ВЕКТОР БЕСТ

XI Байкальский форум по противодействию ВИЧ-инфекции

Обеспечение качества исследований методом ПЦР

Кашина Елена Валентиновна, старший старший специалист по продукции, АО «Вектор-Бест»

Качественные методы:

- ✓ Безопасность переливания крови
- ✓ Диагностика инфекционных заболеваний
- ✓ Контроль излеченности
- ✓ Генотипирование
- ✓ Определение мутаций лекарственной устойчивости

Ошибка – действие персонала лаборатории или ЛПУ, приводящее в итоге к неправильному диагнозу для пациента

ПЦР - метод, позволяющий получить многократное удвоение целевого участка ДНК при помощи ферментов in vitro

Количественные методы:

- ✓ Определение вирусных нагрузок
- ✓ Определение бактериальных нагрузок
- ✓ Анализ биоценозов
- ✓ Оценка терапевтического эффекта
- ✓ Прогноз эффективности терапии
- ✓ Определение устойчивости
- ✓ Физическое состояние патогена и активность его генов

ВЕКТОР БЕСТ

ПЦР-диагностика: преимущества и недостатки метода

Плюсы:

- **высокая чувствительность**
- **универсальность** (широкий спектр биоматериала)
- **широкий охват** (может выявить сразу нескольких возбудителей болезни)
- **оперативность**
- **точность** (ПЦР практически никогда не дает ложно-положительных/отрицательных результатов, если была соблюдена технология анализа)
- **доступность** (относительно невысокая стоимость анализа)

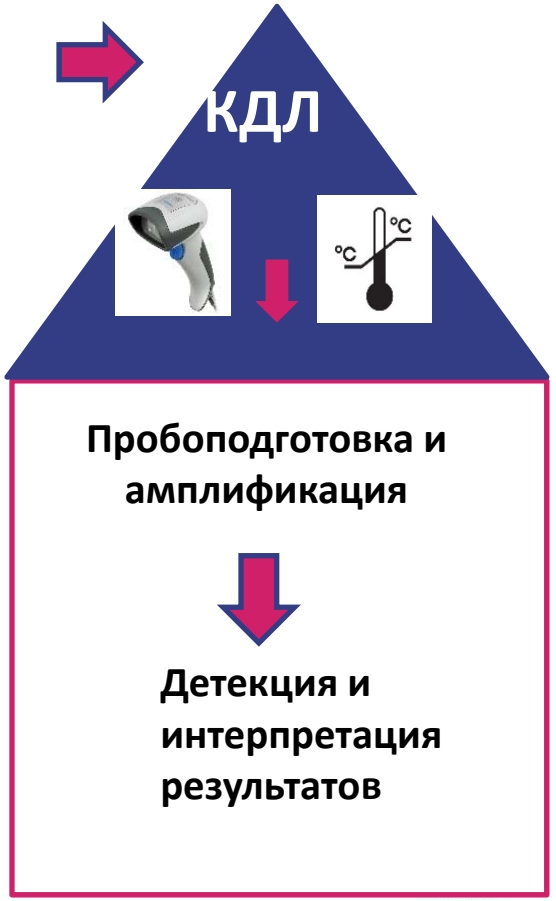
Минусы: высокие требования к соблюдению технологии и профессионализму персонала!

