**Слайд 1**

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В ДЕТСКОЙ ПРАКТИКЕ ДЛЯ ДИНАМИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ ЗА БОЛЬНЫМИ И КОРРЕКЦИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ**

**Е.С. Казанцева,**

**врач КДЛ ЦПАО БУЗОО «ОДКБ»**

**Слайд 2**

В 1983 году Кэри Мюллис с сотрудниками разработал метод клонирования последовательностей ДНК in vitro, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР). Открытие ПЦР явилось одним из самых выдающихся событий в сфере молекулярной биологии и дало новый качественный скачок в диагностике многих заболеваний, в том числе инфекционных.

ПЦР – метод амплификации, т.е. получения большого числа копий нужного гена или его фрагмента в условиях in vitro.

**Слайд 3**

Достоинства метода ПЦР:

* среди методов диагностики инфекционных возбудителей ПЦР обладает наиболее высокими показателями чувствительности и специфичности (для Ампли-Сенс ПЦР-систем – 1000 микроор-мов/1 мл);
* возможность использования разнообразного клинического материала;
* возможность одновременного выявления нескольких микроорганизмов в одной биологической пробе, в отличие от бактериологических методов, где для разных возбудителей используются разные способы культивирования;
* возможность стандартизации методик

**Слайд 4**

* повышенная стабильность при транспортировке, т.к. нет необходимости сохранять возбудителя в живом виде;
* скорость проведения анализа (иногда < 24 ч.);
* точное определение этиологии инфекции;
* определение количества возбудителя, это особенно актуально для условно-патогенных микроорганизмов, которые вызывают патологию только при определенных условиях;
* проведение контроля за течением инфекционного процесса.

С другой стороны, метод ПЦР, как и любой другой тест молекулярной диагностики, во многом зависит от правильности забора и транспортировки исследуемого материала.

**Слайд 5**

По данным статистики (Статистический бюллетень Федеральной Службы Государственной Статистики, 2014г.) количество умерших от инфекционных заболеваний в 2013-14гг составило более 23 тысяч случаев. Именно метод ПЦР в настоящее время получил широкое распространение как метод диагностики различных инфекционных заболеваний. ПЦР позволяет выявлять этиологию инфекции, даже если в пробе содержится всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР широко используется для ранней диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, клещевого энцефалита, туберкулеза, венерических заболеваний и т.д. Большое значение метод имеет в расшифровке младенческой смертности от инфекционных заболеваний.



Этот метод имеет большое значение для мониторинга и оценки эффективности терапии, особенно при вирусных заболеваниях. Определение «вирусной нагрузки» позволяет осуществить индивидуальный подбор дозы противовирусных препаратов. При помощи ПЦР удается выявить отдельные субтипы и штаммы вирусов и бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к тем или иным лекарственным препаратам.

**Слайд 6**

ПЦР-лаборатория ЦПАО БУЗОО «ОДКБ» открыта в 2007 г. на базе централизованного патологоанатомического отделения ОДКБ. Обслуживает патологоанатомическое отделение, 14 отделений стационара ОДКБ, в т.ч. отделение переливания крови; поликлинику. Ежегодно обследуется более 2тыс. детей (в т.ч. биопсии), более 70 аутопсий.

**Слайд 7**

Задачи лаборатории - выявление различных инфекционных агентов в клиническом материале (кровь, моча, слюна, мазки, фекалии, смывы и др.); биопсийном материале, секционном материале, парафиновых блоках. Спектр исследований включает в себя более 30 возбудителей, имеющих значение в детской практике. Далее рассмотрим лишь несколько примеров этиологической расшифровки заболеваний на базе ПЦР-лаборатории ОДКБ.

