

Типовые ошибки при диагностике методом полимеразной цепной реакции

Все большее развитие получает лабораторная диагностика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря своей скорости и высокой чувствительности. Однако, несмотря на простоту и удобство метода, существует ряд условий, невыполнение которых может привести к получению недостоверного или ложного результата.

На сегодняшний день ПЦР-анализ является одной из наиболее распространенных и динамично развивающихся технологий лабораторной диагностики. Ежегодно на рынке появляется все больше тест-систем, предназначенных как для выявления возбудителей различных заболеваний, так и для выявления мутаций генов человека, животных и растений. Количество ПЦР-лабораторий неуклонно увеличивается, а ПЦР-анализ становится все более востребованным среди специалистов и пациентов.

Простой на первый взгляд метод имеет ряд "подводных камней", с которыми так или иначе приходится сталкиваться практически каждому специалисту лаборатории. К различным ошибкам могут приводить как отсутствие опыта в использовании данной методики, так и стереотипы мышления персонала, ранее работавшего в биохимических или бактериологических лабораториях, где иные требования к работе. В результате таких ошибок могут быть получены ложноположительные, ложноотрицательные или недостоверные результаты анализов.

С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во

время проведения ПЦР-анализа, - прежде всего, связанные с нарушением правил взятия, хранения и транспортировки клинического материала. Однако при диагностике могут допускаться и другие ошибки, которые могут быть не замечены сотрудником КДЛ при анализе результатов.

Все ошибки, допускаемые в лабораторной практике, можно разделить на три класса:

- ошибки преаналитического этапа;
- ошибки аналитического этапа;
- ошибки постаналитического этапа.

Ошибки преаналитического этапа ПЦР-диагностики

Операции преаналитического этапа ПЦР-диагностики выполняются вне ПЦР-лабораторий, однако ошибки, допускаемые на этом этапе, оказывают едва ли не самое существенное влияние на результат исследования. Большинство этих ошибок невозможно определить в ходе исследования и, следовательно, существенно возрастает риск получения ложного результата. В связи с этим, необходима совместная работа с различными подразделениями ЛПУ по разработке алгоритма взятия биоматериала и контроль его выполнения.

Взятие биологического материала.

Первой и самой существенной ошибкой преаналитического этапа ПЦР-диагностики является неправильный выбор места взятия биологического материала для исследования. Поскольку метод ПЦР является прямым, т. е. позволяет непосредственно выявить причину заболевания, в данном случае обнаружить патогенный микроорганизм, то биоматериал необходимо брать непосредственно в месте предполагаемой локализации инфекционного процесса. Исследование некоего "универсального материала", как например кровь, не позволит определить наличие в организме патогена во всех случаях за исключением тех, при которых возбудитель локализован именно в крови. В первую очередь это относится к патогенам, которые могут поражать многие органы и ткани, таким как, например, *Chlamydia trachomatis* или *Mycobacterium tuberculosis*.

Chlamydia trachomatis могут поражать эпителий слизистой оболочки урогенитального тракта, эпителий конъюнктивы глаза и синовиальной полости. Следовательно, при подозрении на урогенитальный хламидиоз материалом для исследования должен служить соскоб из урогенитального тракта, при поражении

глаз у новорожденного — соскоб из конъюнктивы глаза, при хламидийном артрите — пунктат синовиальной жидкости.

Mycobacterium tuberculosis могут поражать практически любой орган и ткань организма человека, т. е. материал для исследования не должен быть одним и тем же при разных формах патологического процесса.

Таким образом, если у ребенка хламидиоз глаз, а для исследования взят образец из урогенитального тракта, а при туберкулезе почек для исследования берется мокрота, отрицательный результат не будет исключать факта инфицирования пациента.

Вторая ошибка на преаналитическом этапе, - неправильное взятие материала на исследование.

Общими требованиями к биологическому материалу являются максимальная концентрация микроорганизмов в образце, а также отсутствие нежелательных примесей, ингибирующих ПЦР.

Например, *Chlamydia trachomatis* - облигатные внутриклеточные паразиты, следовательно, исследуемый материал должен содержать большое количество клеток эпителия (4). То есть, при взятии материала для выявления этих микроорганизмов необходимо делать соскоб, а не мазок, поскольку в мазке *Chlamydia trachomatis* не будут обнаружены, даже если находятся в организме в значительном количестве.

