

Министерство здравоохранения Кыргызской Республики

Республиканский диагностический центр

Республиканская станция переливания крови

Лаборатория ИФА, ПЦР-анализа

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Методические рекомендации

Бишкек - 2000

В методических рекомендациях даны принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР), приведены требования, которым должна отвечать ПЦР-лаборатория, а также перечень необходимого оборудования и материалов. Дана характеристика основным этапам ПЦР, начиная от забора проб и кончая интерпретацией получаемых результатов. Представлены разделы медицины, где в настоящее время с успехом применяется ПЦР-анализ.

Методические рекомендации предназначены для врачей-лаборантов, инфекционистов, микробиологов, урологов, гинекологов, трансфузиологов, терапевтов, педиатров и врачей других специальностей.

Составители: к.б.н. А.А.Бонцкий, к.м.н. М.М.Таирова, Т.С.Кутукеев, А.И.Филипченко, А.С.Уголбаева

Введение

Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР, Polymerase chain reaction, PCR) был разработан Кэри Мюллисом (фирма "Cetus", США) в 1983 г. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет. За разработку ПЦР-анализа К.Мюллис в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии. Появление метода ПЦР было обусловлено определенными достижениями молекулярной генетики, прежде всего расшифровкой нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов. Нельзя не сказать, что ПЦР стала возможной благодаря открытию уникального фермента таq-ДНК-полимеразы, содержащегося у бактерий, обитающих в гейзерах. Особенность этой полимеразы заключается в ее исключительной термостойкости (выдерживает нагревание до температуры кипения без потери активности) и высокой рабочей температуре (оптимум работы - 72°C).

Изыщность, простота исполнения, непревзойденные показатели чувствительности и специфичности принесли новому методу небывалую популярность. За короткое время ПЦР-анализ распространился по всему миру, быстро выйдя из лабораторий научных институтов в сферу практического клинического использования. Диагностика инфекционных заболеваний, в том числе вызванных агентами, трудно поддающимися культивированию, генотипирование микроорганизмов, оценка их вирулентности, определение устойчивости микрофлоры к антибиотикам, генодиагностика и генетическая дактилоскопия, пренатальная диагностика, биологический контроль препаратов крови - вот далеко не полный перечень направлений медицины, где с успехом применяется ПЦР.

В настоящее время предложены всевозможные модификации ПЦР, разрабатываются новые амплификационные технологии, основанные на клонировании, как ДНК, так и РНК-фрагментов. Из подобных методов, апробированных на клиническом материале, можно назвать лигазную цепную реакцию (ЛЦР, LCR), NASBA (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification), метод с использованием QV-репликазы и др. В последних двух методах реакция осуществляется в изотермическом режиме, и для ее проведения не требуется амплификационного оборудования. Тем не менее, на сегодняшний день ПЦР-анализ остается наиболее распространенной и динамично развивающейся технологией. Ежегодно на рынке появляются десятки новых тест-систем для ПЦР-анализа, предназначенных как для выявления нуклеотидных последовательностей различных микроорганизмов - возбудителей заболеваний, так и для исследования генов человека. Себестоимость ПЦР-анализа неуклонно снижается, что способствует все более широкому использованию метода в лечебных и диагностических учреждениях. Количество ПЦР-лабораторий в странах СНГ растет в геометрической прогрессии и, видимо, в ближайшее время ПЦР-анализ станет одним из самых распространенных методов лабораторной диагностики.

Принцип метода ПЦР

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является универсальным носителем генетической информации у всех существующих на Земле организмов (исключение - РНК-содержащие микроорганизмы). ДНК представляет собой двойную нить, скрученную в спираль. Каждая нить состоит из соединенных последовательно нуклеотидов. Нити ДНК имеют противоположную направленность: 5'-концу одной нити соответствует 3'-конец второй нити. Уникальным свойством ДНК является ее способность удваиваться. В живой клетке этот процесс происходит следующим образом: с помощью специальных ферментов - гираз происходит расплетение спирали в том ее участке, где должна происходить репликация. Далее водородные связи, связывающие нити, разрываются и нити расходятся. Одна из цепей ("+" или смысловая) используется в качестве основной матрицы. Построение новой нити ДНК идет только в одном направлении - от 5'-конца к 3'-концу. Этот процесс осуществляется по принципу комплиментарности ферментом ДНК-полимеразой. Для того чтобы фермент начал свою работу, требуется наличие стартового блока - небольшого начального двухцепочечного фрагмента. Стартовый блок образуется при взаимодействии небольшого одноцепочечного фрагмента ДНК, называемого праймером, с комплиментарным участком соответствующей цепи родительской ДНК. Репликация одновременно идет и на второй нити ДНК ("-" или антисмысловой), только наращивание цепи происходит в обратном направлении. В результате процесса репликации из одной молекулы ДНК образуется две молекулы ДНК, в которых одна нить от материнской молекулы ДНК, а вторая, дочерняя, вновь синтезированная.

Таким образом, цикл репликации ДНК включает в себя три основные стадии:

- 1) расплетение спирали ДНК и расхождение нитей (денатурация);
- 2) присоединение праймеров;
- 3) достраивание цепи дочерней нити.

