

Современные методы диагностики инфекционных заболеваний *in vitro*

Екатерина Майорова,
микробиолог отдела внедрения новых технологий
НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород
24/05/2020

Клиническая диагностика инфекционных заболеваний

- Эпидемиологический анамнез
 - Анамнез больного
 - Базисные лабораторные исследования
 - ✓ Общеклиническое исследование крови
 - ✓ Биохимические исследования
 - **Специальные лабораторные исследования**
 - ✓ Бактериологические исследования
 - ✓ Серологические исследования
 - ✓ Молекулярная диагностика
 - ✓ Кибер-молекулярная диагностика
- Диагностика in vitro

Эволюция методов диагностики инфекционных заболеваний

- **Бактериологические исследования**

- ✓ Бактериоскопия

- ✓ Выделение бактериальной культуры

- Серологические исследования

- Молекулярная диагностика

- Кибер-молекулярная диагностика

Бактериологические исследования



Бактериоскопия



Выделение бактериальной культуры (посев)

Эволюция методов диагностики инфекционных заболеваний

- Бактериологические исследования
- **Серологические исследования**

✓ Выявление антигенов

✓ Выявление антител

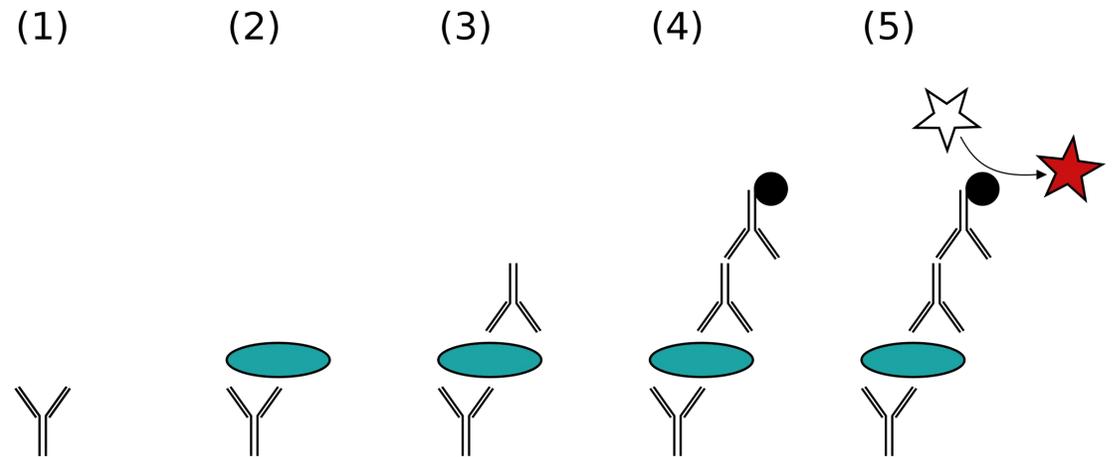
- Молекулярная диагностика
- Кибер-молекулярная диагностика

Серологические исследования



Иммуноферментный анализ (ИФА)