При взятии материала из урогенитального тракта необходимо избегать ингибирующих примесей, таких как слизь, кровь или гной. Для этого соскобы берут не ранее, чем через два часа после мочеиспускания, у женщин учитывают дни цикла (1). Избыток слизи или гноя необходимо удалить стерильным ватным тампоном непосредственно перед взятием биоматериала. Забирать материал желательно специальными пластиковыми зондами, что снижает вероятность появления крови в образце, к тому же они в отличие от ватных не сорбируют транспортную среду и исследуемый материал. (1)

Обработка биологического материала

Правильное взятие урогенитального соскоба - процедура болезненная для лиц мужского пола и детей, поэтому для исследования можно использовать первую порцию утренней мочи, содержащую максимальное количество эпителия (1) В последующем для работы необходимо получить клеточный осадок мочи. Однако осадок содержит большое количество солей и мочевины, которые, при

использовании технологий флуоресцентной детекции, денатурируют зонды, что может привести к ложноположительным результатам. Поэтому клеточный осадок мочи необходимо в обязательном порядке промывать физиологическим раствором (4)

Следующая ошибка преаналитического этапа - неправильная обработка взятой крови. Для предотвращения свертываемости крови в процессе доставки необходимо использовать антикоагулянты. Во многих лабораториях в качестве антикоагулянта используется гепарин. Однако гепарин достаточно сильно ингибирует ПЦР, и, независимо от используемой тест-системы и способа пробоподготовки, все результаты для образца, его содержащего, окажутся недостоверными в случае наличия внутреннего контроля ПЦР или отрицательными, независимо от реального положения вещей, в случае, если внутреннего контроля нет (3)

Хранение биологического материала

Необходимо помнить о температуре хранения биологического материала, а также сроках и способах его доставки в ПЦР-лабораторию в случае, если транспортировка требует значительного времени. При нарушении сроков хранения или транспортировки биоматериала ДНК или РНК возбудителя может разрушаться, что приведет к ложноотрицательным результатам. Образцы рекомендуется хранить при температуре от 2 до 8 оС в течение нескольких часов, для более длительного хранения необходимо замораживание. (1) Единственное исключение - кровь, поскольку цельную кровь замораживать нельзя! Необходимо получить плазму и уже ее замораживать. (5) Заморозка должна быть однократной, в противном случае происходит разрушение нуклеиновых кислот. (5)

Ошибки аналитического этапа ПЦР-диагностики

Ошибки в работе

Ошибки аналитического этапа, как правило, связаны с невнимательным чтением инструкции, прилагаемой к набору для проведения ПЦР-анализа.

Одной из таких ошибок является неправильный выбор системы пробоподготовки. Менее опасно применение экспресс-методов для сложных биоматериалов — таких как, например, плазма крови, потому что в этом случае наиболее вероятно получение недостоверных результатов из-за оставшихся в пробе ингибиторов ПЦР, что в свою очередь, вынудит специалиста КДЛ повторить

эксперимент и выяснить причину неудачи. Гораздо опаснее, если из-за неправильно выбранной тест-системы в процессе пробоподготовки теряется часть или вся ДНК или РНК возбудителя - в этом случае есть риск получения ложноотрицательного результата.

Вторая ошибка - неправильно приготовленные фоновые пробирки для тест-систем с флуоресцентной детекцией по конечной точке. Чаще всего это связано с тем, что сотрудник лаборатории забывает их менять при появлении новой серии реактивов или не делает этого из соображений экономии. Возможно, что одни и те же компоненты реакционной смеси едва ли будут иметь различный уровень флуоресценции, однако в разных сериях реактивов могут отличаться концентрации компонентов и высока вероятность различного уровня флуоресценции. Таким образом, ошибка, которую в некоторых случаях можно не заметить, в других может дать большое количество недостоверных результатов.

