Северный Государственный Медицинский Университет

Кафедра семейной медицины

Реферат на тему: «ПЦР – диагностика»

Зав.каф.: профессор В.В. Попов

Зав.курсом клинической

лабораторной диагностики:

профессор Н.А. Воробьева

Выполнила: врач-интерн

МУЗ «Городская больница№1»

г. Северодвинска

Н.Ю. Шульгина

Архангельск 2009

**Содержание**

Введение

Изучение ДНК: строение, структура ДНК

Основной принцип ПЦР

Осуществление рутинных методик ПЦР

Типовые ошибки при диагностике методом ПЦР

Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний

Ограничения метода ПЦР

Основные принципы организации ПЦР - диагностических лабораторий и

требования к проведению ПЦР - анализа

Заключение

Список использованной литературы

**Введение**

ДНК-диагностика - это один из наиболее современных высокотехнологичных методов исследования. ДНК-анализы широко применяются в диагностике инфекционных заболеваний, позволяя обнаруживать даже единичные микроорганизмы в организме человека.

ДНК-диагностика объединяет несколько методов исследования, самый распространенный из них - метод ПЦР (полимеразной цепной реакции, Polymerase chain reaction, PCR diagnostics) .

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 для выявления как возбудителей различных заболеваний, так и мутаций генов человека, животных и растений. Количество ПЦР-лабораторий неуклонно увеличивается, а ПЦР-анализ становится все более востребованным среди специалистов и пациентов.

Первоначально сам принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэри Мюллисом в 1983г. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет, и за разработку ПЦР-анализа Кэрри Мюллис уже в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Появлению метода проведения полимеразной цепной реакции предшествовали определенные достижения молекулярной генетики: к тому времени уже были расшифрованы нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов и выделены специфические.

Также появлению ПЦР много способствовало открытие уникального фермента ДНК-полимеразы (или taq-полимеразы). Именно этот фермент катализирует и "контролирует" все процессы во время проведения анализа методом ПЦР. Особенность этого фермента - он термостабилен, исключительно термостоек: он выдерживает нагревание до температуры кипения без потери активности, а "любимый" его температурный режим во время работы - 72°С. Многие реакции при проведении ПЦР идут почти исключительно при повышенной температуре.

Официальное становление метода ПЦР в России связано с выходом в 1995 г. двух методических рекомендаций:

-"Диагностика хламидийной, микоплазменной и герпесвирусной инфекций методом цепной полимеразной реакции"(№95-106,утверждены МЗ РФ 08.08.95), в них ПЦР впервые рекомендована к применению в практическом здравоохранении;

 -"Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабо- раториях, использующих метод полимеразной цепной реакции" (утверждены 22.06.95 Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора РФ), связаны с организацией работы в ПЦР-лаборатории.

В 1995 г. была впервые подготовлена техническая документация (инструкции, технические условии и др.) и зарегистрирован в Минздраве России отечественной набор реагентов для ПЦР-диагностики Chlamydia trachomatis.

За прошедшие годы появилось большое количество модификаций ПЦР, позволивших значительно увеличить потенциальные возможности первоначально предложенного метода: мультипраймерная ПЦР, гнездовая ПЦР, ПЦР in situ*,* ПЦР в режиме реального времени и др. При использовании метода ПЦР для идентификации РНК, а не ДНК применяется модифицированный ОТ-ПЦР метод. Одним из существенных преимуществ метода ПЦР является высокая чувствительность и специфичность. Чувствительность определяется сочетанием следующих трех факторов: эффективностью выделения ДНК возбудителя, чувствительностью собственно ПЦР и выбранного метода детекции.

**Изучение ДНК: строение, структура ДНК**

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - универсальный носитель генетической информации и наследственных признаков у всех существующих на Земле организмов. Исключение составляют только некоторые микроорганизмы, например, вирусы - универсальным носителем генетической информации у них является РНК - одноцепочечная рибонуклеиновая кислота.

Строение ДНК-молекулы

Открытие ДНК молекулы произошло в 1953 году. Френсис Крик и Джеймс Уотсон открыли структуру двойной спирали ДНК, их работа впоследствии была отмечена Нобелевской премией.