- Выявление антигенов
- Выявление антител



Серологические исследования



**Выявление антител:
антигены в твёрдой
фазе**

**Выявление антигенов:
антитела в твёрдой фазе**

Эволюция методов диагностики инфекционных заболеваний

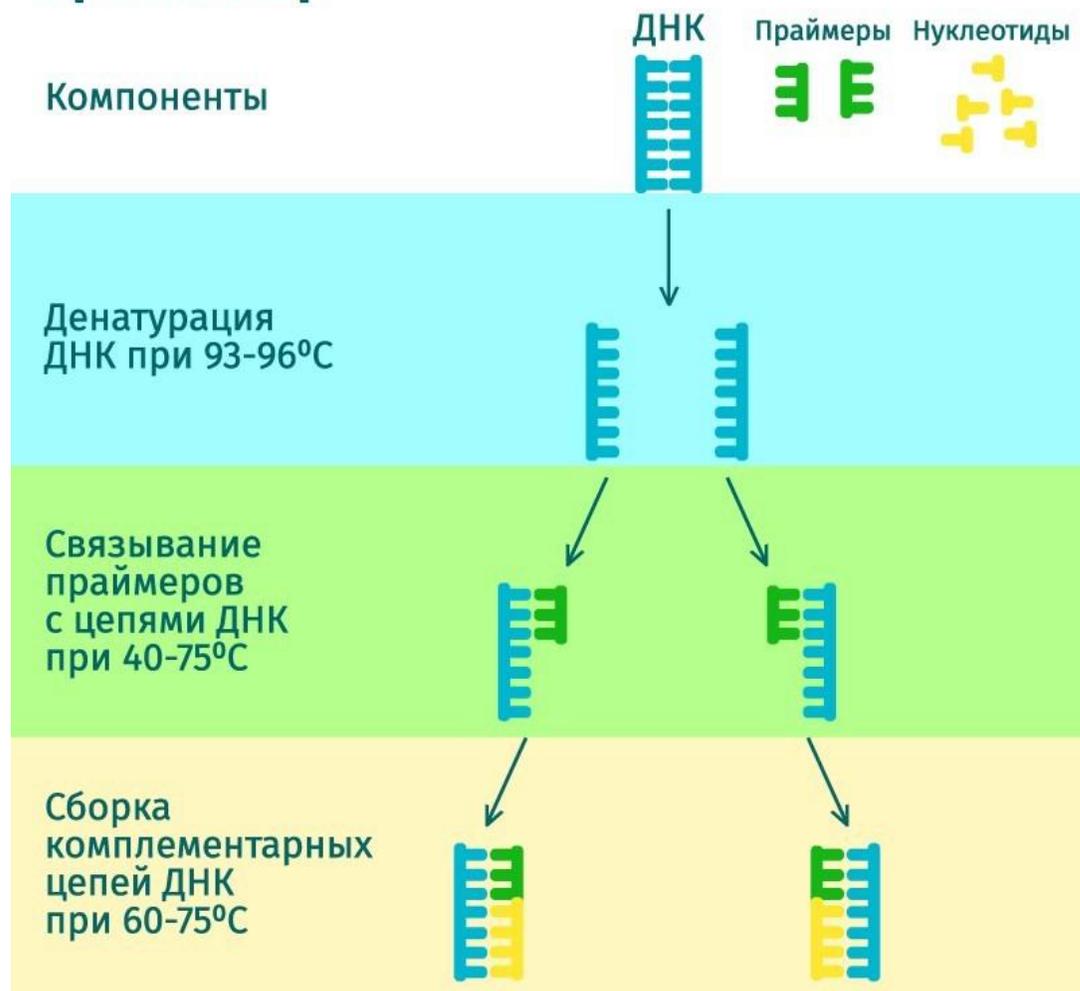
- Бактериологические исследования
- Серологические исследования
- Молекулярная диагностика
- ✓ ПЦР-диагностика
- ✓ Секвенирование
- ✓ Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)
- Кибер-молекулярная диагностика

Молекулярная диагностика

ПЦР-диагностика

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction) – метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце.

Цикл ПЦР



Молекулярная диагностика

Секвенирование

Секвенирование нуклеиновых кислот — определение их нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность).

