**Занятие 13.**

**Тема: Ошибки, приводящие к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР.**

**Вопросы, рассматриваемые на занятии:**

1. Ошибки преаналитического этапа: место взятия биологического материала; правильность взятия биологического материала; хранение биологического материала.
2. Методика получения образцов биологического материала. Идентификация образца. Приемлемость образца. Образцы, непригодные для исследования.
3. Ошибки аналитического этапа: выбор системы пробоподготовки; технологические ошибки.
4. Ошибки постаналитического этапа: ошибки интерпретации результатов ПЦР.
5. Интерпретация при несовпадении результатов при использовании ПЦР и ИФА.

**Ошибки ПЦР**

Выделяют три основных этапа при подготовке и проведении анализа методом ПЦР, в которых наиболее часто допускают ошибки, приводящие к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов:

* Преаналитический этап
* Аналитический этап
* Постаналитический этап
1. **1. Ошибки преаналитического этапа: место взятия биологического материала; правильность взятия биологического материала; хранение биологического материала. Методика получения образцов биологического материала. Идентификация образца. Приемлемость образца. Образцы, непригодные для исследования.**

Данный этап включает взятие биоматериала, его хранение и транспортировку, пробоподготовку (СП 1.2.036-95, СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08).

**Место взятия биологического материала**

В первую очередь, необходимо правильно определить место взятия биологического материала для исследования, а именно: место предполагаемой локализации инфекционного процесса. В первую очередь, это касается тех микроорганизмов, для которых известна тропность ко многим видам тканей, например, M.tuberculosis (обусловливает развитие внелегочных форм туберкулеза, в том числе: органов пищеварительной и мочеполовой систем; центральной нервной системы и мозговых оболочек; костей и суставов; кожи; глаз); C.trachomatis (вызывает воспалительные заболевания экстрагенитальной локализации – воспалительные заболевания органов малого таза и брюшины, и восходящий инфекционный процесс – поражения слизистой оболочки матки, труб, яичников, околоматочных связок). Исходя из этого, выбор универсального материала, например, мокроты для выявления кислотоустойчивых микобактерий, либо соскоба из влагалища, цервикального или мочеиспускательного каналов для выявления C.trachomatis может привести к ложноотрицательным результатам в ПЦР.

Кроме того, распространенным, но при этом ошибочным является подход к выявлению спектра патогенных микроорганизмов, особенно возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП), в крови пациента. Необходимо учитывать, что для большинства возбудителей ИППП гематогенный путь распространения не является основным, либо не доказан, соответственно, кровь, как материал для исследования, не является пригодной.

Кроме того, даже в случае присутствия в крови отдельных клеток микроорганизмов – возбудителей ИППП, вероятность их обнаружения крайне мала, поскольку оказывается ниже предела чувствительности стандартных тест-систем.

**Правильность взятия биологического материала**

Второй распространенной ошибкой преаналитического этапа является неправильное взятие материала на исследование. Даже при правильном определении места взятия материала необходимо учитывать тот факт, что он должен содержать максимальную концентрацию искомых микроорганизмов, а также быть лишен нежелательных примесей, ингибирующих ПЦР.

Так при исследовании на наличие внутриклеточных патогенов, проба должна содержать максимальное количество клеток, например, эпителиальных для выявления C.trachomatis, ВПЧ. Для выявления вируса Эпштейн-Барр (ВЭБ) и цитомегаловируса (ЦМВ) целесообразно использовать лейкоцитарную массу крови. Принципиальным является также стадия заболевания, а именно: осуществляется ли взятие материала в период ремиссии или обострения, что напрямую влияет на концентрацию искомых микроорганизмов в пробе.

Кроме того, необходимо минимизировать количество примесей в пробе, например, слизи, гноя и крови в эпителиальном соскобе, для чего их избыток необходимо удалить стерильным ватным тампоном непосредственно перед взятием образца.

Таким образом, следующей распространенной ошибкой может стать неправильная обработка материала.

**Обработка биологического материала**

При работе с кровью важно учитывать тот факт, что для предотвращения ее свертывания в процессе доставки необходимо использовать антикоагулянты. Однако, наиболее распространенный антикоагулянт – гепарин является мощным ингибитором ПЦР, поэтому его использование в данном случае недопустимо.