ДНК представляет собой двойную нить, скрученную в спираль. Каждая нить состоит из из последовательно соединенных нуклеотидов. Каждый нуклеотид ДНК содержит одно из четырёх азотистых оснований - гуанин (G), аденин (A) (пурины), тимин (T) и цитозин (C) (пиримидины), связанное с дезоксирибозой, к последней, в свою очередь, присоединена фосфатная группа. Между собой соседние нуклеотиды соединены в цепи фосфодиэфирной связью, образованной 3'-гидроксильной (3'-ОН) и 5'-фосфатной группами (5'-РО3). Это свойство обуславливает наличие полярности в ДНК, т.е. противоположной направленности, а именно 5'- и 3'-концов: 5'-концу одной нити соответствует 3'-конец второй нити

Структура ДНК

*Первичная структура ДНК* - это линейная последовательность нуклеотидов ДНК в цепи. Последовательность нуклеотидов в цепи ДНК записывают в виде буквенной формулы ДНК: например - AGTCATGCCAG, запись ведется с 5'- на 3'-конец цепи ДНК.

*Вторичная структура ДНК* образуется за счет взаимодействий нуклеотидов (в большей степени азотистых оснований) между собой, водородных связей. Классический пример вторичной структуры ДНК - двойная спираль ДНК. Двойная спираль ДНК - самая распространенная в природе форма ДНК, состоящая из двух полинуклеотидных цепей ДНК. Построение каждой новой цепи ДНК осуществляется по принципу комплементарности, т.е. каждому азотистому основанию одной цепи ДНК соответствует строго определенное основание другой цепи: в комплементарной паре напротив A стоит T, а напротив G располагается C и т.д.

Синтез ДНК. Репликация

Уникальным свойством ДНК является ее способность удваиваться (реплицироваться). В природе репликация ДНК происходит следующим образом: с помощью специальных ферментов (гираз), которые служат катализатором (веществами, ускоряющими реакцию), в клетке происходит расплетение спирали в том ее участке, где должна происходить репликация (удвоение ДНК). Далее водородные связи, которые связывают нити, разрываются и нити расходятся.

В построении новой цепи активным "строителем" выступает специальный фермент - ДНК-полимераза. Для удвоения ДНК необходим также стратовый блок или "фундамент", в качестве которого выступает небольшой двухцепочечный фрагмент ДНК. Этот стартовый блок, а точнее - комплементарный участок цепи родительской ДНК - взаимодействует с праймером - одноцепочечным фрагментом из 20-30 нуклеотидов. Происходит репликация или клонирование ДНК одновременно на обеих нитях. Из одной молекулы ДНК образуются две молекулы ДНК, в которых одна нить от материнской молекулы ДНК, а вторая, дочерняя, вновь синтезированная.

Таким образом, процесс репликации ДНК (удваивания) включает в себя три основных этапа:

-Расплетение спирали ДНК и расхождение нитей

-Присоединение праймеров

-Образование новой цепи ДНК дочерней нити

В основе анализа методом ПЦР лежит принцип репликации ДНК - синтеза ДНК, который современным ученым удалось воссоздать искусственно: в лаборатории врачи вызывают удвоение ДНК, но только не всей цепи ДНК, а ее небольшого фрагмента.

**Основной принцип ПЦР**

Любой метод ДНК-диагностики основан на специфической гибридизации двух нитей ДНК, комплементарных (структурно дополняющих) одна другой. Примерной (хотя и весьма приблизительной) аналогией может служить серологическая реакция, основанная на специфической реакции белка-антитела с соответствующим антигеном. Специфичность связывания нитей в спирали ДНК основана на связях А-Т и Г-Ц. Праймеры комплементарны искомым участкам ДНК, и поэтому они способны связываться с конкретными участками гена. Достройка нитей ДНК, начиная с добавленных праймеров, требует наличия в реакционной смеси пурин-и пиримидинтрифосфатов (АТФ, ТТФ, ГТФ и ЦТФ), а также присутствия ДНК-полимеразы, которая соединяет их в цепочку согласно последовательности второй нити ДНК.

**Осуществление рутинных методик ПЦР**

Исследуемым материалом для ПЦР могут служить соскобы эпителиальных клеток, кровь, плазма, сыворотка, плевральная и спинномозговая жидкости, околоплодная, суставная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, сок простаты, слюна, моча, мокрота, слизь и другие биологические выделения, биоптаты.