В ПЦР эти процессы осуществляются в пробирке в циклическом режиме. Переход от одной стадии реакции к другой достигается изменением температуры инкубационной смеси. При нагревании раствора до 93-95°C происходит денатурация ДНК. Для перехода к следующему этапу - присоединению или "отжигу" праймеров - инкубационную смесь охлаждают до 50-65°C. Далее смесь нагревают до 70-72°C - оптимум работы таq-ДНК-полимеразы - на этой стадии происходит достраивание новой нити ДНК. Далее цикл повторяется снова.

Поскольку наращивание дочерних нитей ДНК должно идти одновременно на обеих цепях материнской ДНК, то для репликации второй цепи также требуется свой праймер. Таким образом, в реакционную смесь вносятся два праймера: один для "+"-цепи, второй для "-"-цепи. Присоединившись к противоположным цепям молекулы ДНК, праймеры ограничивают собой тот ее участок, который будет в дальнейшем многократно удвоен или амплифицирован. Длина такого фрагмента, который называется ампликоном, обычно составляет несколько сот нуклеотидов.

Разработка праймеров для ПЦР является самым ответственным звеном в создании диагностикума. Требуется подобрать такой фрагмент молекулы ДНК, который бы отличался генетической консервативностью и присутствовал бы только у интересующего вида микроорганизмов или в исследуемом гене. При этом длина такого фрагмента должна составлять 15-30 нуклеотидов. Прodelать эту работу помогают специальные компьютерные программы, использующие информацию о нуклеотидной последовательности известных микроорганизмов или генов человека. Получить подобную информацию можно из международных компьютерных банков данных (Gen bank, EMBL) через сеть Internet. Синтез праймера по заданной последовательности нуклеотидов не представляет технической сложности и осуществляется в автоматических синтезаторах.

Остальные компоненты ПЦР: дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ) в эквивалентных концентрациях 200-500 мкм; магний, необходимый для работы таq-полимеразы (2-3 мМ); трис-НСI-буфер рН 6,8-7,8.

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающие при различных температурных режимах.

1 этап: денатурация ДНК. Протекает при 93-95⁰ в течение 30-40 сек.

2 этап: отжиг праймеров. Присоединение праймеров происходит комплиментарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65°C. Время отжига 20-60 сек.

3 этап: достраивание цепей ДНК. Комплиментарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Процесс синтеза катализируется ферментом таq-полимеразой и проходит при температуре 70-72°C. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование специфического фрагмента ДНК - ампликона. В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2ⁿ, где n - число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10⁸ молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний

- **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.

- **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.

- **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 - 10^3 - 10^5 клеток).

- **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, сыроворотка.

- **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.

- **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

- **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.

- **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.

- **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-диагностик. 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 “Правилам устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждениях системы здравоохранения СССР”, Москва, 1981г.

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 ложноположительных 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 расходных 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 (см. ниже).

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 (см. ниже).

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.

Оснащение ПЦР-диагностической лаборатории

Помещение для пробоподготовки

- Отдельный стол или настольный бокс с бактерицидной лампой.
- Холодильник на 2-8 °С с морозильной камерой.
- Твердотельный термостат для пробирок типа “Эппендорф” 1,5 мл на 25-100 °С
- Микроцентрифуга для пробирок типа “Эппендорф” до 16 тыс. g.
- Встряхиватель для пробирок типа “Эппендорф” (центрифуга/вортекс).
- Вакуумный насос с колбой-ловушкой для отсасывания надсадочной жидкости.
- Амплификатор.
- Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема для выделения ДНК и для приготовления реакционной смеси.
- Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (желательно с аэрозольным барьером).
- Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки типа “Эппендорф” на 1,5 мл.
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 или 0,5 мл в зависимости от модели амплификатора.
- Одноразовые резиновые перчатки.
- Отдельный халат.

Пост-ПЦР-помещение

- Отдельный стол.
- Камера для горизонтального электрофореза с гребенками для формирования кармашков в пластине геля.
- Источник постоянного тока для электрофореза.
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей.
- Весы с точностью взвешивания до 10 мг
- Посуда: мерные цилиндры на 50 мл, 1 литр; колба на 200 мл из термостойкого стекла.
- Электроплитка или микроволновая печь для плавления агарозы.
- Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
- Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема.
- Одноразовые резиновые перчатки.
- Отдельный халат.

Кроме того, в ПЦР-лаборатории необходимо иметь сушильный шкаф, дистиллированную воду, этиловый спирт, соляную кислоту, серную кислоту, бихромат калия для приготовления хромовой смеси, пергидроль, хлорамин, емкости для дезинфекционных растворов (см. ниже).