**Слайд 8**

Молекулярный подход является наиболее информативным при диагностике внутриклеточных паразитов и медленнорастущих микроорганизмов, требующих сложных условий культивирования, например, возбудителей туберкулеза – Mycobacterium tuberculosis. Развитие туберкулезной инфекции вызывают 4 вида микобактерий (Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum и Mycobacterium microti), поэтому в последние десятилетия интенсивно развиваются молекулярно-генетические методы диагностики туберкулеза, определения лекарственной устойчивости и типирования штаммов микобактерий туберкулеза. К тому же в педиатрии актуально выявление вакцинных штаммов туберкулеза.

**Слайд 9**

Клинические примеры:

1. Пациент Д…., 3года. Давность болезни 3 мес.

*Из какого органа взята биопсия:* костный детрит и секвестры

*Клинический диагноз :* БЦЖит, остит левой большеберцовой кости? ТВС левой большеберцовой кости?

*Микроскопически:* некротические массы, окруженные лимфоцитарным инфильтратом, наличие многоядерных гигантских клеток.

*Результаты ПЦР исследования:* методом ПЦР выделена ДНК вакцинного штамма М. bovis BCG.

**Слайд 10**

1. Пациент З…., 2года.

*Из какого органа взята биопсия:* ПЖК, детрит

*Клинический диагноз:* туберкулез подкожной клетчатки нижней трети правого бедра.

*Микроскопически:* некротические массы, окруженные лимфоцитарным инфильтратом, наличие многоядерных гигантских клеток, встречаются формирующиеся гранулемы с отсутствием некрозов, местами специфический инфильтрат расположен диффузно без формирования гранулем.

*Результаты ПЦР исследования:м*етодом ПЦР выделена ДНК вакцинного штамма М. bovis BCG.

**Слайд 11**

Большое диагностическое значение имеет также выявление вируса Эпштейна-Барр. Известно, что у части больных классической лимфомой Ходжкина выявлена латентная EBV-инфекция, при этом H/RS- клетки содержат EBERs и экспрессируют латентный мембранный протеин-1 и EBNA1, а самая высокая частота EBV-латентности в H/RS- клетках выявляется у больных СПИД-обусловленной классической лимфомой Ходжкина(90%) и смешанно-клеточном варианте классической лимфомы Ходжкина (70%), самая низкая – при нодулярном склерозе (10-40%).

**Слайд 12**

Клинический пример: Пациент Р…., 12лет. Давность заболевания- с 17.02.16г

*Из какого органа взята биопсия:* лимфоузел

*Клинический диагноз :* ЛГМ?Лимфома? Лимфаденит?

*Микроскопически:* скопления опухолевых клеток с участками некрозов, участки разрастания соединительной ткани. Опухолевые клетки имеют морфологию клеток Рид-Штернберга.

*Результаты ПЦР исследования: м*етодом ПЦР выделена ДНК EBV.

**Слайд 13**

Внутриутробные инфекции также являются предметом исследования ПЦР-лаборатории, речь идет, в первую очередь, о ТОRCH-инфекциях. Актуальность проблемы обусловлена широкой распространенностью потенциальных возбудителей среди всех групп населения, бессимптомным течением или отсутствие патогномоничных клинических симптомов, высоким риском развития патологии плода при первичном инфицировании матери и возможностью обострения латентной инфекции у иммунокомпрометированных женщин во время беременности.

**Слайд 14**

Клинические примеры:

1. Пациент С…., 1 мес.

*Клинический диагноз:* Внутриутробная инфекция. НЭК 4ст. ГИП ЦНС. БЛД.

*Микроскопически:* очаговые скопления лимфоцитов в подслизистом пространстве стенки тонкой кишки, лимфоидные инфильтраты интерстиция поджелудочной железы, гигантоклеточная трансформация альвеолоцитов.

*ПЦР-исследование* ДНК СМV обнаружена в в ткани легкого, в ткани ОСЖ; в ткани тонкой кишки.

**Слайд 15**

1. Пациент Л…., 2 мес.

*Клинический диагноз:* Внутриутробная инфекция.

*Микроскопически:* гигантоклеточный сиалоаденит, панкардит, энцефалит, менингит, интерстициальный нефрит с гигантоклеточной трансформацией эпителия канальцев, очаговый альвеолит, перибронхит, гепатоспленомегалия, гепатит, панкреатит.