Забор материала производится в условиях процедурного кабинета соответствующего профиля. После забора пробы как можно скорее должны быть доставлены в ПЦР-диагностическую лабораторию.

Забор образцов необходимо производить при помощи стерильного, желательно одноразового, инструментария только в одноразовые стерильные пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение часа хромовой смесью, тщательно промытые дистиллированной водой и прокаленные в сушильном шкафу при температуре 150 °С в течение 1 часа.

1. Выделение ДНК из клинического образца производится любым способом. Основное требование - достаточно стандартный выход продукта и интактность, сохранение двухнитевой структуры.

Проведению ПЦР предшествует стадия выделения и преципитации ДНК из исследуемого материала. Это обеспечивает концентрирование обнаруживаемой ДНК инфекционного агента в минимальном объеме жидкости, используемой в ПЦР. В случаях, когда не требуется достижения высокой чувствительности анализа, например, при идентификации МБТ после первичного культивирования, достаточна их обработка, позволяющая лишь разрушить микробную стенку: нагревание в лизирующем буфере, ультразвуковая обработка или использование ферментов (лизоцим) без последующего выделения ДНК.

При отсутствии в пробе ингибиторов Taq-полимеразы (гемоглобина или других) и наличия десятка копий ДНК-матрицы в объеме, вносимом в пробирку со смесью всех реагентов ПЦР, подготовка пробы может быть полностью исключена. Например, вирус гепатита В в сыворотке крови и многие возбудители инфекционных менингитов в спинномозговой жидкости можно детектировать методом ПЦР без всякой подготовки, без предварительного выделения из них ДНК. В большинстве случаев из исследуемой пробы крови, сыворотки, лейкоцитов, биоптатов, мочи, мокроты для исключения ложноотрицательного результата следует выделить ДНК тем или иным способом. Благодаря этому происходит концентрирование исследуемой ДНК-матрицы в малом объеме и удаление ингибиторов Taq-полимеразы.

В настоящее время используется несколько способов подготовки образца для проведения ПЦР. Процедура подготовки пробы включает лизис микроорганизма и экстракцию нуклеиновой кислоты. С целью разрушения клетки используют простое кипячение, замораживание-оттаивание в присутствии лизоцима, а также специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу. Выбор метода диктуется природой микроорганизма, а точнее - природой его клеточной стенки.

Для экстракции ДНК используют два основных метода. Во-первых, применяют классическую процедуру фенольно-хлороформной экстракции. При этом достигается хорошая очистка ДНК и, в первую очередь, от ингибиторов Taq-полимеразы, но неизбежны большие потери нуклеиновой кислоты, особенно заметные при работе с образцами небольшого объема с низкой концентрацией инфекционного агента. Другой способ, применяемый для очистки нуклеиновой кислоты, основан на использовании сорбентов. Подготовка материала с его использованием занимает меньше времени и более проста в исполнении, хотя не всегда может быть применена, так как не гарантирует удаление возможных ингибиторов.

2. Амплификация. Полимеразная цепная реакция ДНК проводится в специальном приборе (термоциклере или амплификаторе), который, согласно введенной программе, изменяет температуру в рабочих ячейках, держит ее в течение заданного времени и переходит к следующему этапу.

Каждый цикл ПЦР обычно состоит из трех температурных режимов.

а) Нагрев до 95 °С в течение 30-40 сек. При этом выделенные молекулы ДНК подвергаются денатурации, т. е. происходит разделение ДНК на две нити.

б) Охлаждение до оптимальной температуры (обычно 48-66 °С). При этом разделенные нити ДНК могут обратно воссоединиться по комплементарным участкам. Однако, при наличии в образце целевых участков ДНК, синтетические ДНК-зонды (праймеры, длиной 15-30 п.н.) специфически связываются (гибридизуются) с комплементарными участками ДНК, например хламидии или герпесвируса. Тем самым ограничиваются искомые участки генов, определяя точки начала и окончания предполагаемого продукта ПЦР. Время отжига 20-60 сек.