Забор клинического материала

Исследуемым материалом для ПЦР могут служить соскобы эпителиальных клеток, кровь, плазма, сыворотка, плевральная и спинномозговая жидкости, 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. Эпителиальные соскобы со слизистых оболочек:

Обычно используются для диагностики заболеваний, передающихся половым путем, таких как гонорея, хламидиоз, микоплазмоз, уреоплазмоз, трихомониаз, гарднереллез, герпетическая и другие инфекции, поражающие слизистые оболочки. Забор материала лучше всего осуществлять с помощью специальных одноразовых стерильных зондов типа Cervex brush или Voba-brush, имеющих вид ершика и обеспечивающих получение большого количества клеточного материала с исследуемого участка. В случае забора материала из уретры обследуемый не должен мочиться в течение последних 1,5-2 часов.

- **из уретры у мужчин** - ершик осторожно вводят на глубину 4 см и совершают 1-2 вращательных движения, после чего ершик извлекают;
- **из уретры у женщин** - ершик осторожно вводят на глубину 1 см и совершают 1-2 вращательных движения, после чего ершик извлекают;
- **из цервикального канала** - предварительно удаляют слизь с помощью стерильного ватного тампона, затем вводят ершик на глубину 0,5-1 см, совершают 1-2 вращательных движения, после чего ершик извлекают;
- **со слизистой зева и дыхательных путей** - слегка вращая ершик, проводят им 1-2 раза по слизистой в местах предполагаемой локализации инфекционного агента;

- **из конъюнктивы** - оттянув край века, кончиком ершика осторожно проводят по слизистой в местах предполагаемой локализации инфекционного агента.

Внимание! При заборе материала недопустимо попадание следов крови и большого количества слизи!

После забора материала зонд опускают в пластиковую пробирку, содержащую 100 мкл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивают, остатки жидкости на зонде отжимают о стенки пробирки, зонд извлекают (выбрасывают в контейнер с дезинфицирующим раствором), а приготовленную таким образом пробу передают в лабораторию.

2. Моча

Моча может использоваться при инфекционном поражении мочеполового тракта у мужчин и мочевыделительных органов у женщин (у мужчин использование в качестве материала мочи заменяет эпителиальный соскоб).

Первые 50 мл утренней мочи собирают в чистый, стерильный флакон с плотной крышкой.

3. Мокрота

Мокрота используется для диагностики туберкулеза и реже для диагностики респираторных форм хламидиоза и микоплазмоза. Мокроту в количестве 15-20 мл собирают в стерильный (одноразовый) флакон.

4. Кровь, плазма, сыворотка

Используются для ПЦР-анализа вирусов гепатитов В, С, D, G, герпеса, ЦМВ, ВИЧ, исследования генов человека.

Венозная кровь в количестве 1-1,5 мл отбирается в стерильную пробирку с раствором цитрата натрия (желательно натощак). Хранить при температуре 4°C не более 24 часов (не замораживать!). В случае необходимости длительного хранения (только для гепатитов) необходимо отобрать 1 мл сыворотки или плазмы крови и хранить ее при температуре -16-20 °С не более 2 недель.

5. Биологические жидкости

Сок простаты, плевральная, спинномозговая, околоплодная, суставная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, слюна забираются по показаниям стандартным способом с использованием стерильного (одноразового) инструментария в количестве 0,1- 1,0 мл в стерильные разовые пробирки с плотно закрывающимися крышками.

6. Биоптаты

Чаще всего используют биоптаты желудка и двенадцатиперстной кишки для выявления хеликобактерной инфекции. Биопсийный материал объемом 2-3 мм³ помещают в стерильную (одноразовую) пробирку с плотной крышкой.

Хранение и транспортировка образцов

Образцы могут находиться при комнатной температуре не более 2-х часов. При необходимости более длительного хранения пробы могут быть помещены в холодильник с температурой 2-8°C на срок не более суток. Более продолжительное хранение (до 2-х недель) допустимо в замороженном виде в морозильной камере при температуре минус 20°C. Не допускается повторное замораживание-оттаивание проб.

Если ПЦР-диагностическая лаборатория и процедурный кабинет для забора проб территориально разобщены, то транспортировка проб должна осуществляться в термосах или термоконтейнерах с соблюдением правил хранения образцов и правил транспортировки инфекционных материалов.

Выделение ДНК из образцов

Способ выделения ДНК зависит как от вида определяемого возбудителя, так и от вида клинического образца. В случае соскоба эпителиальных клеток, клеточного осадка мочи широкую распространенность получил метод твердофазной сорбции, заключающийся в добавлении лизирующего агента, содержащего раствор гуанидина, сорбции ДНК на сорбенте, многократной отмывки и ресорбции ДНК буферным раствором. В случае обработки сыворотки, плазмы или цельной крови обычно используется метод фенольной экстракции. Метод включает депротеинизацию фенолом/хлороформом с последующим осаждением ДНК (или РНК) этанолом или изо-пропанолом. Обработка производится в микроцентрифужных пробирках типа "Eppendorf" объемом 1,5 мл. Время обработки составляет 1,5-2 часа. Детально способ выделения ДНК/РНК из образцов описывается в инструкции по использованию соответствующих наборов реагентов.