ВЕКТОР БЕСТ

Этапы ПЦР-диагностики

Взятие биопробы

Транспортировка



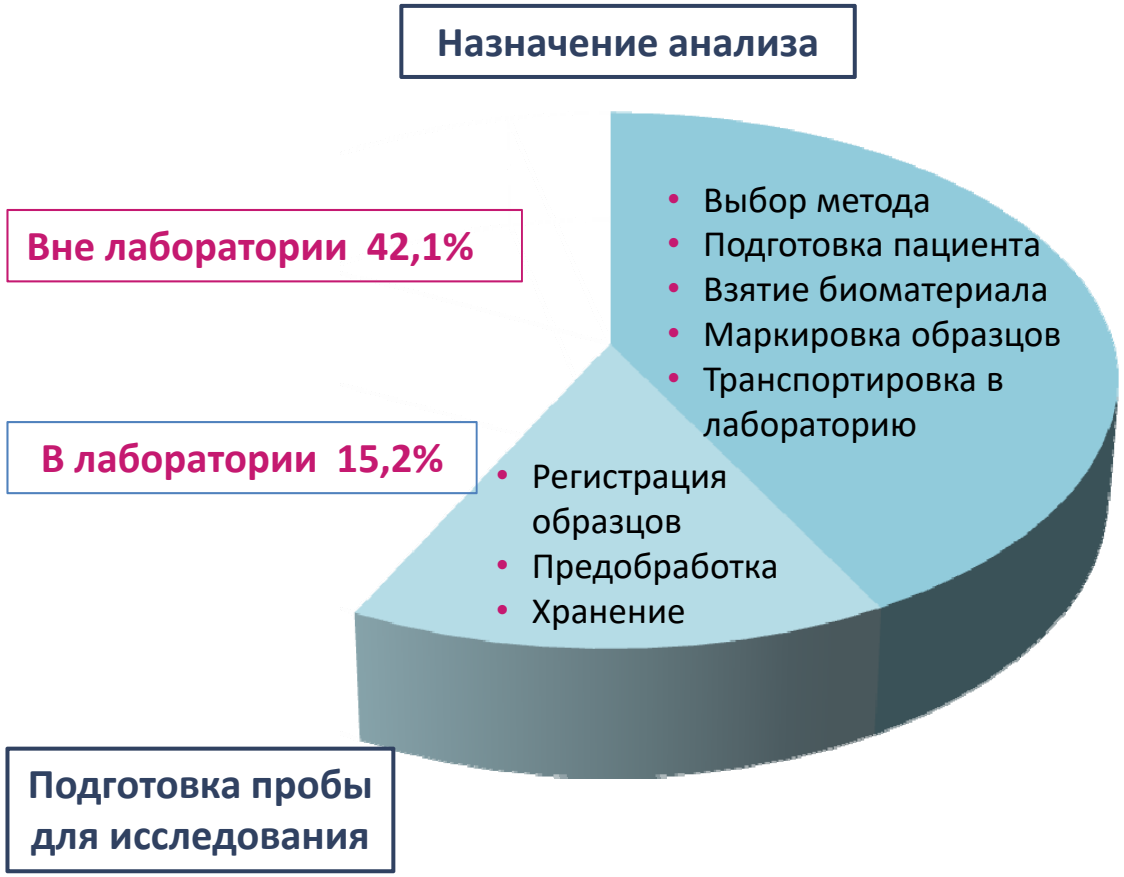
Передача результатов клиницисту

Назначение анализа

ВЕКТОР БЕСТ

Преаналитический этап

от 46 до 68% всех лабораторных ошибок

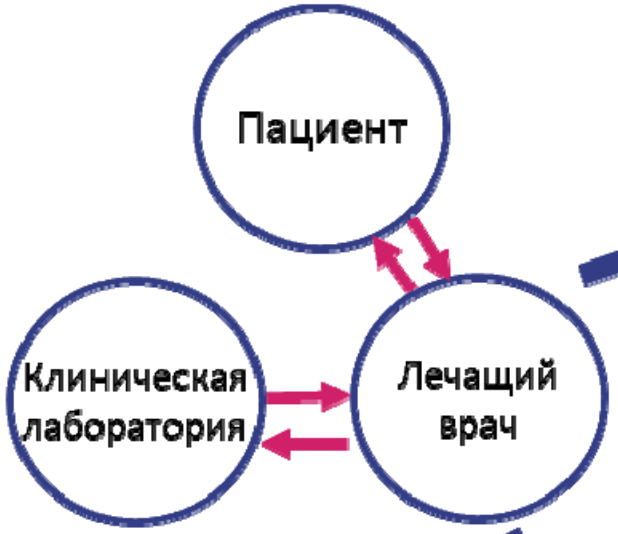


~ 25% ошибок в преаналитике имеют последствия для пациентов!

70- 85% клинических решений принимаются по результатам лабораторных анализов

ВЕКТОР БЕСТ

Взаимодействие на внелабораторном преаналитическом этапе



- ✓ Достоверный и подробный анамнез
- ✓ Правильный выбор объекта исследования
- ✓ Правильный выбор формата исследования
- ✓ Своевременность исследования
- ✓ Соблюдение пациентом правил подготовки к исследованию
- ✓ Корректное взятие материала

Персонал различных отделений ЛПУ

- ✓ Хранение биоматериала до доставки в лабораторию
- ✓ Условия и срок его доставки в лабораторию

ВЕКТОР БЕСТ

Клиницисты vs врачи КЛД

- Ищем не то или не в том месте (e.g. ДНК *C. trachomatis* в плазме крови)
- Не соблюдаем период элиминации (ПЦР-контроль не раньше, чем через 4 недели после окончания терапии**!**)
- «Носительство» ≠ «заболевание» (e.g. ПЦР-тест на наличие ДНК *G. vaginalis* в качественном формате)
- Лаборатория не ставит диагноз, но несет ответственность за результат анализа!

ВЕКТОР БЕСТ

Общие требования к образцам биоматериала для ПЦР-анализа

из места локализации инфекционного процесса / локализации возбудителя

при наличии клинических признаков, с учётом периодов персистенции / элиминации

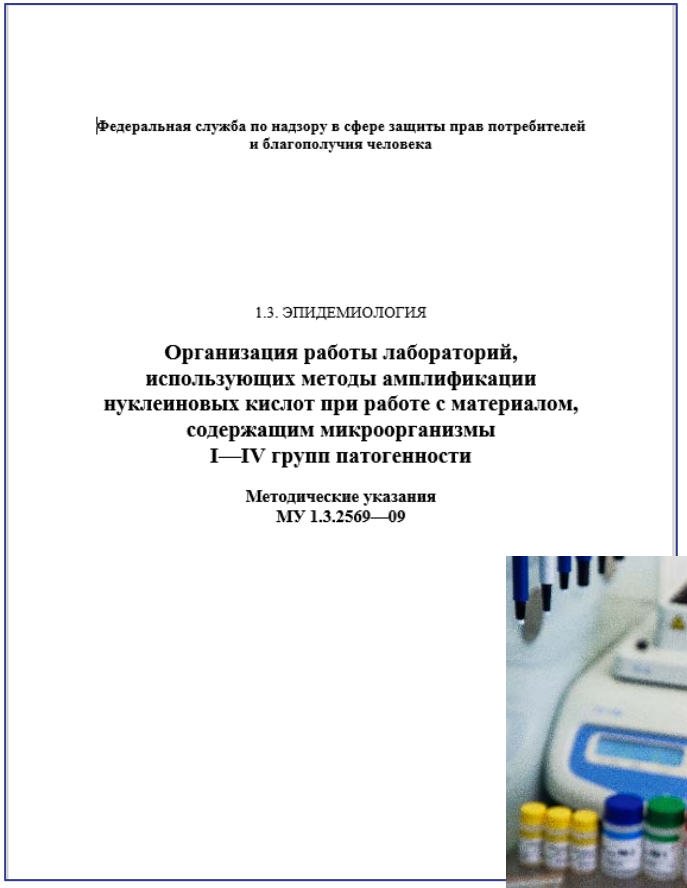
Пробы должны быть взяты

с минимальным количеством посторонних примесей (возможных ингибиторов)