Относительно гепарина следует заметить, что его присутствие в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, также может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

При необходимости использовать в качестве материала для исследования мочу (клеточный осадок первой порции утренней мочи) важно тщательно промыть пробу физиологическим раствором.

Это обусловлено тем, что осадок содержит большое количество солей и мочевины, которые, при использовании технологий флуоресцентной детекции, денатурируют зонды, приводя к ложноположительным результатам.

**Хранение биологического материала**

Принципиальным для получения адекватных результатов ПЦР является 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 могут разрушаться, что приведет к ложноотрицательным результатам. Образцы рекомендуется хранить при температуре от 2 до 8°С в течение 24-48 часов, для более длительного хранения необходимо замораживание.

Единственное исключение – цельная кровь, которая не подлежит замораживанию.

При проведении исследований на наличие вирусов гепатитов В и С, ВИЧ и т.д. необходимо получение плазмы крови, и в этом случае возможно однократное замораживание пробы.

В настоящее время, процессы взятия материала, его предварительной обработки, хранения и перевозки, передачи исследуемого материала в другие организации осуществляются согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций, инструкциям к наборам реагентов и в соответствии с СП 1.2.036-95, СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08.

**3. Ошибки аналитического этапа: выбор системы пробоподготовки; технологические ошибки.**

**Выбор системы пробоподготовки**

Проведение собственно лабораторного исследования также может сопровождаться рядом ошибок, среди которых одной из основных является неправильный выбор системы пробоподготовки.

Возвращаясь к сказанному выше, наиболее часто в лаборатории используют следующие варианты пробоподготовки:

* Экспресс-методы – упрощенные методики, основанные на кипячении, протеолизе
* Сорбентные методы
* Методы одновременного выделения ДНК/РНК, выделение из цельной крови

Выбор метода выделения должен определяться характером биоматериала, степенью его загрязнения потенциальными ингибиторами ПЦР.

Использование экспресс-методов существенно сокращает время пробоподготовки, делает минимальными потери ДНК в процессе выделения и существенно сокращает риск кроссконтаминации, что представляется весьма привлекательным для рутинного использования в лаборатории.

Однако, существенным недостатком данной группы методов является низкая степень очистки пробы от ингибиторов, следствием чего 3-5% образцов дают недостоверные результаты в ПЦР.

При необходимости использования экспресс-методов со «сложными» образцами возможно введение дополнительных способов очистки и концентрации материала, например, в случае избытка слизи в пробе (для мокроты и эякулята, бронхоальвеолярного лаважа, промывных вод бронхов, трахеального смыва, синовиальной и плевральной жидкости) целесообразным является ее предварительная обработка муколитиками, типа муколизина.

Тем не менее, даже предварительная обработка материала не подходит для бактерий с крепкой клеточной стенкой и может привести к ложноотрицательным результатам в ПЦР.

В случае исследования крови на наличие вирусов, особенно относящихся к группе РНКсодержащих (ВИЧ, гепатит С и т.д.), вероятность получения ложноотрицательных результатов велика по следующим причинам: исходно низкая вирусная нагрузка и течение болезни в периоде ремиссии (концентрация вирусных частиц ниже предела чувствительности тест-системы); неравномерное распределение материала по пробиркам в дублях; нестабильность исходно выделяемой РНК; большие потери материала на этапе пробоподготовки. Повышение эффективности выделения и получение адекватных результатов ПЦР возможно при использовании гемолитика для предварительной обработки цельной крови и увеличения выхода осадка лейкоцитов.

В данном случае экспресс-методы проявляют крайне низкую эффективность, и наиболее правильным представляется использование сорбентных методов выделения или методов, позволяющих одновременно выделять ДНК/РНК. Данные методы можно определить как «универсальные».

Однако для них характерно:

– длительное время выделения; – опасность кросс-контаминации;

– потери ДНК с сорбентом; – зависимость от качества сорбента.

**Генетическая изменчивость микроорганизмов**

Вероятность получения ложноотрицательного результата может быть обусловлена изменчивостью микроорганизмов. При конструировании тест-системы в качестве мишени используется высоко консервативный участок генома. Однако изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке ДНК и становиться недоступными для анализа данной тест-системой.