Проведение полимеразной цепной реакции

Определенное количество образца из обработанной клинической пробы переносится в специальную микроцентрифужную пробирку типа "Eppendorf" объемом 0,2 или 0,5 мл. В эту же пробирку добавляется амплификационная смесь, состоящая из воды, ПЦР-буфера, раствора дНТФ, раствора праймеров и раствора Таq-полимеразы (добавляется в смесь в последнюю очередь). Как правило, объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Затем в каждую пробирку добавляется одна капля минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе амплификации. Пробирки переносятся в программируемый термостат (амплификатор) и проводится амплификация в автоматическом режиме по заданной программе, соответствующей виду определяемой инфекции. Время проведения реакции в зависимости от заданной программы составляет 2-3 часа. Параллельно с опытными пробами ставятся контрольные: положительный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца вносится контрольный препарат ДНК исследуемого возбудителя. Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала или препарата ДНК вносится соответствующее количество

деионизированной воды или экстракта, не содержащего исследуемой ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключить учет ложноположительных результатов.

Некоторые тест-системы допускают осуществление одновременного определения нескольких инфекций в одной реакции амплификации, если для определяемых инфекций совпадают программы проведения реакции. Следует, однако, отметить, что в этом случае чувствительность реакции уменьшается пропорционально разбавлению. Поэтому, рекомендуется одновременно определять не более трех инфекций за одну реакцию.

Количество циклов амплификации и температурный режим указаны в инструкции к используемой тест-системе. Обычно число циклов выбирается в диапазоне от 30 до 40. Проведение более 40 циклов амплификации нежелательно, так как при этом значительно увеличивается количество неспецифических продуктов. При экспериментальном подборе количества циклов можно руководствоваться следующими рекомендациями (табл. 1).

Таблица 1. Зависимость количества циклов амплификации от ожидаемого количества искомым фрагментов ДНК в пробе

Ожидаемое количество искомым молекул ДНК в исследуемой пробе	Количество циклов
10^5	25-30
10^4	30-35
10^3	35-40
50 и меньше	Рекомендуется использовать "nested" ПЦР с постановкой второй реакции с внутренней парой праймеров.

Повышение чувствительности анализа может быть достигнуто применением "горячего" старта - прогреванием реакционной смеси перед началом первого цикла ПЦР при температуре 95°C в течение 0,5-5 мин. Это обеспечивает более полную денатурацию ДНК и, следовательно, больший выход ампликонов в результате реакции. Однако следует помнить, что высокая температура оказывает повреждающее действие на таq-полимеразу, снижая ее активность. Поэтому при горячем старте таq-полимеразу рекомендуется вводить в смесь перед самым началом первого цикла.

Для определения РНК-содержащих вирусов используется фермент обратная транскриптаза, который по РНК-матрице синтезирует ДНК-копию, которая затем участвует в ПЦР. Поскольку молекула РНК менее стойкая к действию рибонуклеаз, в состав амплификационной смеси вносят также ингибиторы рибонуклеаз.

Регистрация результатов

Амплифицированный специфический фрагмент ДНК выявляют методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. В зависимости от размера образующихся в результате ПЦР ампликонов используют гель с содержанием агарозы от 1,5% до 2,5%. Для приготовления агарозного геля расплавляют в СВЧ-печи или на водяной бане смесь агарозы, буфера и воды, добавляя раствор бромистого этидия. Охлажденную до 50-60°C смесь заливают в форму слоем толщиной 4-6 мм и с помощью специальных гребенок делают в геле карманы для нанесения образца. Гребенки устанавливают таким образом, чтобы между дном лунок и основанием геля оставался слой агарозы 0,5-1 мм. После застывания геля в карманы наносится амплификат в количестве 5-15 мкл. Рекомендуется параллельно с контрольными и опытными пробами проводить электрофорез смеси маркеров длин фрагментов ДНК. Обычно такая смесь содержит десять фрагментов ДНК длиной 100, 200, 300 и т.д. пар оснований. Постановка такой пробы позволяет верифицировать длину ампликонов в контрольных и опытных пробах. Гель с нанесенным образцом переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания и проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации в течение 30-45 мин при напряженности электрического поля 10-15 В/см. При этом фронт красителя, входящего в состав реакционной смеси должен пройти не менее 3 см.

После окончания электрофореза гель переносят на стекло трансиллюминатора и просматривают в ультрафиолетовом свете. Для документирования гель фотографируют на пленку типа "Микрат 300" или регистрируют с помощью видеосистемы, соединенной с компьютером.

В первую очередь оценивают контрольные пробы. В электрофоретической дорожке, соответствующей положительному контролю, должна присутствовать оранжевая светящаяся полоса. Ее электрофоретическая подвижность должна соответствовать указанной в инструкции длине ампликона.

В электрофоретической дорожке, соответствующей отрицательному контролю, такая полоса должна отсутствовать. Наличие такой полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации - загрязнении используемых реагентов исследуемой ДНК или ампликоном. Опытные пробы оценивают по наличию в соответствующей дорожке полосы, которая располагается на том же уровне, что и полоса в положительной контрольной пробе. Интенсивность свечения полосы соответствует количеству исследуемой ДНК в пробе, что позволяет проводить полуколичественную оценку ПЦР. Обычно положительные результаты оценивают по четырехбалльной шкале. Если же свечение полосы в опытной пробе очень слабое, то такую пробу следует переставить.

