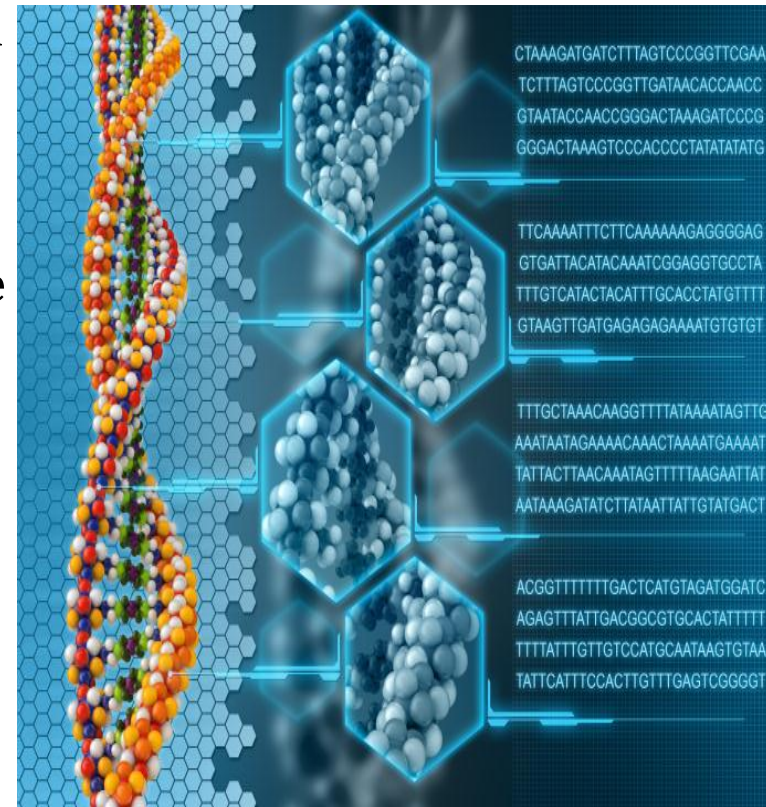
Primena metode sekvenciranja u rutinskom radu u dijagnostici:

- genotipizacija HPV
- određivanje rezistencije na antivirusne lekove (HIV, HBV, HCV)
- genotipizacija HCV –uticaj na izbor terapije

Ogroman značaj metode pre svega u istraživačkom radu:

- za praćenje molekularno epidemiološke situacije
- otkrivanje genotipova, subtipova
- novih mutacija
- klonova
- izolata
- ... u celokupnoj mikrobiologiji

NGS – next generation sequencing





HVALA NA PAŽNJI