только одноразовыми инструментами

ВЕКТОР БЕСТ

Правила взятия, транспортировки и хранения проб биоматериалов регламентируются:



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.2569—09

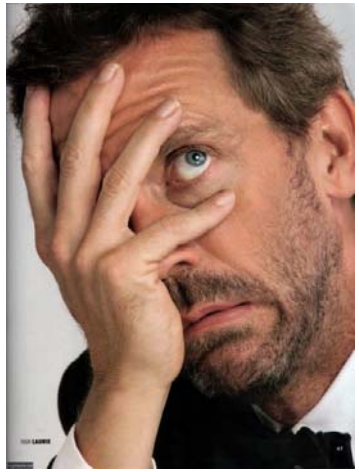
ВЕКТОР БЕСТ

Несоблюдение правил обращения с образцами биоматериала: последствия

Ошибки взятия, транспортировки, хранения

Перекрестная контаминация

Ложно «+» результат



Разрушение ДНК/РНК

Ложно «-» результат

Ошибочный результат Для пациента

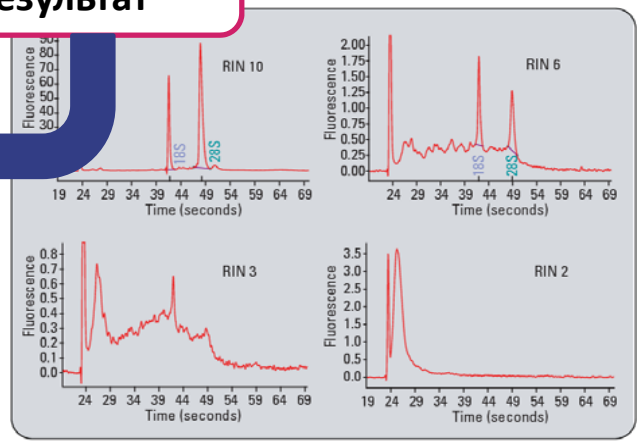


Figure 2

Общие правила транспортировки биоматериала в лабораторию

- Точное соблюдение временного диапазона доставки исследуемого материала;
- Обязательное использование термоконтейнеров, которые обеспечивают необходимый температурный режим для сохранности биологического материала;
- Все емкости для сбора и транспортировки биоматериала должны быть промаркированы в соответствии с требованиями и стандартами лабораторных учреждений;
- При транспортировке контейнеры с кровью и другим биоматериалом должны быть плотно закрыты, прочно установлены, чтобы предотвратить их опрокидывание;
- Все сопровождающие документы транспортируются отдельно от биологического материала, то есть вне контейнера.

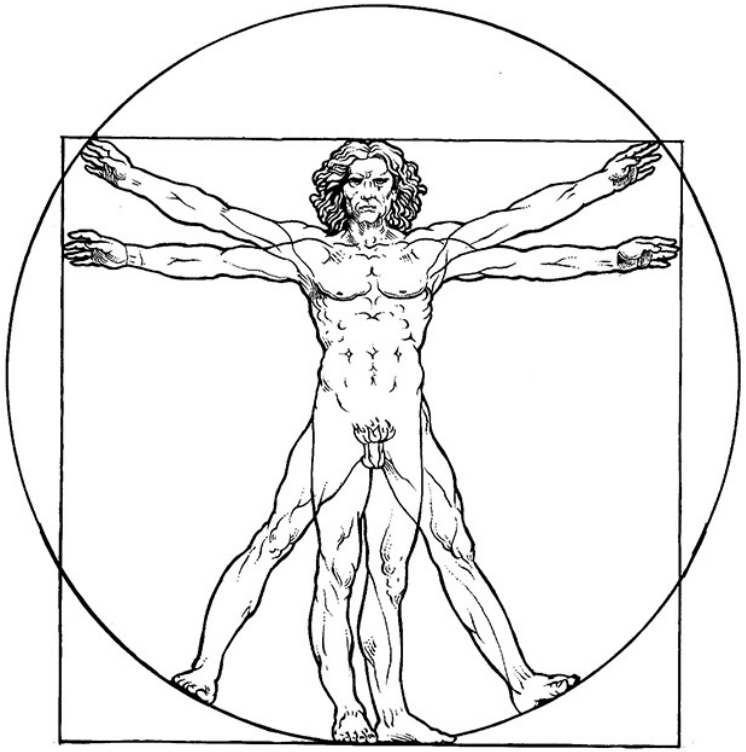
ВЕКТОР БЕСТ

Общие критерии для отказа в принятии биоматериала на исследование

- Расхождение между данными заявки и этикетки;
- Отсутствие этикетки на емкости для взятия пробы;
- Биоматериал, забранный в несоответствующую емкость (не тот антикоагулянт, консервант и т.д.);
- Гемолиз (за исключением исследований, на которые наличие гемолиза не влияет);
- Наличие сгустков в пробах с антикоагулянтом;
- Материал взят в емкости с просроченным сроком годности.