В последнее время в коммерческие тест-системы вводят внутренний контроль, дающий на электрофореограмме отдельную полосу. Применение внутреннего контроля позволяет исключить получение ложноотрицательных результатов вследствие присутствия ингибиторов реакции.

Дезинфекция и инактивация

Одноразовые инструменты и материалы (зонды для забора проб, пробирки для пробоподготовки, наконечники, перчатки и др.), контактирующие с клиническим материалом, являются потенциально инфицированными и после окончания работы подвергаются дезинфекции.

Дезинфекцию проводят, помещая инструменты и материалы на 20-24 ч в емкость, содержащую один из дезинфицирующих растворов:

- 10 % раствор хлорной извести;
- 5 % раствор хлорамина Б;
- 6% раствор перекиси водорода (готовится смешиванием 170 мл 35%-го раствора пергидроля с 830 мл дистиллированной воды).

Для инактивации ампликонов применяют облучение ультрафиолетом. Для обработки поверхностей столов, оборудования, инструментов применяют следующие растворы:

- 1 н раствор соляной кислоты;
- 1 н раствор соляной кислоты на 70%-ном этаноле.

Применение ПЦР в практическом здравоохранении

Использование метода ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний как бактериальной, так и вирусной природы имеет колоссальное значение для решения многих проблем микробиологии и эпидемиологии. Применение этого метода также способствует развитию фундаментальных исследований в области изучения хронических и малоизученных инфекционных заболеваний. Однако следует отметить, что метод ПЦР лишь дополняет спектр традиционных методов, используемых в микробиологической диагностике. Наиболее рационально и эффективно применение ПЦР для обнаружения микроорганизмов трудно культивируемых в лабораторных условиях, атипичных форм бактерий. К ним также относятся внутриклеточные паразиты и микроорганизмы, способные длительно персистировать в организме хозяина. В таблице 2 приведены основные показания к применению метода ПЦР при различных заболеваниях.

Таблица 2. Применение ПЦР в клинической практике

Показания к проведению ПЦР-исследования	Материал для исследования	Возбудитель	Примечание
Цервицит, эндометрит	Цервикальный соскоб, аспират из полости матки	<i>Chlamydia trachomatis</i> ,	Возможно проведение типирования <i>U. urealiticum</i> (Pacvo и T960), определение устойчивости микрофлоры к антибиотикам тетрациклинового ряда и макролидам
Сальпингит, периаппендицит	Цервикальный соскоб, биоптаты, полученные при лапароскопии	<i>Mycoplasma hominis</i> ,	
Бактериальный вагиноз, вагинит, вульвовагинит у девочек	Эпителиальный соскоб из влагалища	<i>Mycoplasma genitalium</i> ,	
Уретрит, простатит	Соскоб из уретры, моча, сок простаты	<i>Ureaplasma urealiticum</i> ,	
Эпидидимит	Сперма	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ,	
Проктит	Соскоб из прямой кишки	<i>Trichomonas vaginalis</i> ,	
Бесплодие, невынашивание беременности, экстрагенитальная беременность	Цервикальный соскоб,	<i>Gardnerella vaginalis</i> ,	
Синдром Рейтера	Эпителиальный соскоб из уретры и конъюнктивы	<i>Candida albicans</i>	
Герпетические поражения гениталий, слизистых оболочек, кожных покровов и др.	Эпителиальный соскоб с пораженного участка, кровь	Вирус простого герпеса I, II, VI типов, вирус Эпштейн-Барра, вирус Варицелла Зостер	
Кандиломатоз	Эпителиальный соскоб с пораженного участка	Папилломовирус (HPV)	Возможна идентификация онкогенных (6, 11, 16, 18) типов вируса
Пневмония новорожденных, рецидивирующие хронические	Эпителиальный соскоб с задней стенки глотки, бронхоальвеолярный	<i>Chlamydia trachomatis</i> ,	

заболевания верхних отделов дыхательной системы	лаваж, мокрота	Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma hominis, Mycobacterium tuberculosis	
Конъюнктивит (в том числе у новорожденных)	Эпителиальный соскоб из конъюнктивы	Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Вирус простого герпеса	
Цитомегаловирусная инфекция (в том числе внутриутробная и у новорожденных)	Кровь, моча, слюна, амниотическая жидкость, биоптаты	Цитомегаловирус (CMV)	
Туберкулез легких	Мокрота, бронхоальвеолярный лаваж,	Mycobacterium tuberculosis,	Возможно определение устойчивости микобактерий к антибиотикам
Туберкулез мочеполовых и др. органов	Моча, соскоб с пораженного участка	Mycobacterium bovis	
Язва желудка, гастрит, дуоденит	Биоптат слизистой	Helicobacter pylori	
Вирусный гепатит	Кровь, биоптаты печени	Вирусы гепатитов В, С, D, G	Возможно генотипирование HBV, HCV.
Контроль крови и препаратов из нее в трансфузиологии и трансплантологии	Кровь	Вирусы гепатитов В, С, D, G, ВИЧ, герпеса, ЦМВ	

Применение ПЦР в урогинекологической практике

Среди инфекционных агентов, поражающих урогенитальный тракт в последнее время большое внимание уделяется возбудителям латентных и хронических инфекций - хламидиям, микоплазмам. Для заболеваний, вызываемых этими возбудителями, характерна стертость клинической симптоматики, хроническое течение, часто приводящее к поражению репродуктивных функций - невынашиванию беременности, бесплодию. Многочисленные исследования по изучению применения метода ПЦР для выявления Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealiticum, проведенные в крупных клиниках разных странах, показали высокую эффективность данного метода. Признано, что по показателям чувствительности и оперативности ПЦР превосходит культуральный метод, принятый в качестве "золотого стандарта".