Еще одной ошибкой, связанной с неправильным приготовлением фоновых пробирок, является добавление в них полимеразы. Это может произойти как случайно, так и вследствие того, что лаборант не до конца понимает, почему полимеразу добавлять не нужно. Здесь могут быть два варианта развития событий: если в тест-систему не входит внутренний контроль или в качестве отрицательного контрольного образца используется буфер не прошедший выделения, и если в тест-систему входит внутренний контроль, который находится под парафином и/или отрицательный образец проходит стадию выделения. В первом случае добавление полимеразы может существенно не сказаться на результате, однако и в этом случае есть риск контаминации как положительным, так и внутренним. Во втором случае все отрицательные значения оказываются недостоверными. Обнаружить ошибку не представляется проблемой, поскольку нормировочные значения оказываются очень высокими, близкими к 10^3 , а значения флуоресценции в некоторых пробирках - существенно ниже 1.

Контаминация

Проблема контаминации возникает при неправильной организации лаборатории или при неаккуратном обращении с положительными образцами. Так, при использовании гель-электрофореза в качестве метода детекции, комната для его проведения обязательно должна иметь отдельный вход и систему вентиляции. В противном случае вероятность того, что ампликоны из открывающихся пробирок

будут попадать в другие помещения, очень высока. Это может привести к тому, что со временем все больше исследуемых образцов на часто встречающиеся инфекции будут оказываться положительными. При этом на первых этапах такого загрязнения отрицательный контроль может оставаться чистым, поскольку появление ложноположительных результатов носит статистический характер.

В случае флуоресцентной детекции пробирки не открываются и теоретически вероятность контаминации близка к нулю, однако возможность ее открытия не исключена. Поэтому лучше, если амплификация и детекция будут проводиться в отдельной комнате, тогда в случае непредвиденной ситуации контаминированная окажется одна комната.

Еще одна ошибка, приводящая к контаминации образцов, связана с неаккуратным обращением как с клиническими пробами, так и с положительными контрольными образцами и стандартами. Некоторые специалисты лаборатории с целью экономии при внесении в большое количество пробирок одного и того же вещества используют один наконечник. Это нормально, если пробирки пустые или их содержание одинаково (подготовка амплификационных пробирок). Однако, если в пробирке находится образец, как, например, при пробоподготовке, то при внесении даже одного и того же раствора в разные пробирки увеличивается риск переноса ДНК между пробирками - так называемая кросс-контаминация. С целью предотвращения кросс-контаминации так же рекомендуется для внесения образцов, потенциально содержащих ДНК, использовать наконечники с фильтрами.

Помимо этого при неаккуратной работе есть риск внести в пробу ингибиторы (например, тальк с перчаток).

Ошибки при интерпретации результата

Говоря об ошибках при интерпретации результатов, имеет смысл рассмотреть различные способы детекции.

При детекции с использованием гель-электрофореза есть риск принять неспецифические фрагменты за специфичные, если они близки по длине и нет возможности четко и однозначно сравнить положительным контролем и, в идеале, с маркером длин. Также, поскольку образцы часто наносятся на гель одним наконечником, существует риск контаминации уже на этапе детекции, если наконечник плохо промывался или одна из проб оказалась с очень высокой концентрацией ДНК. Такого рода контаминация легко отслеживается в случае, если

полоса наблюдается в заведомо отрицательной пробе, однако она неотличима от контаминации в лаборатории и требует повторной проверки всех образцов.

Одной из ошибок интерпретации, связанных с использованием метода флуоресцентной детекции по конечной точке, является невнимательное отношение к нормировочным значениям фоновых пробирок и к значениям флуоресценции в отрицательных пробах. Так, при неправильном хранении зонды в фоновых пробирках могут разрушаться, и нормировочные значения существенно увеличиваются за срок от нескольких часов до нескольких дней, при этом значения флуоресценции в образцах оказываются в большей или меньшей степени занижены. Главным критерием достоверности полученных результатов в данном случае могут служить отрицательные пробы. При отсутствии расхождений между фоновыми и амплификационными пробирками отрицательные образцы имеют значения флуоресценции близкие к единице или, в редких случаях, чуть выше. Если значения флуоресценции в одном или нескольких образцах или отрицательном контроле существенно ниже единицы, с большой долей вероятности можно утверждать, что фоновые пробирки не соответствуют данному исследованию, в этом случае необходимо их поменять.