ГОСТ Р 53079.4-2008
Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Правила ведения преаналитического этапа

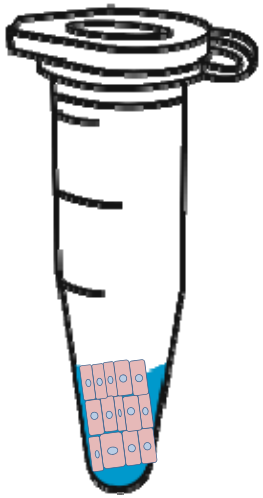
Биоматериал



- Кровь (цельная, плазма, сыворотка, лейкоцитарная фракция крови)
- Соскобы эпит. клеток из УГТ
- Околоплодные воды
- Мокрота, БАЛ
- СМЖ
- Моча
- Фекалии
- Слюна
- Соскобы из ротоглотки
- Биоптаты
- Суспензии клещей
- Пробы воды

ВЕКТОР БЕСТ

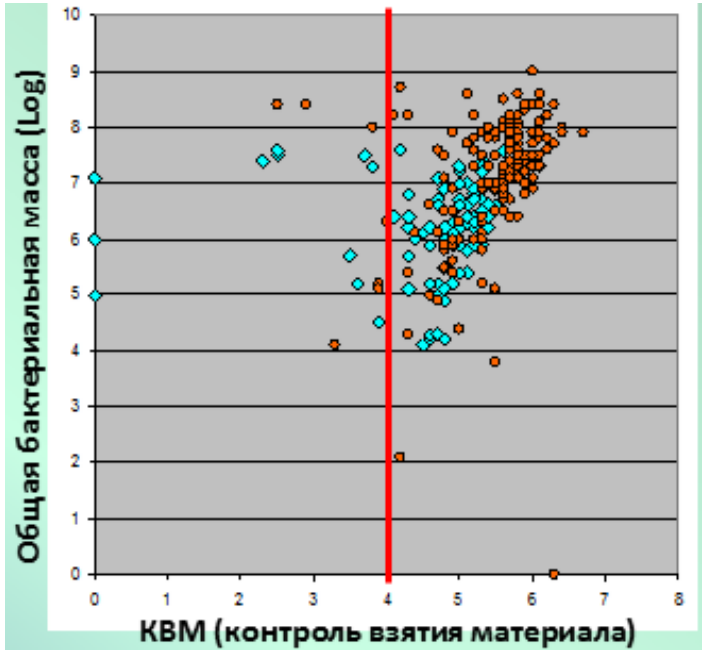
Урогенитальные соскобы (мазки):



- Должны содержать достаточное количество эпителиальных клеток
- Не должны содержать примеси (слизь, кровь, гной)
- Во избежание кросс-контаминации при взятии должен использоваться только одноразовый инструментарий
- В случае применения антибактериальных препаратов взятие образца должно осуществляться не ранее, чем через 1 месяц после окончания их приёма

ВЕКТОР БЕСТ

Ошибки при взятии урогенитальных соскобов для ПЦР-анализа



Методика взятия соскобов не поддаётся стандартизации: разные врачи берут материал по-разному. **Голубыми** и **красными** ромбами обозначены образцы, взятые разными врачами

- Несоблюдение пациентом правил подготовки к исследованию
- Несоблюдение врачом техники взятия соскоба, проведение исследования без учёта периодов персистенции/элиминации патогена
- Индивидуальные особенности пациента: фаза цикла, приём препаратов, физиологические или патологические изменения состояния слизистой…

ВЕКТОР БЕСТ

Образцы плазмы и сыворотки крови

Какие факторы могут повлиять на качество ПЦР-анализа?

Диета: 8-часовое голодание не требуется, диета обычная, но накануне строго запрещен приём алкоголя и большого количества жирной пищи

Антикоагулянт: для взятия биоматериала необходимо выбирать вакуумные пробирки с ЭДТА

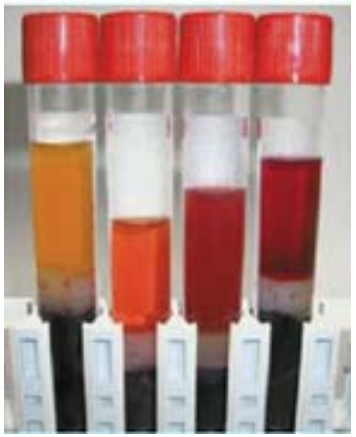
Недопустимо брать для исследования образцы крови с гепарином. При отборе пробы из периферического катетера предварительно промыть его физиологическим раствором в объёме, сопоставимом с объёмом катетера, не брать для ПЦР-анализа первые 5 мл выпущенной крови

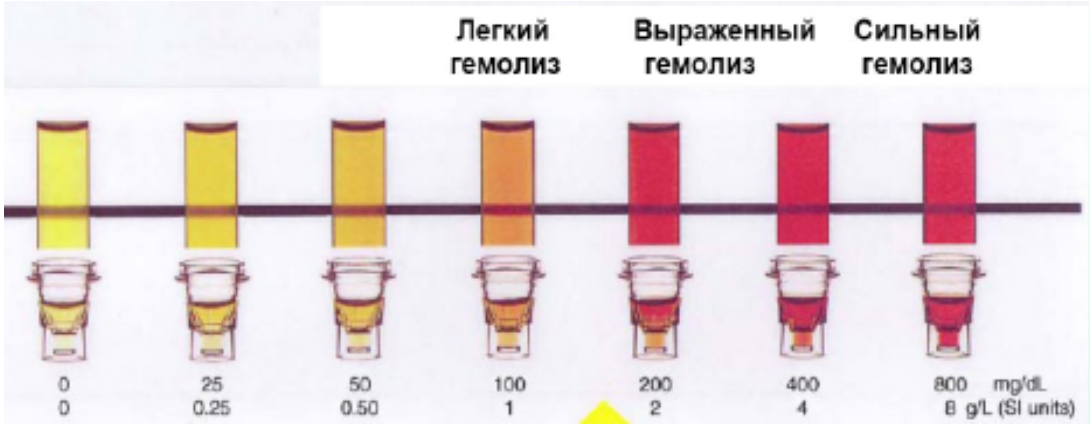
Противовирусная терапия: метаболиты противовирусных препаратов – ингибиторы ПЦР, поэтому для контроля эффективности ПВТ образцы крови следует забирать накануне введения очередной дозы ПВП, а не после