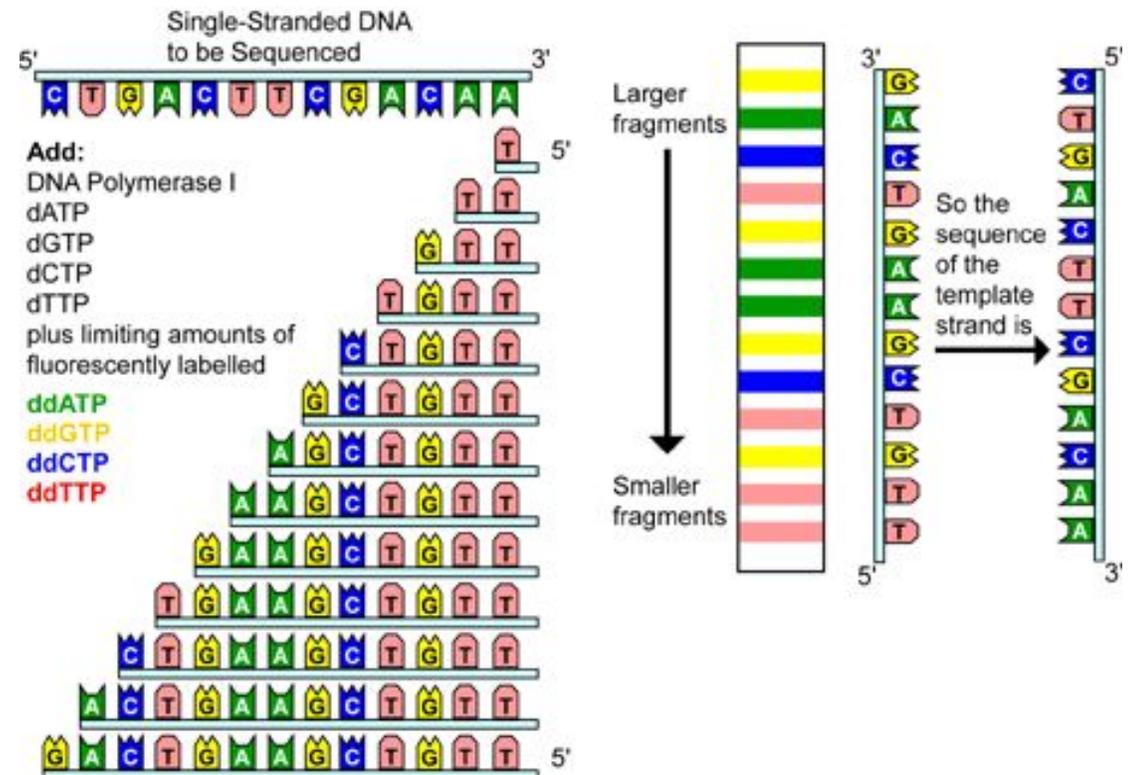
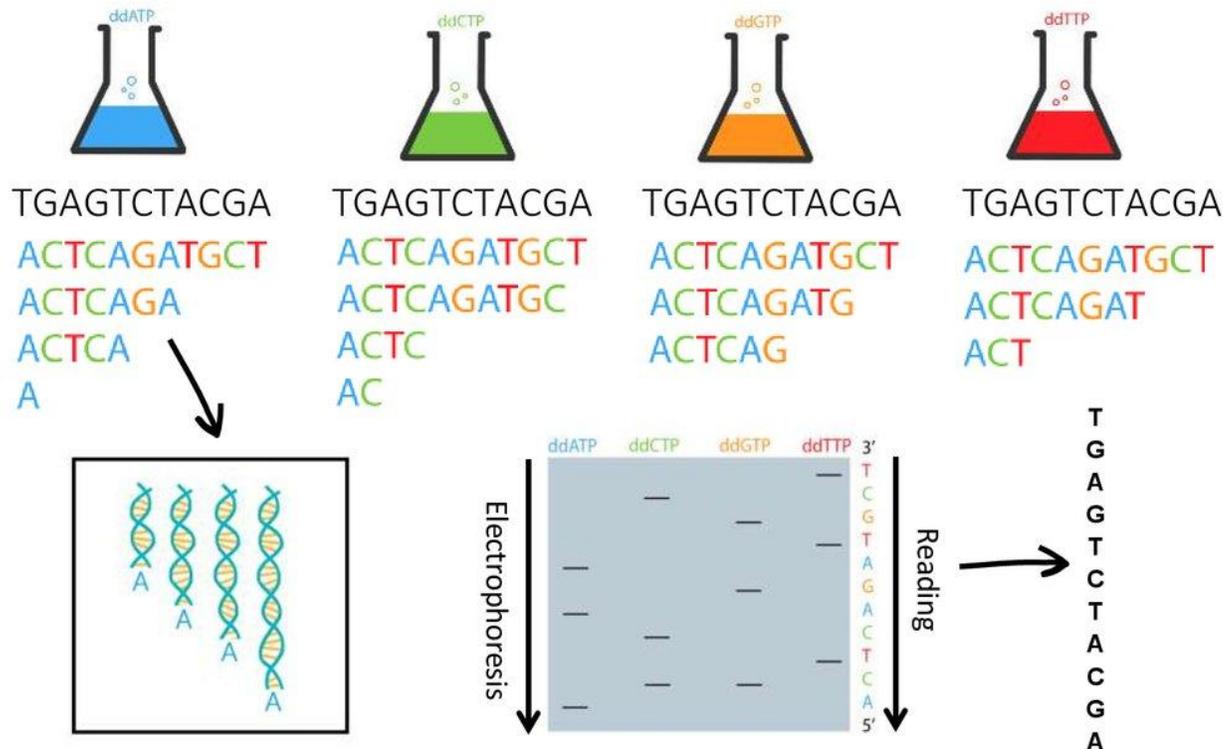
В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде.