в) После завершения гибридизации праймеров с искомыми участками ДНК, температуру смеси повышают до *72* °С. Эта температура оптимальна для фермента Таq ДНК-полимеразы, которая начинает быстро достраивать одну и другую цепочку ПЦР-продукта, начиная с места фиксации, соответственно, одного и второго ДНК-зонда. Этот процесс называется элонгацией (т. е. удлинением) ПЦР-продукта, сами же продукты ПЦР именуют ампликонами. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

При первом цикле ПЦР получается некоторое число ампликонов различной длины, которые служат субстратом во втором цикле реакции, где количество специфических продуктов удваивается еще раз. В каждом из последующих циклов (всего до 35-40) происходит двукратное возрастание числа целевых продуктов ПЦР-ампликонов.

Специфичность ПЦР и количество амплифицируемой ДНК, которое определяет чувствительность, могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Taq-полимеразы, праймеров, дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и ионов Mg) и температурного режима ПЦР.

Даже при оптимальных концентрациях фермента, ионов Mg, праймеров и dNTP специфичность и чувствительность ПЦР очень сильно зависит от температуры отжига праймеров (2-я стадия цикла ПЦР): неспецифичность ПЦР-амплификации повышается при снижении температуры отжига ниже оптимальной и при повышении концентраций праймеров и dNTP выше оптимальных, а при повышении температуры отжига выше оптимальной снижается выход специфической амплифицируемой ДНК вплоть до ее полного исчезновения.

3. Детекция.

Способы учета результатов ПЦР:

*Качественная оценка* (электрофоретический метод)

Во многих случаях при ПЦР-диагностике достаточно получить ответ "да" или "нет", как, например, при первичном выявлении инфекционных возбудителей, судебно-медицинских исследованиях, определении генных мутаций, специфических онкогенов и др. Обычным способом разделения продуктов ПЦР и идентификации специфического гена является электрофорез в агарозном или (реже) полиакриламидном геле. Методики электрофоретического разделения достаточно стандартизированы и дают вполне воспроизводимые результаты. Результат должен быть безусловно отрицательным в контроле без изучаемой ДНК и положительным - в пробе с ДНК, содержащей искомый участок гена. Положительный контроль может представлять собой целевую ДНК или участок гена, клонированный в плазмиде или амплифицированный с помощью ПЦР

Для учета результатов качественной ПЦР может быть использован и метод флуоресцентной детекции. Для этого по окончании ПЦР определяют наличие или отсутствие специфического сигнала с помощью специальных флуориметров(так называемый flash-метод).Поскольку здесь нет необходимости и в электрофоретическом оборудовании, то очевидна существенная экономия рабочих зон и реагентов для лаборатории.

Методы учета результатов ПЦР без применения электрофореза наиболее уместны и выгодны для многопрофильных лабораторий, где ПЦР-методы составляют лишь некоторую часть общего производственного процесса.

В таких крупных лабораториях часто определяется лишь ограниченный круг наиболее востребованных микроорганизмов. На российском рынке предлагается целый ряд flash-наборов для диагностики заболеваний, передающихся половым путем, и ряда вирусных инфекций. Этот ассортимент патогенов вполне достаточен для многих больничных лабораторий, и они могут с начала своей деятельности сделать акцент на подобных методах анализа.

*Количественная оценка результатов ПЦР*

В ряде клинических ситуаций возникает вопрос о динамике патологического процесса и/или эффективности проводимой терапии. Эти вопросы наиболее актуальны при обследовании пациентов с хроническими инфекциями (гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека и др.). При диагностике исходят из того, что накопление продуктов ПЦР (ампликонов) пропорционально содержанию копий искомого гена в исследуемой пробе.

Естественно, учет результатов количественной ПЦР можно проводить и с помощью гель-электрофореза с анализом интенсивности специфических сигналов ПЦР. Обязательным условием правильной количественной оценки результатов ПЦР являются надежные положительные контрольные пробы с известным содержанием копий искомого гена (например, 1000 копий гена гепатита С на одну ПЦР-реакцию). Ряд последовательных разведений количественного контроля дает возможность построить калибровочные кривые, по которым можно оценивать содержание генокопий в клинических образцах .