Помимо вышеприведенного примера, может случиться так, что фоновая флуоресценция возрастает в амплификационных пробирках, в то время как в фоновых пробирках флуоресценция остается неизменной. Такая ситуация может возникнуть, когда амплификационные пробирки хранятся при комнатной температуре. В этом случае будет увеличиваться содержание положительных результатов с низкими значениями флуоресценции. Результаты при этом поучаются такие же как при контаминации в лаборатории, однако в данном случае все низкие значения флуоресценции будут примерно одинаковы, что в случае контаминации встречается достаточно редко, поскольку маловероятно, что во все отрицательные пробирки попадет равное количество постороннего материала. Подобного легко избежать, если менять фоновые пробирки раз в месяц-полтора, в этом случае, как правило, не успевают появиться достаточно большая разница между уже готовыми фоновыми и амплификационными пробирками.

Наиболее частая ошибка при исследовании методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени связана с прибором, который при больших колебаниях флуоресценции может зафиксировать ложноположительные

результаты. В связи с этим необходимо проводить анализ индивидуальной кривой. Пороговая линия должна пересекать индивидуальную кривую в области начала экспоненциального роста, и это не один из множества пиков колебания флуоресценции. Также прибор может выдать ложноотрицательный результат в случае, если на первых циклах ПЦР по каким-то причинам произошло существенное уменьшение флуоресценции. Эту ошибку можно обнаружить при анализе исходных кривых флуоресценции. Если образец положительный, то на исходной кривой будет виден четкий экспоненциальный рост. Для большей достоверности можно сравнить такую сомнительную кривую с кривой заведомо положительной. Все положительные кривые имеют сходный угол наклона и уровень флуоресценции при выходе на плато заметно отличается от колебаний в отрицательных образцах.

Ошибки постаналитического этапа ПЦР-диагностики

Ошибки на завершающем, постаналитическом этапе, связаны с неверной интерпретацией врачом результатов ПЦР-анализа вследствие ошибочных представлений об инфекционном агенте или о возможностях метода.

Например, контрольное исследование на хламидиоз через 1 неделю после окончания курса антибиотиков даст положительный результат. Врач сделает вывод о неэффективности проведенной терапии. Однако окончательный вывод можно сделать не ранее чем через 4-6 недель, после того как сменится эпителиальный слой, в котором паразитирует данный микроорганизм (1) Более ранняя диагностика может показать неверный результат, поскольку в клетках эпителия еще сохраняются погибшие микроорганизмы.

Важно учитывать специфичность используемых тест-систем. Так, например, пациент с предполагаемым диагнозом "респираторный хламидиоз" направляется на исследование. При постановке ПЦР используется видоспецифическая тест-система для выявления ДНК *S. Trachomatis* - результат исследования отрицательный. Однако врач не должен снимать предполагаемый диагноз, поскольку инфекция может быть вызвана другими видами хламидий, например *S. pneumoniae*, *S. pecorum*, *S. psittaci*, которые не диагностируются данной тест-системой. То есть при назначении ПЦР-исследования врач должен очень четко представлять границы специфичности применяемых тест-систем.

Вместе с тем не совпадение результатов различных методов исследования не говорит об ошибке. Зачастую ПЦР-исследование дает положительный результат, в то время, как ИФА - отрицательный, либо наоборот. Несовпадение результатов исследований может объясняться, например, периодом "серологического окна".

В случае обратных результатов исследований возможен "иммунологический след" - остаточный уровень антител, который у некоторых людей может сохраняться многие месяцы и даже годы после выздоровления, либо при проведении ПЦР не учитывается видоспецифичность тест-систем.

Приведенные примеры показывают, что необходима обратная связь между специалистами ПЦР-лаборатории и врачами-клиницистами, для осуществления точной диагностики в сложных случаях и выработки правильной стратегии лечения пациента.

литература:

1. А.А.Бонецкий, М.М.Таирова, Т.С.Кутукеев, А.И.Филипченко, А.С.Уголбаева «Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) в клинической практике. Методические рекомендации», Бишкек, 2000.
2. А.А. Ёлов, Н.А. Федоров, Е.Б. Жибурт «Универсальные технологии генотестирования донорской крови и других клинических материалов на патогенны», М. 2005.
3. Т. Бородина «Методы детекции SNP» Институт Биологии Гена.
4. Г. А. Дмитриев, И.И. Глазко. «Диагностика инфекций, передаваемых половым путем» М. «издательство БИНОМ», 2007.
5. Методические рекомендации. Определение чувствительности вируса иммунодефицита человека к лекарственным препаратам, Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007