- I поколение: секвенирование по Сэнгеру (метод обрыва цепи)
- II поколение: массовое параллельное секвенирование (NGS)
- III поколение: одномолекулярное секвенирование

Молекулярная диагностика

Секвенирование по Сэнгеру

Результаты реакции обрыва цепи



Эволюция методов диагностики инфекционных заболеваний

- Бактериологические исследования
- Серологические исследования
- Молекулярная диагностика
- **Кибер-молекулярная диагностика**

Кибер-молекулярная диагностика

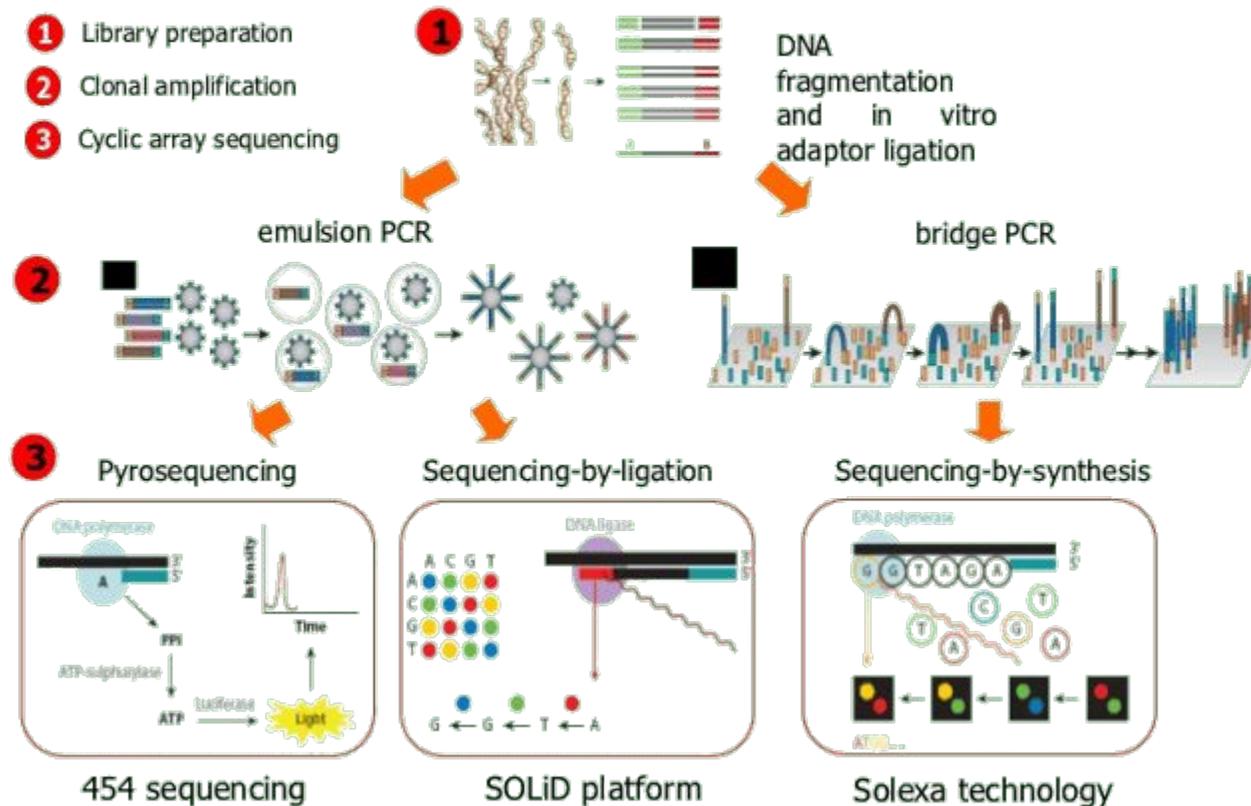
Массовое параллельное секвенирование (NGS)