*ПЦР-исследование*

* Прижизненно: ДНК СМV обнаружена в моче, венозной крови (количественный анализ в крови- 12778 копий на 200000 клеток или 4.1 lg, количественный анализ в слюне- 4,73Е+09 копий/мл)
* Аутопсийный материал количественный анализ в ткани легкого- 5.04 lg; количественный анализ в ткани ОСЖ- 6.87 lg; количественный анализ в ткани селезенки- 4.34 lg; количественный анализ в ткани тонкой кишки- 3.86 lg;

Данный пример иллюстрирует значение определения количества ДНК ЦМВ в крови для диагностики манифестной ЦМВИ.

**Слайд 16**

Структура обнаружения возбудителей группы герпес-вирусных инфекций на базе нашей лаборатории такова: СМV-45.5%, EBV- 28.6%, ННV VI- 19.7.% . Хотелось бы остановиться на случаях выявления вирус герпеса VI типа, который выявляется в аутопсийном материале как изолированно, так и в ассоциации с другими возбудителями

**Слайд 17**

Клинические примеры: Пациент Л…., 16лет.

*Клинический диагноз :* Сепсис криптогенный.

*Микроскопически:* лимфоаденопатия со стиранием гистоархитектоники, наличием единичных фолликулов без светлых центров, убылью лимфоцитов, оголением стромы, наличием крупных многоядерных клеток; гепатит с участками некроза, инфильтрацией лимфоцитами, иммунобластами, гистиоцитами, макрофагами; холецистит, панкреатит, крупноклеточная пневмония, эзофагит, миокардит.

*ПЦР-исследование* ДНК HHV VI обнаружена в ткани лимфоузлов; в ткани тонкой кишки.

**Слайд 18**

ПЦР-лаборатория ЦПАО ОДКБ имеет опыт обнаружения возбудителя в архивном материале (фиксированный в формалине материал, парафиновые блоки). Метод имеет большое диагностическое значение, особенно в случаях, когда архивный материал является единственным источником для исследования.

**Слайд 19**

Клинические примеры:

1. Пациент Т…., м/р.

*Клинический диагноз :* ВПР.

*Микроскопически:* продуктивный виллузит, скопление клеток гемопоэза и глиоцитов периваскулярно перивентрикулярно в веществе головного мозга. Очаги некроза головного мозга с перифокально расположенными массивными пылевидными и глыбчатыми кальцинатами. Кальцинаты эпендимы.

*ПЦР-исследование* ДНК CMV обнаружена в материале из парафиновых блоков головного мозга.

**Слайд 20**

1. Пациент С…., м/в.

*Клинический диагноз :* ВПР-омфалоцеле.

*Микроскопически:* нарушение гистоархитектоники надпочечников, определяются крупные клетки с эозинофильной цитоплазмой и крупным гиперхромным ядром

*ПЦР-исследование* ДНК HHV VI обнаружена в материале из парафиновых блоков надпочечников.

**Слайд 21**

1. Пациент Ш…., 2ч.

*Клинический диагноз:* Гипоксия плода ВУИ.

*Микроскопически:* выраженная дистрофия гепатоцитов, балочное и дольковое строение отсутствует, скопления лимфоцитов в строме и портальных трактов, крупные многоядерные гепатоциты.

*ПЦР-исследование* ДНК Parvovirus B19 обнаружена в материале из парафиновых блоков печени.

**Слайд 22**

Таким образом, опыт ПЦР-лаборатории ЦПАО ОДКБ показывает эффективность метода в диагностике инфекционных заболеваний в педиатрии на различном материале при работе с различными возбудителями.

**Слайд 23**

Три пути ведут к знанию: путь размышления — это путь самый благородный, путь подражания — это путь самый легкий и путь опыта — это путь самый горький. (Конфуций)

**Слайд 24**

**Спасибо за внимание!**