Ключевым достижением в проведении количественной ПЦР стала разработка флуоресцентных ДНК-зондов, которые добавляются в реакционную смесь наряду с "обычными" праимерами и дают возможность отслеживания хода ПЦР во времени (так называемая геа1-timе-ПЦР), которая в 1993-1994 гг. была внедрена в.соответствующих приборах и диагностических системах (принцип ТаqМаn). Существует еще несколько методов конструирования ДНК-зондов для количественной ПЦР.

Методология ТаqМаn предусматривает синтез флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеющих на концах две метки. Одна из них - флуоресцентная молекула, другая - молекула-гаситель этой флуоресценции. Таq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивает нуклеотидную цепочку, но и разрушает связанный флуоресцентный зонд. При этом флуоресцирующая метка выходит в свободное состояние, освобождаясь от влияния гасителя. Поэтому интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу ампликонов и, соответственно, числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом термоблока-амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции в каждой пробирке (принцип геаl-timе-ПЦР). В результате после 20-40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые. По калибровочным кривым с контрольными образцами возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Важная особенность проведения ПЦР флуоресцентным методом состоит в том, что пробирки с ПЦР-смесью не нужно открывать при учете результатов. Благодаря этому уменьшается вероятность загрязнения помещений продуктами амплификации и отпадает необходимость в выделении специальных рабочих зон для проведения электрофореза.

**Типовые ошибки при диагностике методом ПЦР**

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.

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.

1.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 выявить 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, а данном случае обнаружить патогенный микроорганизм, то биоматериал необходимо брать непосредственно в месте предполагаемой локализации инфекционного процесса. Исследование некоего "универсального материала", как, например, крови, 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 Мусоbасterium 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.

Мусоbасterium 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 . 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. 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.

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. В последующем для работы необходимо получить клеточный осадок мочи. Однако следует учитывать, что 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.

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 .

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°С в течение нескольких часов, для более длительного хранения необходимо замораживание. Единственное исключение - кровь, поскольку цельную кровь замораживать нельзя! Необходимо получить плазму и уже ее замораживать. Заморозка должна быть однократной, в противном случае происходит разрушение нуклеиновых кислот.

2.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 дли 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 но 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 поэтому высока вероятность различного уровня флуоресценции. Таким образом, ошибка, влияние которой в некоторых случаях можно не заметить, в других может обусловить 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 контролем. Во втором случае все отрицательные значения оказываются недостоверными. Обнаружить ошибку не представляется проблемой, поскольку нормировочные значения оказываются очень высокими, близкими к 10', а значения флуоресценции в некоторых пробирках существенно ниже 1.

Контаминация.

Проблема контаминации возникает при неправильной организации работы 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 пробирка не открывается 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 контаминированной 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 возможно, 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 - так называемая кросс-контаминация. С целью предотвращения кросс-контаминации также 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 с положительным контролем и, в идеале, с маркером длин.

В случае нарушений правил работы существует риск контаминации уже на этапе детекции. Такого рода контаминация 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, связанной 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 (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 получаются такие же, как при контаминации в лаборатории, однако в данном случае все низкие значения флуоресценции будут примерно одинаковы, что ц 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 успевает появиться достаточно большая разница между уже готовыми фоновыми и амплификационными пробирками.

Наиболее частая ошибка при исследовании методом ПЦР с де
текцией 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 и области начала экспоненциального роста, и это не один из множества пиков колебания флуоресценции. Также прибор может выдать ложноотрицателъный 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 заметь" но отличается от колебаний и отрицательных образцах.

3.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. 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 С. Trachomatis*-* результат исследования отрицательный. Однако врач не должен снимать предполагаемый диагноз, поскольку инфекция может быть вызвана другими видами хламидий, например С. рneumoniа, С. ресоrum, С. psitaci,которые не диагносцируются данной тест-системой. То есть при назначении ПЦР-исследования врач должен очень четко представлять границы специфичности применяемых тест-систем.

Вместе с тем несовпадение результатов различных методов исследования не говорит об ошибке. Зачастую ПЦР-исследование дает положительный результат, в то время как ИФА - отрицательный. 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 для получения качественных результатов исследований необходимо четкое выполнение правил работы на всех этапах клинической лабораторной диагностики и тесная взаимосвязь специалистов ПЦР-лаборатории с врачами-клиницистами.

**Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний**

1.Прямое определение наличия возбудителей.