Массовое параллельное секвенирование / секвенирование нового поколения / глубокое секвенирование (англ. next generation sequencing, **NGS**) — группа методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры, которые позволяют «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома.

Кибер-молекулярная диагностика

Массовое параллельное секвенирование (NGS)

Next-generation DNA sequencing



Кибер-молекулярная диагностика

Массовое параллельное секвенирование (NGS)

Особенности массового параллельного секвенирования:

- Позволяет установить последовательности **миллионов** фрагментов ДНК (РНК) за один цикл
- ✓ Исследование микробиоты
- ✓ Эволюция вирусов
- ✓ Клиническая генетика
- ✓ Онкология

Кибер-молекулярная диагностика

Массовое параллельное секвенирование (NGS)

Особенности массового параллельного секвенирования:

- Выходные данные представлены в виде текстового файла (в файле формата .fastq)
- ✓ Огромный объём данных
- ✓ Возможность работы с данными средствами программирования
- ✓ Возможность автоматизации обработки данных

Кибер-молекулярная диагностика

Массовое параллельное секвенирование (NGS)

Особенности массового параллельного секвенирования:

Как выглядит файл формата .fastq?

```
Identifier — ● @SRR566546.970 HWUSI-EAS1673_11067_FC7070M:4:1:2299:1109 length=50
Sequence — ● TTGCCTGCCTATCATTTTAGTGCCTGTGAGGTGGAGATGTGAGGATCAGT
'+ sign — ● +
Quality scores — ● hhhhhhhhhghghghhhhhfhhhhhfffffe'ee['X]b[d[ed'[Y[~Y
Identifier — ● @SRR566546.971 HWUSI-EAS1673_11067_FC7070M:4:1:2374:1108 length=50
Sequence — ● GATTTGTATGAAAGTATACTAAACTGCAGGTGGATCAGAGTAAGTC
'+ sign — ● +
Quality scores — ● hhhhgfhhcghghggfcffdhehhhhcehdchhdhahehffffde'bVd
```

Кибер-молекулярная диагностика

Кибер-молекулярный тест

- Лабораторная часть (от подготовки образцов до получения данных секвенатора)
- Программная часть (автоматическая обработка результатов секвенирования)

Приятный бонус: результаты одного и того же секвенирования можно обрабатывать в разных программных алгоритмах

Кибер-молекулярная диагностика

Кибер-молекулярный тест

Возможное применение

- Исследование микробиоты (заменяет традиционные бактериологические методы)
- Исследование эволюции вирусов (реконструкция цепей передачи заболевания)
- Определение влияния вирусов на организм (заменяет ИФА и ПЦР методы)

Кибер-молекулярная диагностика

Кибер-молекулярный тест

Определение влияния вирусов на организм

Использовать данные, записанные в ДНК человека

- ✓ Участки, кодирующие рецепторы В-клеток
- ✓ Митохондриальная ДНК

Поиск маркёров методом data mining

Автоматизация обработки данных

Молекулярная диагностика в России

Организации, занимающиеся разработкой молекулярных методов

ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск, Московская область)

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов)

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» (Москва)

ФБУН Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург)

ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» (Смоленск)

Молекулярная диагностика в России

Организации, занимающиеся разработкой молекулярных методов

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)

АО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Кольцово, Новосибирская область)

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (Нижний Новгород)

ООО НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород)

Спасибо всем и успехов!