ВЕКТОР БЕСТ

Нестандартные образцы: гемолиз и липемия

Гемолизированные образцы





Липемические (хилёзные) образцы

- **Чем выше содержание гемоглобина или хиломикронов в образце, тем меньше вероятность успешного прохождения ПЦР**
- **Гемолиз и липемия - основание для требования повторного взятия б/м в странах ЕС и США**

ВЕКТОР БЕСТ

Преаналитический этап: основные меры для обеспечения качества

Долабораторный этап:

- Разработка бланков для клиницистов
- Разработка правил взятия образцов биоматериала и подготовки пациента (инструкции)
- Стандартизация методов взятия образцов биоматериала

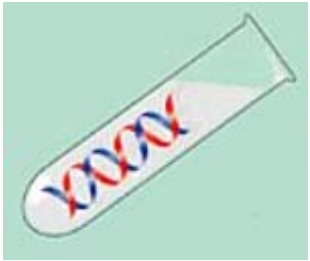
Внутрилабораторный этап:

- Соблюдение сроков взятия образцов биоматериала (с указанием даты взятия и даты доставки)
- Контроль за правильностью хранения образцов (контроль за температурным режимом холодильников)
- Контроль за правильностью заполнения бланков клиницистами
- Контроль качества доставляемого материала
- Штрих-кодирование и автоматическая регистрация образцов

ВЕКТОР БЕСТ

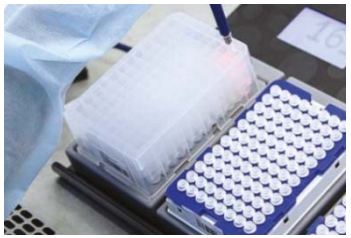
Аналитический этап ПЦР-диагностики

I. Пробоподготовка и экстракция ДНК/РНК



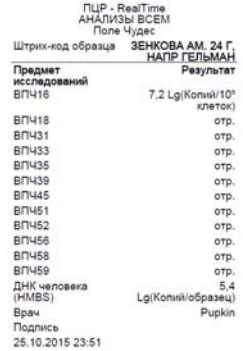
- Регистрация и сортировка первичных образцов
- Выбор метода экстракции в зависимости от вида биоматериала
- Экстракция ДНК/РНК

II. Амплификация (± обратная транскрипция)



- Сбор реакционных смесей
- Внесение выделенных НК в ПЦР-пробирки
- Выбор протокола реакции
- Проведение ПЦР/ОТ-ПЦР

III.Детекция и интерпретация результатов



ПЦР - RealTime
АНАЛИЗЫ ВСЕМ
Поле Чудес

Штрих-код образца	ЗЕНКОВА АМ. 24 Г. НАПР ГЕЛЬМАН
Предмет исследований	**Результат**
ВПЧ16	7,2 Lg(Копий/10⁶ клеток)
ВПЧ18	отр.
ВПЧ31	отр.
ВПЧ33	отр.
ВПЧ35	отр.
ВПЧ39	отр.
ВПЧ45	отр.
ВПЧ51	отр.
ВПЧ52	отр.
ВПЧ56	отр.
ВПЧ58	отр.
ВПЧ59	отр.
ДНК человека (HMBS)	5,4 Lg(Копий/образец)
Врач	Pupkin
Подпись	
25.10.2015 23:51	

- Анализ и валидация полученных результатов
- Формирование и выдача бланков (или отправка бланков клиницисту, по *e-mail*)

ВЕКТОР БЕСТ

Аналитический этап: причины ошибок и их последствия

Основные причины ошибок:

- неправильная организация ПЦР-лаборатории и/или неверные действия персонала (несоблюдение требований нормативных документов, инструкций)
- ошибки в процессе проведения пробоподготовки
- ошибки в процессе проведения ПЦР/ОТ-ПЦР
- ошибки при интерпретации результатов

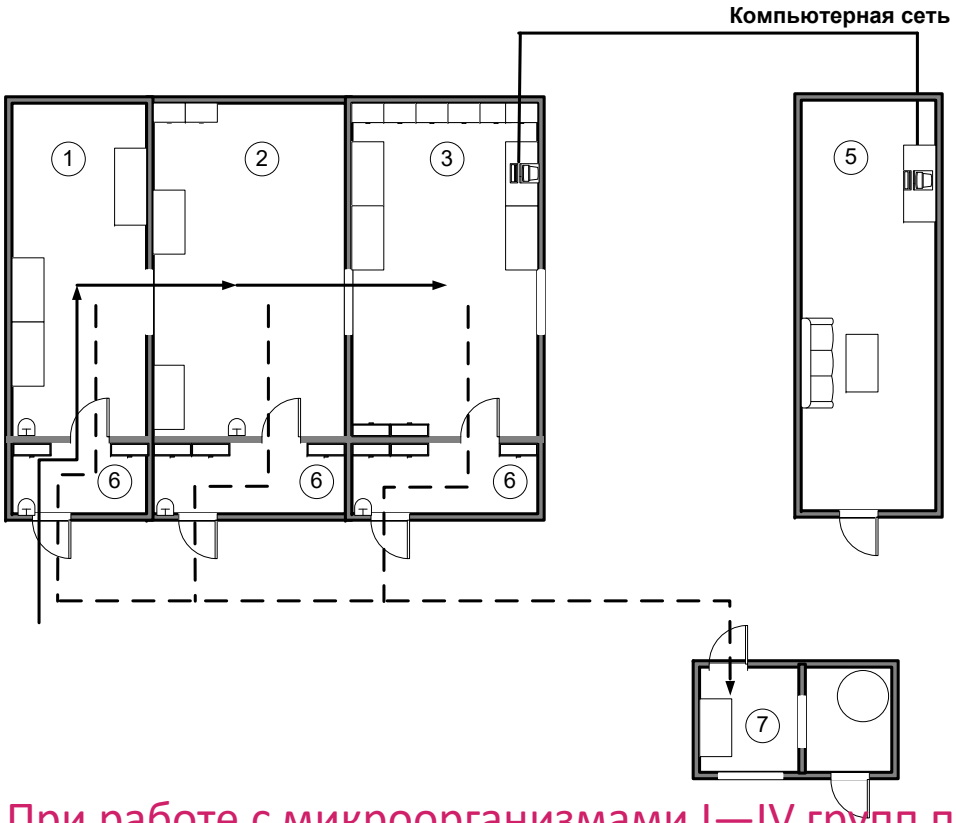
Следствия ошибок:

- неверные результаты (ложно «+» и ложно «-»)
- Контаминация!

ВЕКТОР БЕСТ

Аналитический этап: неправильная организация ПЦР-лаборатории

Устройство ПЦР-лаборатории регламентируется МУ 1.3.2569-09



1) рабочая зона – 1;
2) рабочая зона – 2;
3) рабочая зона – 3 (подзоны 3а и 3б);
4) рабочая зона 4-1;
5) вспомогательное помещение (комната анализа результатов);
6) предбокс;
7) вспомогательное помещение (комната обеззараживания материала с автоклавом);

При работе с микроорганизмами I—IV групп патогенности выбор типа СИЗ проводится в строгом соответствии с СП и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности

ВЕКТОР БЕСТ

Выбор методики экстракции НК

- Что именно мы хотим выделить (ДНК, РНК или суммарно НК)
- Биоматериал, из которого нам нужно выделить НК
- Вручную/автоматизированная станция
- Стоимость, время выделения НК, универсальность, чувствительность/объем выделения

Выделение НК в “ручных вариантах” – наиболее трудоемкая стадия ПЦР-анализа и основной источник невоспроизводимости результатов (высокий вклад человеческого фактора)

ВЕКТОР БЕСТ

В некоторых случаях требуются дополнительные процедуры

“Сложные” пробы:

Кал, мокрота, цельная кровь, соединительная ткань, кость, срезы парафиновых блоков после формалинизации, высушенные цитологические препараты и т.п.

Мокрота – предварительная обработка муколитиком, разжижающим слизь (N-ацетилцистеин и пр.)

Цельная кровь (выделение геномной ДНК) – предварительная обработка гемолитиком (лизис эритроцитов) с последующей отмывкой ядерных клеток от раствора, содержащего лизат эритроцитов

Срезы парафиновых блоков после формалинизации – предварительная депарафинизация с использованием минерального масла, ксилола или щелочи

ВЕКТОР БЕСТ

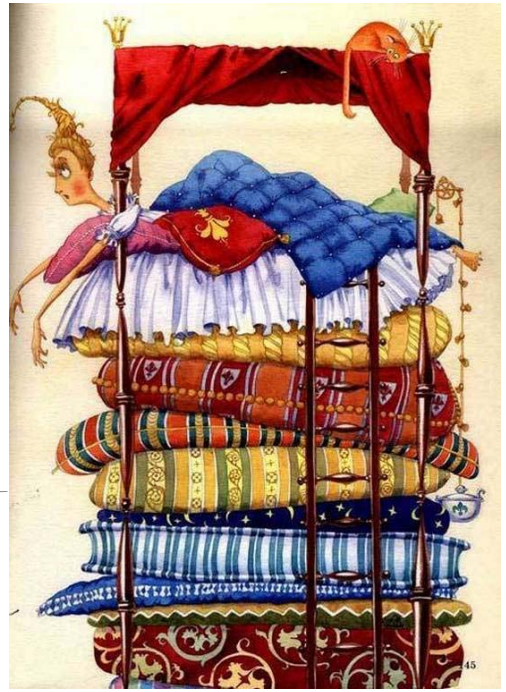
Особенности экстракции РНК

– выделение РНК, очищенной от ДНК, представляет собой проблему – поэтому нет клинических диагностических наборов для выделения только РНК (есть ДНК+РНК)

– необходима защита от РНКаз

– высокая вероятность деградации

– правильное хранение как первичного биоматериала, так и выделенного элюата!



*В наборах реагентов используются агенты, ингибирующие РНКазы, начиная с разрушения клеток или вирусов (например, DTT в лизирующем буфере)

ВЕКТОР БЕСТ

Автоматизированная пробоподготовка

RealFly

Станции полуавтоматического варианта выделения:

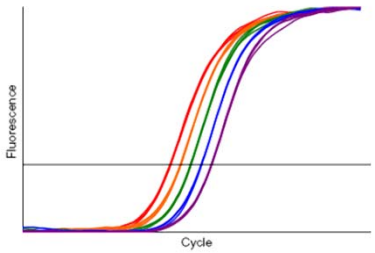
- высокая пропускная способность: 96 образцов за 15-80 минут
- исследование образцов объемом до 500 мкл
- Необходимы предварительные ручные манипуляции (розлив растворов, внесение биоматериала)

Станции полного цикла выделения:

- количество образцов за цикл – от 1 до 96
- исследование образцов объемом до 1 мл
- полностью автоматизированный процесс
- необходимо ежегодное ТО

ВЕКТОР БЕСТ

Система контрольных образцов



«Упрощённый» вариант интерпретации:

образец положителен, если есть прирост флуоресценции и по окончании амплификации определяется значение Ct

! На любом этапе ПЦР-анализа (пробоподготовка, амплификация) могут возникать ситуации, которые могут привести к ошибкам в интерпретации результатов:

- исходный образец содержал ингибиторы ПЦР – ложно «-» результат
- на этапе экстракции были потери биоматериала - ложно «-» результат
- образец был контаминирован – ложно «+» результат
- были нарушены условия хранения образца или реагентов – ложно «-» результат

↓

Необходима система контроля!