Многие традиционные методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2.Высокая специфичность.

Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от иммунологических методов анализа, где нередки ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

3.Высокая чувствительность.

Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-анализ обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов - 103-105 клеток).

4.Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.

Материалом для исследования методом ПЦР служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка.

5.Высокая скорость получения результата анализа.

Для проведения ПЦР- анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-5 часов.

6.Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.

Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях. Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Следует отметить, что методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.).

**Ограничения метода ПЦР**

1.Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.

Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Обычно этот интервал составляет 4-8 недель.

2.Возможность перекрестной реакции.

Подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме данного и сходных микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа.

3.Изменчивость микроорганизмов.

Хотя при конструировании тест-системы фрагмент генома, используемый для амплификации, выбирается из высоко консервативной области, изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке генома, и, таким образом, становиться неуловимыми данной тест-системой.

Последние два пункта важны для разработчиков ПЦР-диагностикумов. В настоящее время разработаны стандарты, регламентирующие объем испытаний (включая проверку на перекрестные реакции, а также тестирование известных штаммов определяемого возбудителя), которые должна выдержать тест-система, прежде чем она попадет на рынок.

**Основные принципы организации ПЦР-диагностических лабораторий и требования к проведению ПЦР-анализа**

Работы в ПЦР-лаборатории проводятся согласно:

- СП 3.1/3.2.558-96 "Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний";

- СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами";

- методическим рекомендациям МУ 1.3. 1888-04 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности";

- МУ 3.5.5.1034-01 "Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями III-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР".

Проведение ПЦР-диагностики инфекций связано с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, - возможностью контаминации. Попадание в реакционную пробирку следовых количеств положительной ДНК (специфических продуктов амплификации ДНК - ампликонов; ДНК-стандарта, используемого в качестве положительного контроля; положительной ДНК клинического образца) приводит к амплификации в процессе ПЦР специфического фрагмента ДНК и, как следствие, к появлению ложноположительных результатов.

В процессе работы могут встретиться два вида контаминации:

1) перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов;

2) контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, т.к. в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

Контаминация следовыми количествами ампликонов посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхности лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложнопложительных результатов.

Как правило, определить источник контаминации бывает очень трудно и требует значительных затрат времени и средств. Накопленный к настоящему времени опыт работы лабораторий, использующих метод ПЦР для диагностики позволяет сформулировать основные требования к организации таких лабораторий и проведению самих анализов. Соблюдение данных требований позволяет исключить возможность контаминации и получения ложноположительных результатов.

Необходимо территориально разделить различные стадии проведения анализа, размещая их в отдельных помещениях:

-Пре-ПЦР-помещение, где производится обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в дополнительном отдельном помещении). В этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами, ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории.

-Пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации. В этом помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций. Желательно комнату детекции продуктов амплификации расположить как можно дальше от пре-ПЦР-помещений.

Рабочие помещения должны быть оснащены ультрафиолетовыми лампами с максимумом излучения в области 260 нм (типа ДБ-60) из расчета 2,5 Вт на 1 м3. Лампы должны быть расположены так, чтобы прямому облучению подвергались поверхности рабочих столов, оборудование и материалы, с которыми имеет контакт оператор во время проведения ПЦР-анализа. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и в одноразовых перчатках, так как анализируемые биопробы являются потенциально опасным инфицированным материалом. Обработка одежды из разных помещений должна производиться отдельно. Желательно, чтобы на разных этапах проведения ПЦР-анализа работали различные сотрудники.

Следует использовать отдельные наборы дозаторов, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток предназначенные для различных стадий анализа и не переносимые из одного помещения в другое. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

Все этапы работы проводить только с использованием одноразовых расходуемых материалов: наконечников для автоматических пипеток, пробирок, перчаток и т.д. Обязательно менять наконечники при переходе от пробы к пробе. Желательно использовать наконечники с фильтром - аэрозольным барьером для предотвращения попадания микрокапель раствора в пипетку. Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор.

Клинические образцы следует хранить отдельно от реагентов.

 Для обработки и уборки рабочего места необходимо в каждом помещении иметь ватно-марлевые тампоны (салфетки), пинцет, дезинфицирующий и инактивирующий растворы.