Для диагностики хламидийной инфекции в настоящее время выпускаются как видоспецифические ПЦР-наборы, предназначенные для выявления фрагмента ДНК Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, так и родоспецифические, в которых детектируется общий для всех видов хламидий фрагмент ДНК. Таким образом, можно проводить дифференциальную диагностику инфекций хламидийной природы, что особенно важно при респираторных хламидиозах.

Для диагностики микоплазмозов выпускаются тест-системы на Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealiticum, Mycoplasma pneumoniae, для определения чувствительности микоплазм к антибиотикам тетрациклинового ряда и макролидам, а также для генотипирования Ureaplasma urealiticum, биовары которых (Parvo и T960) отличаются вирулентностью и в лечении которых могут применяться различные подходы.

Кроме того, производятся ПЦР-наборы для выявления Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis, Candida albicans, которые могут использоваться в диагностике латентных и хронических инфекций.

Следует особо выделить группу вирусов, поражающих урогенитальный тракт. Это вирус герпеса (HSV) и вирусы папилломы человека (HPV). Как известно, инфицирование HSV 2 типа, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 типов несет риск злокачественных новообразований шейки матки у женщин. В настоящее время дифференциальная ПЦР-диагностика данных инфекций также возможна с помощью коммерческих наборов.

Применение ПЦР в неонатологии

Целый ряд микроорганизмов способны поражать плод во время беременности. Это цитомегаловирус, токсоплазмы, вирус герпеса, вирус краснухи, микоплазмы, хламидии и др. Использование серологических тестов для определения этих инфекций у новорожденных неэффективно, поскольку формирование иммунной системы у ребенка происходит в течение нескольких месяцев, и наличие инфекционного агента может не

сопровождаться выработкой специфических антител. С другой стороны, в крови новорожденного длительное время могут присутствовать материнские антитела класса IgG, способные проникать через плацентарный барьер. Таким образом, наличие специфических IgG у ребенка в первые месяцы жизни не свидетельствует о присутствии возбудителя.

Применение ПЦР-анализа значительно увеличивает возможности диагностики неонатальных инфекций, в том числе и на внутриутробном этапе. Материалом в этом случае может служить амниотическая жидкость или ворсинки хориона. Эффективным является ПЦР-анализ ЦМВ у новорожденных. Для анализа используется моча или слюна ребенка. При конъюнктивитах и пневмонии новорожденных исследование эпителиального соскоба с конъюнктивы или задней стенки глотки методом ПЦР позволяет выявлять этиологический фактор, которым часто являются хламидии, микоплазмы.

Применение ПЦР в практике службы крови

Обследование донорской крови на гепатиты, сифилис, ВИЧ серологическими методами не исключает опасности использования инфицированной крови из-за наличия у этих заболеваний определенного серонегативного периода, который может составлять до нескольких недель с момента появления возбудителя в крови. По данным 9 европейских стран риск посттрансфузионных вирусных инфекций может составлять до 40 на 1000000 донаций. Риск значительно возрастает при использовании пулированной плазмы в производстве препаратов крови. Использование метода ПЦР позволяет значительно снизить степень риска подобных осложнений.

В практике трансфузиологии используется метод минипулов. Минипулы создают, объединяя аликвоты по 100 мкл из 96 образцов плазмы. Созданные минипулы объемом по 9,6 мл подвергают центрифугированию в течение 1 часа для осаждения всех вирусов. Из полученных осадков колоночным методом Qiagen экстрагируют РНК/ДНК. Равные аликвоты полученного экстракта одновременно анализируют методом ПЦР на HBV, HCV и HIV и на ингибирование реакции ПЦР. Продукты ПЦР детектируют электрофорезом в геле. Весь процесс ПЦР-анализа занимает максимально 4 часа, и результат ПЦР-анализа готов практически одновременно с результатом серологического тестирования. Чувствительность ПЦР составляет менее 1000 геном-эквивалентов на 1 мл плазмы одного донора. Все компоненты крови (плазма, эритроциты и тромбоциты), подвергнутые ПЦР-тестированию, выдаются без дополнительной задержки по сравнению с ИФА-методом. Донации из ПЦР-положительных минипулов, методом дополнительного перекрестного ПЦР-тестирования подвергают идентификации для выявления ПЦР-положительных доноров, поэтому компоненты этих донаций выдаются с задержкой максимум до 3 дней. Возможность генотестирования плазмы крови на вирусы не одного донора, а минипула, в котором объединены аликвоты плазмы от нескольких десятков или сотен доноров доказана многими крупными банками крови Европы. Такое дополнительное генотестирование серонегативной крови в минипулах значительно снижает затраты, ускоряет получение результатов и реально увеличивает вирусную безопасность донорской крови и ее компонентов.