Например, у 30% пациентов с установленным диагнозом «хламидиоз», обусловленным С.trachomatis, при проведении исследований методом ПЦР результат анализа был отрицательным при полном соблюдении технологии. Это обусловлено тем, что часть коммерческих тест-систем в качестве мишени использовали плазмиду патогена, тогда как патологический процесс был связан с бесплазмидными штаммами бактерий.

**Технологические ошибки**

Основной ошибкой аналитического этапа при реализации метода ПЦР с детекцией результатов с помощью гель-электрофореза является риск принять неспецифичные фрагменты за специфичные, если они близки по длине и нет возможности сравнить с К+ и маркером длин фрагментов.

Проблемой, наиболее актуальной для лабораторий, работающих с ПЦР в формате FLASH, является неправильное приготовление фоновых пробирок. В первую очередь, это связано с тем, что в разных сериях реактивов могут отличаться концентрации компонентов реакционной смеси, поэтому высока вероятность различного уровня флуоресценции. Приготовление фоновых пробирок без учета серии тест-системы может привести к большому количеству недостоверных результатов.

Кроме того, при приготовлении фонов необходимо исключить добавление в них полимеразы, так как, если в тест-систему входит внутренний контроль и/или отрицательный образец проходит стадию выделения, все отрицательные значения будут недостоверными.

Еще одним фактором возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов в ПЦР с детекцией по конечной точке может быть неправильное хранение фоновых пробирок. Это объясняется тем, что при неправильном хранении зонды в фоновых пробирках могут разрушаться, и нормировочные значения существенно увеличиваются за срок от нескольких часов до нескольких дней, при этом значения флуоресценции в образцах оказываются в большей или меньшей степени занижены.

Главным критерием достоверности полученных результатов в данном случае могут служить отрицательные пробы. При отсутствии расхождений между фоновыми и амплификационными пробирками отрицательные образцы имеют значения флуоресценции близкие к 1 или, в редких случаях, незначительно выше.

Если значения флуоресценции в одном или нескольких образцах или отрицательном контроле существенно ниже 1, с большой долей вероятности можно утверждать, что фоновые пробирки не соответствуют данному исследованию, в этом случае необходимо их поменять.

В случае неправильного хранения амплификационных пробирок (длительное пребывание пробирок при комнатной температуре) фоновая флуоресценция в них возрастает, в то время как в фоновых пробирках флуоресценция остается неизменной. В этом случае увеличивается 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 в случае контаминации встречается достаточно редко, поскольку маловероятно, что во все отрицательные пробирки попадет равное количество постороннего материала.

Несмотря на очевидные преимущества метода ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, возможны ошибки аналитического этапа, обусловленные следующим: колебанием флуоресценции в приборе, которое может быть зафиксировано программой, как ложноположительный или ложноотрицательный результат. В этом случае необходимо провести анализ индивидуальной кривой. Пороговая линия должна пересекать индивидуальную кривую в области начала экспоненциального роста флуоресценции.

**4. Ошибки постаналитического этапа: ошибки интерпретации результатов ПЦР.**

Основной проблемой постаналитического этапа является неверная интерпретация врачом результатов ПЦР-анализа вследствие ошибочных представлений об инфекционном агенте или о возможностях метода.

**Ошибки интерпретации результатов ПЦР**

Одной из наиболее распространенных ошибок при интерпретации результатов ПЦР-анализа является не принятие во внимание особенностей персистенции и элиминации возбудителя. Например, назначение контрольного исследования через 1 неделю после окончания курса антибиотикотерапии ряда инфекционного заболеваний. В подавляющем большинстве случаев результат анализа на выявление микроорганизма – возбудителя инфекции будет положительным. Из этого можно сделать вывод о неэффективности проведенной терапии. Такое заключение ошибочно в силу того, что ДНК микроорганизма может сохраняться в течение нескольких недель после его элиминации и не свидетельствует о жизнеспособности. Если речь идет о микроорганизмах, ассоциированных с эпителием, окончательный вывод об излеченности, можно сделать не ранее, чем через 5-6 недель после курса антибиотикотерапии. Это срок необходим для смены эпителиального слоя.