ВЕКТОР БЕСТ

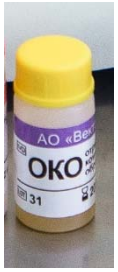
Система контрольных образцов:

ВКО – добавляется в каждую пробирку:

- контролирует эффективность выделения НК (качество образцов – наличие ингибиторов, качество работы исполнителя – потери материала на этапе отмывок, ошибки дозирования)
- контролирует качество амплификации в каждой пробирке
- необходим для правильной интерпретации результатов постановки и определения валидности каждого результата!

ПКО – 1 пробирка на каждый отдельный маркер:

- позволяет удостовериться в сохранности ПЦР-смеси
- в количественных оценках может использоваться как образец сравнения
- контролирует работу набора реагентов в целом



ОКО – 1 пробирка на каждый отдельный маркер

- контролирует риск возникновения контаминации на стадии анализа
- является показателем «чистоты» работы исполнителя анализа
- контролирует качество набора реагентов

ВЕКТОР БЕСТ

Система контрольных образцов:

А также калибраторы (КО1 и КО2) или 3 ПКО в случае количественного анализа

А также СПКО – слабоположительный контрольный образец (в наборах «Вектор-Бест»)

А также «норма» и «мутация» - в наборах для выявления генетических полиморфизмов

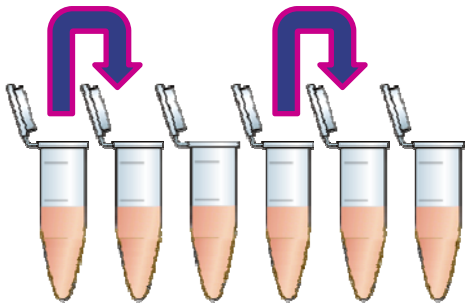
А также «валидация образца» - в сочетании с наборами для выявления урогенитальных инфекций

ВЕКТОР БЕСТ

Контаминация в ПЦР-диагностике:

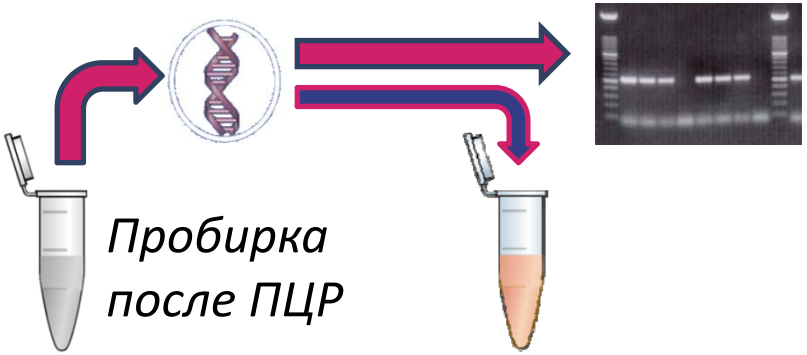
попадание из внешней среды **в анализируемый образец /реакционную пробирку** молекул **НК**, способных являться матрицей для ПЦР

Кросс-контаминация



Возникает из-за попадания НК из одной пробы (положительной) в другую (отрицательную)

Контаминация ампликонами



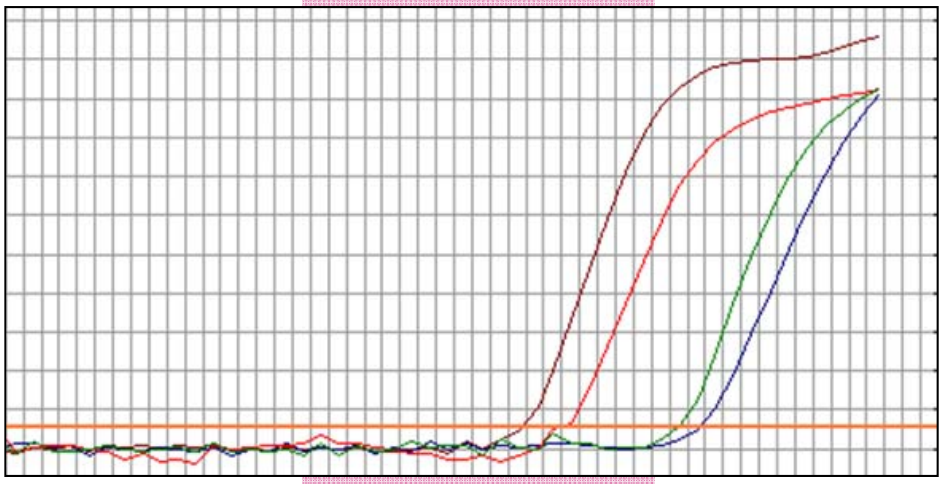
Возникает из-за попадания в пробу ампликонов от предыдущего исследования (открывание пробирок после прохождения ПЦР)

ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ!