При использовании крови и препаратов из нее для переливания новорожденным, больным СПИДом, лицам с пересаженными органами, получающим иммунодепрессивную терапию, необходим дополнительный контроль донорской крови на вирусы герпеса и цитомегалии. Наиболее эффективным методом анализа крови на присутствие этих возбудителей является метод ПЦР.

Применение ПЦР в пульмонологии и фтизиатрии

Частой причиной атипичных пневмоний, рецидивирующих хронических бронхитов являются микоплазмы и хламидии. Диагностика этих возбудителей традиционными методами микроскопии и бакпосева неэффективна. ПЦР позволяет не только диагностировать хламидиозы и микоплазмозы, но и проводить видовую идентификацию возбудителя (*S. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*).

Использование метода ПЦР позволяет значительно улучшить раннюю диагностику туберкулеза. Метод ПЦР сочетает в себе высокую чувствительность, которая не уступает культуральному методу и равна 10-50 копий генома, и высокую оперативность (время проведения анализа - 6-8 часов). Материалом для анализа может служить мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, спинномозговая жидкость, экссудаты, моча, что позволяет эффективно выявлять как легочные, так и внелегочные формы инфекции. В настоящее время разработаны и появились на рынке ПЦР-наборы для определения устойчивости микобактерий к антибиотикам.

Применение ПЦР в клинике инфекционных заболеваний

Сегодня наиболее всесторонние преимущества ПЦР при диагностике вирусных заболеваний можно продемонстрировать, рассматривая инфекционный процесс, обусловленный вирусом гепатита С (ВГС).

Особую диагностическую ценность ПЦР для обнаружения этого вируса представляет по следующим причинам: 1) отсутствие способа культивирования ВГС; 2) наборы для антигенной диагностики не существуют; 3) реакция образования антител к ВГС настолько замедлена, что диагноз во время острой фазы инфекции, как правило, поставить невозможно.

Поэтому в настоящее время становится общепризнанным использование технологии ПЦР для диагностики, контроля качества лечения и эпидемиологического анализа заболеваемости, обусловленной ВГС. При этом только технология ПЦР позволяет решать следующие задачи: 1) проводить диагностику острой инфекции при позднем выявлении антител к ВГС; 2) осуществлять этиологическую диагностику хронического гепатита С у иммуносупрессированных пациентов; 3) оценивать эффективность противовирусной терапии; 4) выявлять виремию у доноров крови с нормальным уровнем аминотрансфераз; 5) определять возможную контаминацию препаратов крови; 6) оценивать широту распространения гепатита С.

Кроме диагностики вирусных гепатитов ПЦР нашла применение в диагностике таких заболеваний, как СПИД, сальмонеллез, дифтерия, бруцеллез, холера, токсоплазмоз, туляремия и др.; в **гастроэнтерологии** - для выявления геликобактериоза.

Ошибки при использовании метода ПЦР

Применение метода ПЦР требует строгого соблюдения правил в организации работы и проведении всех этапов анализа. Отсутствие достаточного опыта использования амплификационных технологий и стереотипы мышления персонала, ранее работавшего в биохимических или бактериологических лабораториях, могут приводить к ошибкам, результатом которых может стать неверное - ложноотрицательное или ложноположительное заключение. Другой вид ошибок связан с неверно выбранной диагностической стратегией обследования больного либо с неправильной интерпретацией врачом результата ПЦР-анализа вследствие неверных представлений о биологии исследуемого инфекционного агента и о возможностях метода ПЦР. Ошибки первого рода приведены в таблице 3.

Таблица 3. Ошибки, встречающиеся при проведении ПЦР-диагностики

Характер ошибки	Причина ошибки	Следствие ошибки	Возможность лабораторного контроля ошибки	Способы предотвращения ошибки
Контаминация пробы на стадии забора материала	Использование при заборе пробы инструментария, пробирок, перчаток и др. материалов, загрязненных "положительной" ДНК	Ложноположительный результат	Невозможен	Использование разового инструментария и материалов; повышение образовательного уровня медицинского персонала
Загрязнение пробы примесями, ингибирующими ПЦР	Проба содержит примеси ингибиторов ПЦР. Сильными ингибиторами являются гемоглобин, гепарин	Ложноотрицательный результат	Осуществляется при использовании тест-систем с внутренним контролем	Использование разового инструментария и материалов; соблюдение правил забора материала
Забор материала выполнен неадекватно, в пробе отсутствуют клеточные структуры.	Несоблюдение правил забора материала (вместо соскоба клеток собрана поверхностная слизь)	Ложноотрицательный результат	В некоторых случаях возможен при визуальном контроле	Соблюдение правил забора материала; использование специальных одноразовых щеточек-зондов
Разрушение ДНК при транспортировке и хранении пробы	Несоблюдение правил транспортировки и хранения проб	Ложноотрицательный результат	Невозможен	Соблюдение правил транспортировки и хранения проб
Потери ДНК во время пробоподготовки	Несоблюдение инструкции выделения ДНК; использование некачественных реактивов	Ложноотрицательный результат	Возможен при проведении положительного образца через все стадии пробоподготовки	Соблюдение инструкции выделения ДНК; использование качественных реактивов
Контаминация в отдельных пробах	Нарушение правил работы в ПЦР-лаборатории; использование одного наконечника при обработке разных проб; при внесении реагентов наконечник касается стенок пробирки; загрязнение дозатора	Ложноположительный результат	Возможен при постановке параллельных проб	Соблюдение правил работы в ПЦР-лаборатории; инструкции выделения ДНК и постановки ПЦР; использование наконечников с фильтрами
Тотальная контаминация	Загрязнение реагентов, дозаторов "положительной" ДНК	Ложноположительный результат	Осуществляется при постановке отрицательного контроля	То же