С другой стороны, если целью анализа является оценка состояния микрофлоры урогенитального или желудочно-кишечного трактов, то назначение исследования через 1-2 недели на фоне проведенной антибактериальной терапии, скорее всего, приведет к отрицательному результату в ПЦР. В случае сбалансированной и устойчивой системы, ее самовосстановление произойдет не ранее 2 нед. – 1 месяца, тогда проведение ПЦР анализа будет информативным и позволит оценить динамику состояния, либо определить меры коррекции.

Другая ошибка – клиническая оценка положительного результата ПЦР, определение его прогностической значимости. Показано, что только у 40% – 60% лиц с обнаруженной в крови методом ПЦР ДНК цитомегаловируса клинически может развиться заболевание. В данной ситуации при оценке результатов исследования, совершается типичная ошибка, заключающаяся в отождествлении двух принципиально различных понятий – «инфицированность» и «инфекционный процесс».

То же можно сказать и про ПЦР – диагностику инфекций, обусловленных ВПЧ. Метод ПЦР крайне важен с точки зрения возможности идентифицировать отдельные типы ВПЧ (высокого и низкого онкогенного риска). Однако существует большой риск интерпретировать положительный результат с точки зрения прогноза развития неопластических процессов шейки матки, хотя в 80-90 % случаев инфицирование ВПЧ носит кратковременный характер и заканчивается спонтанной элиминацией вируса (через 6-24 месяца). Положительный результат при лабораторном исследовании имеет значимость, если на фоне ВПЧ – инфекции имеется картина неоплазии эпителия шейки матки, что позволяет прогнозировать степень канцерогенного риска.

Еще одной ошибкой является неверная интерпретация результатов количественного ПЦРанализа. В этом случае необходимо четко определить цель назначения данного вида исследования. Например, опубликованный в 2010 г УДК [616.36-002.12:578.891]-07/08 «Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С» регламентирует количественные исследования ДНК вирусного гепатита В и, в соответствии с рекомендациями Европейской ассоциации по изучению печени 2009 г. (EASL Clinical Practice Guidelines 2009), определяет показания для проведения противовирусной терапии HBV при наличии уровня ДНК HBV в крови более 10 000 копий/мл (2000 ME/мл). Сероконверсия по HBeAg в сочетании со снижением уровня ДНК HBV ниже 2000 МЕ/мл (104 копий/мл) расценивается как достижение эффекта терапии.

Однако, проведение количественных исследований методом ПЦР для целого спектра бактериальных и вирусных инфекций на данный момент не регламентировано и не определены критерии диагностической и клинической значимости получаемых результатов. В связи с этим, интерпретация результатов исследования может носить субъективный характер и определять неверную тактику ведения пациента.

Например, количественный анализ отдельных представителей условно-патогенной флоры урогенитального тракта (Ureaplasma, Gardnerella) без учета количественных показателей ведущего представителя нормофлоры – бактерий рода Lactobacillus (обусловливает колонизационную резистентность, поддерживает кислую реакцию среды), а так же при отсутствии клинических проявлений воспаления, дисбиоза и жалоб пациента, может привести к гипердиагностике и необоснованному назначению антибактериальной терапии. Как следствие: стремительный рост антибиотикорезистентности, увеличение числа случаев рецидивирующего бактериального вагиноза и дисбиоза. Аналогичная ситуация складывается и при интерпретации результатов количественного исследования ВПЧ высокого онкогенного риска. На сегодняшний день отсутствует прямое доказательство роли исходной вирусной нагрузки в развитии неопластических процессов шейки матки и прогнозировании их исхода.

Кроме того, на этапе анализа и интерпретации результатов ПЦР возникают и другие проблемы, которые можно обозначить, как несовпадение результатов при использовании различных методов исследования (например, ПЦР и ИФА, ПЦР и бактериальный посев, ПЦР и микроскопические методы исследования).

**5. Интерпретация при несовпадении результатов при использовании ПЦР и ИФА.**

В случае сравнения результатов, полученных в ИФА и ПЦР, несовпадения могут быть следующими:

* положительный результат в ПЦР и отрицательный результат в ИФА;
* отрицательный результат ПЦР и положительный результат ИФА.

В первом случае, и это наиболее актуально для выявления вирусов гепатита С и иммунодефицита человека, данный факт может быть обусловлен наличием «серологического окна». В условиях постоянно повышающихся концентраций антигена в результате репродукции вируса происходит активное снижение концентрации антител за счёт включения их в состав иммунных комплексов «антиген-антитело». Также происходит подавление гуморального звена иммунного ответа в результате синтеза набора цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета. Как следствие, в течение инфекционного процесса наблюдается длительное «серологическое окно» от момента заражения до сероконверсии.