Следует исключить проведение в ПЦР-диагностической лаборатории работ, связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности ДНК или фрагментов генов возбудителей, которые диагностируются в данной лаборатории.

**Заключение**

В настоящее время метод ПЦР-диагностики развивается семимильными шагами. Во всем мире совершенствуются, модифицируются и разрабатываются всевозможные модификации ПЦР-анализа. Каждый год на медицинский рынок поступает десятки новых разработок и тест-систем ПЦР-диагностики, предназначенных для выявления нуклеотидных последовательностей различных микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний. Новые разработки для проведения ДНК-исследований с каждым разом снижают себестоимость ПЦР-анализа, делая его доступным для широкого использования в диагностических и лечебных целях.

Диагностика инфекционных заболеваний является наиболее частым приложением ПЦР в многопрофильных медицинских учреждениях. Что касается более широких возможностей ПЦР-исследований в медицине и смежных областях, то среди них можно упомянуть следующие приложения.

1. Диагностика инфекций. Наиболее востребована ПЦР-диагностика вирусов (главным образом, вирусов гепатитов В и С, а также группы герпеса), а также возбудителей скрытых инфекций, передающихся половым путем (хламидиоз, трихомониаз, микоплазмоз и др.).

2. Судебно-медицинская экспертиза и смежные области. Идентификация личности подозреваемых и потерпевших лиц по анализам ДНК. С этими вопросами методически связаны задачи установления отцовства (материнства) или иного кровного родства.

3. Онкология, онкогематология, трансплантология. Выявление специфических онкогенов и антионкогенов (особенно в диагностике лейкозов и лимфом), которое обычно проводится с образцами РНК из клеток больных. Из проб РНК с помощью обратной транскриптазы получают комплементарную ДНК, в которой и выявляют искомые онкогены, характерные для отдельных типов лейкозов и лимфом. Кроме того, при трансплантации костного мозга и внутренних органов необходима диагностика НLА-антигенов, которая сейчас проводится с применением мультиплексной ПЦР, выявляющей широкий спектр генов совместимости.

4. Медицинская генетика. Диагностика мутаций, характерных для редких генетических заболеваний (в т. ч. пренатальная диагностика и установление носительства данного гена у родителей); обнаружение частых генных вариантов, связанных с предрасположенностью к определенным заболеваниям. За последние 10 лет приобрели популярность методы выявления у больных различных генных вариантов (аллелей генов), определяющих повышенный риск тромбоза и побочных эффектов некоторых лекарственных препаратов. Также в последние 5 лет разработаны и активно применяются исследования генетически модифицированных продуктов питания на предмет соответствия существующим санитарно-гигиеническим нормативам.

Необходимо помнить, что, во-первых, метод ПЦР должен применяться клиницистами осмысленно, и врач, решивший использовать ПЦР в своей, работе должен обладать определенными знаниями об особенностях и возможностях данного метода. Во-вторых, между клиницистом и ПЦР-лабораторией должна существовать тесная обратная связь, необходимая для анализа сложных случаев и выработки правильной диагностической стратегии. В-третьих, ПЦР-анализ не является панацеей в диагностике и не заменяет существующие методы исследований, а лишь дополняет их. И главное - ПЦР не может заменить интуицию и аналитическое мышление, которыми должен обладать врач, рассчитывающий на успех.

**Список использованной литературы**

1. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции от 22.06 1995.

2. Щербо С.Н. ПЦР в клинической лабораторной диагностике: реальности и перспективы //Справочник заведующего КДЛ 2006. №10 с. 45-48

3. Тарасенко И.М. Правила организации работы КДЛ с патогенными биологическими агентами // Справочник заведующего КДЛ 2007. №6 с.37-40.

4. Херсонская А.М. Современные методы клинической диагностики: ПЦР в режиме реального времени // Справочник заведующего КДЛ 2007. №11 с.31-36

5. Чухловин.А.Б. Метод ПЦР в клинической лабораторной диагностике // Справочник заведующего КДЛ. 2008. №4 с.46-50

6. Херсонская А.М., Амон Е.П. Типовые ошибки при диагностике методом ПЦР // Справочник заведующего КДЛ 2008. №5 с.30-36

7. Веб-ресурс для специалистов КЛД <http://www.primer.ru/>