С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Это, прежде всего, ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб. Поскольку, эти процедуры могут осуществляться вне ПЦР-лаборатории, большое внимание следует уделять обучению медицинского персонала, выполняющего забор проб, так как именно от него во многом зависит качество ПЦР-анализов. Случаи тотальной контаминации выявляются без труда по появлению линии "положительной" ДНК во всех пробах, включая отрицательный контроль. Реагенты, загрязненные "положительной" ДНК, подлежат ликвидации. Повторная реакция ставится с новыми реагентами. Гораздо более сложно выявить случаи контаминации в отдельных пробах. Это можно сделать при проведении выделения ДНК и постановке реакции в 2-х или 3-х параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления линии "положительной" ДНК в отрицательном контроле свидетельствуют о возможности контаминации и в пробах.

Как показывает практика, при соблюдении правил работы и выполнении требований инструкций во время постановки ПЦР вероятность ошибок невысока. По мнению многих авторов, точность ПЦР-анализа составляет в среднем 95%, что выше точности других лабораторных методов, применяемых в диагностике инфекционных заболеваний.

Вторую группу составляют ошибки, связанные с неверной диагностической стратегией врача, использующего ПЦР-диагностику. Приведем примеры таких ошибок.

Врач не учитывает специфичность используемых тест-систем. Больной А. с предполагаемым диагнозом "респираторный хламидиоз" направлен на исследование хламидий в соскобе с задней стенки глотки. При постановке ПЦР использовалась видоспецифическая тест-система, выявляющая фрагмент генома *S. trachomatis*. Результат исследования отрицательный. Врач снимает предполагаемый диагноз. Однако у больного может иметь место инфекция, вызванная *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, которые не улавливаются данной тест-системой. Поэтому при назначении ПЦР-исследования больному врач должен четко представлять границы специфичности применяемых тест-систем.

Врач не учитывает особенности персистенции и элиминации возбудителя. Больная Б. с хроническим хламидийным цервицитом направлена на контрольное исследование через 1 неделю после окончания курса антибиотикотерапии. Результат анализа положительный. Делается вывод о неэффективности проведенной терапии. Такое заключение может быть ошибочно в силу того, что погибшие и персистирующие хламидии дают положительный результат ПЦР-анализа. Окончательный вывод об излеченности можно сделать не ранее, чем через 5-6 недель после курса антибиотикотерапии. Это срок необходим для смены эпителиального слоя, в клетках которого паразитируют хламидии.

Следует обратить внимание на случаи несовпадения результатов ПЦР-анализа с результатами других исследований, например, с результатами определения антител к возбудителю методом иммуноферментного анализа (ИФА). Рассмотрим случай, когда ПЦР-анализ на хламидии дает отрицательный результат при положительном титре противохламидийного IgG. Причиной подобного расхождения могут быть: 1) "иммунологический след" - остаточный уровень IgG после ранее перенесенной хламидийной инфекции. У некоторых людей повышенный уровень антител может сохраняться многие месяцы и годы после полного выздоровления, что связано с индивидуальными особенностями иммунной системы; 2) при проведении ИФА использовалась родоспецифическая тест-система, выявляющая все виды хламидий, в том числе, респираторные - *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, а при проведении ПЦР-анализа - видоспецифическая на *S. trachomatis*. В случае хламидийной инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, результат ИФА будет положительным, а результат ПЦР-анализа - отрицательным; 3) материал для ПЦР-анализа получен не из места локализации инфекционного агента. Например, при хроническом сальпингите хламидии могут быть обнаружены в области шейки матки, а наличие инфекционного процесса будет сопровождаться выработкой антител.

Возможна и обратная ситуация, когда при положительном результате ПЦР-анализа не выявляются специфические антитела. При хронических инфекциях, которые зачастую сопровождаются иммунодепрессией, такая картина бывает не редко. Так при хроническом хламидиозе до 5% больных имеют титр противохламидийных антител, не превышающий критического уровня. При первичной инфекции следует также учитывать серонегативный период, когда, несмотря на клинические проявления заболевания антитела класса IgG в крови не выявляются. Для урогенитальных инфекций этот период может составлять до 2-х недель.

Приведенные примеры показывают, 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.