ВЕКТОР БЕСТ

Контаминация на аналитическом этапе

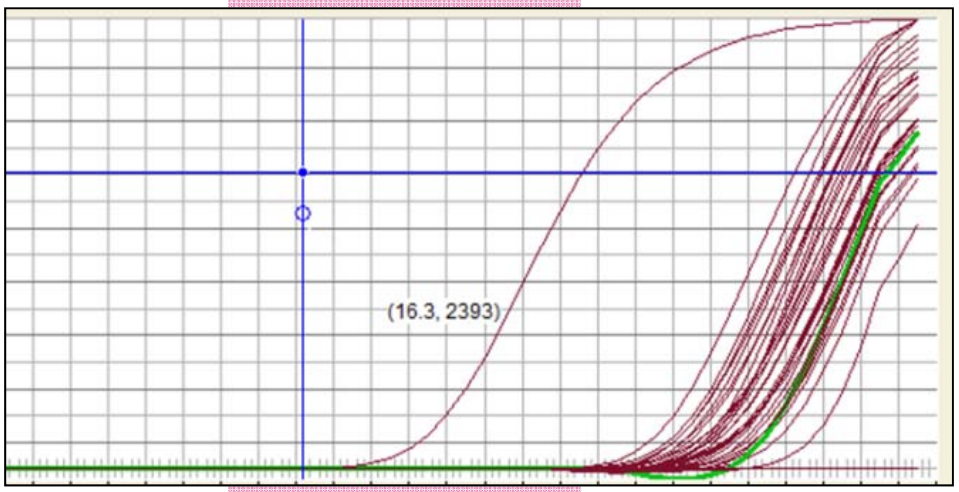
Спорадическая
(не во всех пробах)



- **Неаккуратность при проведении данного исследования**

Быть аккуратнее ☺

Тотальная
(во всех пробах)



- **Контаминация ампликонами**
- **Контаминированные растворы, пипетки и т.п.**

Нужна деконтаминация ☹

ВЕКТОР БЕСТ

Деконтаминацинационные мероприятия

Верный алгоритм действий:

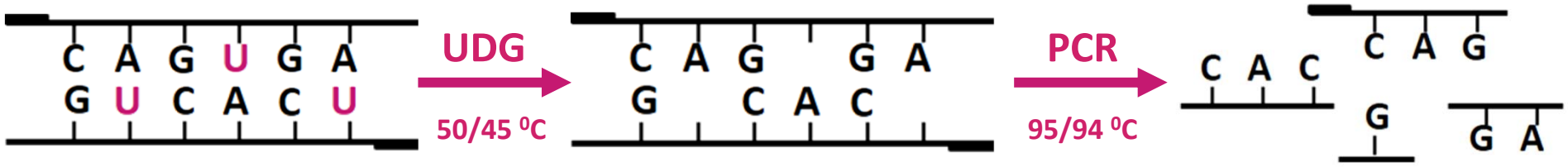
1. При подозрении на контаминацию – взять смывы! Много, очень много! При поиске очага контаминации – не проводить выделение!
2. Утилизировать расходные материалы и все, что не жалко ☺
3. Обработку поверхностей осуществлять от периферии к центру (очагу) – т.е. от чистого к грязному
4. УФО
5. Повторить пункты 3 и 4
6. Повторно взять смывы

Деконтаминационные мероприятия продолжаются до «чистых» смывов!

ВЕКТОР БЕСТ

Снижение риска контаминации: зачем нужен УДГ в наборах?

- В состав ГРС в дополнении к dTTP вводится dUTP и фермент УДГ. В итоге, после окончания ПЦР все ампликоны содержат урацил
- В начале следующего ПЦР-исследования РС обрабатывается УДГ (2 мин. при 50 ^{0}C в протоколе ПЦР или 30 мин. при 45 ^{0}C – в RT-PCR)
- В процессе начального этапа денатурации модифицированные ампликоны расщепляются при повышенной температуре (+ 95°C)



ампликоны с урацилом

модиф. ампликоны

расщепление

Аналитический этап: что еще важно учитывать?

- При необходимости исследования единого первичного образца разными диагностическими методами **первая аликвота должна отбираться для ПЦР-анализа** наконечником с фильтром
- Для каждого бокса желательно **наличие не менее двух комплектов автоматических дозаторов** – для «чистых» и «грязных» работ («чистые» – это растворы реагентов, ВКО; «грязные» – образцы, ПКО, ОКО)
- **Обязательная смена перчаток на разных этапах ПЦР-анализа**
- На этапе выделения НК открывание пробирок должно осуществляться только после **тщательного сброса капель микроцентрифугированием**, *и рекомендуется* использование «открывашек» (либо одноразовое, либо с обязательной обработкой ДС)

ВЕКТОР БЕСТ

Постаналитический этап: причины ошибок

Неверная интерпретация врачом результатов ПЦР-анализа:

- непринятие во внимание особенностей персистенции и элиминации возбудителя
- неверная интерпретация результатов количественного ПЦР-анализа (отсутствие валидации при диагностике ИППП, ошибки расчётов)
- Ошибки при интерпретации результатов
- Ошибки в выдаче результатов исследований (ЛИС)

***! Несовпадение результатов различных методов исследования не говорит об ошибке (период серологического окна, иммунологический след, разная чувствительность методов…)**

ВЕКТОР БЕСТ

РЕЗЮМЕ: основные меры для обеспечения качества ПЦР диагностики

- Тесный контакт с клиницистами и пунктами забора (стандартизация методов взятия, оценка качества образцов)
- Применение штрих-кодирования, использование ЛИС
- Правильная планировка помещений и организация работ в ПЦР-лаборатории
- Валидация каждой постановки при помощи системы контрольных образцов

ВЕКТОР БЕСТ

РЕЗЮМЕ: основные меры для обеспечения качества ПЦР диагностики

- Автоматизация ключевых процессов ПЦР-анализа, своевременное ТО приборов
- Использование стандартизованных и хорошо апробированных наборов реагентов и программного обеспечения на валидированных приборах
- Автоматическая распечатка и электронная доставка результатов врачу-клиницисту
- Внешний и внутрилабораторный контроль качества исследований

ВЕКТОР БЕСТ

ВЕКТОР БЕСТ

Правильность постановки диагноза зависит от всех заинтересованных лиц: пациента, клинициста, врача КЛД…

Всё в наших руках!