Обычно заметное количество антител к ВИЧ появляется в крови через 2-10 недель после заражения, однако разброс во времени может быть весьма велик. Так, у 90-95 % зараженных они обнаруживаются в течение 3-х месяцев после заражения, у 5-9 % – через 6 месяцев, а у 0,5-1 % – и в более поздние сроки.

Выявление ДНК/РНК вируса методом ПЦР позволяет уменьшить продолжительность «серологического окна» в среднем на 11 дней и обнаружить патогена уже через 1-2 недели после заражения.

Проведение ПЦР позволяет выявить РНК вируса гепатита С не только в сыворотке крови, но и в биоптате печени, что важно при подтверждении роли вируса гепатита С в формировании гепатоцеллюлярной карциномы. У подобных больных РНК вируса гепатита С регистрируется в гепатоцитах и при отсутствии anti-HCV и РНК вируса гепатита С – в сыворотке крови. У ряда больных с самоограничивающимся течением инфекции anti-HCV не появляются никогда. Кроме того, отсутствие положительных результатов ИФА на фоне положительного результата в ПЦР может наблюдаться у иммуносупрессированных пациентов и новорожденных с перинатальной инфекцией (нетипичная картина, связанная с антителами матери). Так, при хроническом хламидиозе до 5% больных имеют титр антихламидийных антител, не превышающий критического уровня.

Аналогичная проблема может возникнуть при диагностике сифилиса, в том случае, если заболевание проходит стадию первичного серонегативного сифилиса, когда стандартные серологические реакции крови еще отрицательные (первые 3-4 недели от возникновения твердого шанкра).

При заболеваниях, передающихся половым путем, скрытый период инфекции, когда уровень иммуноглобулинов не больше нормы, составляет в среднем 14 дней.

Кроме того, важно учитывать возможность высокой генетической изменчивости микроорганизмов, которая приводит к формированию серонегативных штаммов.

При обследовании новорожденных на наличие внутриутробных инфекций может быть получен ложноотрицательный результат серологического исследования не только вследствие влияния высокой концентрации материнских антител класса IgG (маскируют наличие IgM у ребенка), но и развития иммунологической толерантности.

Иммунологическая толерантность – неспособность организма к иммунному ответу на определенный антиген. Сроки ее формирования варьируют от нескольких часов до нескольких суток, а ее длительность зависит от персистенции антигена в организме и скорости образования иммунокомпетентных клеток из их предшественников. Индукции толерантности способствует неспецифическая иммунодепрессия (в том числе, под влиянием лекарственных препаратов).

Генетически обусловленная серонегативность ряда заболеваний делает их недоступными для анализа стандартными серологическими методами, а при исследовании методом ПЦР обеспечивается положительный результат, например, серонегативные спондилоартриты (ССА) – заболевания, которые характеризуются поражением крестцово-подвздошных сочленений и имеют тенденцию к семейной агрегации. В группу ССА включают 10 заболеваний: идиопатический анкилозирующий спондилоартрит, псориатический артрит, болезнь Рейтера, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь Уиппла, ювенильный хронический артрит, реактивный артрит (иерсиниозный, шигеллезный, сальмонеллезный), острый передний увеит, синдром Бехчета, объединенных наличием при обследовании HLA-B27 – антигена.

Еще один вариант несовпадения результатов ПЦР и ИФА (отрицательный результат в ПЦР и положительный результат в ИФА) может быть обусловлен выявлением «иммунологического следа» – остаточный уровень IgG после ранее перенесенной инфекции. У некоторых людей повышенный уровень антител может сохраняться многие месяцы и годы после полного выздоровления, что связано с индивидуальными особенностями иммунной системы. Другой причиной расхождения результатов может стать использование родоспецифических тест-систем для ИФА.

Например, в случае подозрений на атипичную пневмонию выбор тест-системы, выявляющей несколько видов хламидий, в первую очередь, респираторных (С. pneumonia, C. pecorum, C. рsitaci), определяет получение положительного результата. При этом, направление на анализ методом ПЦР с указанием только наиболее распространенного этиологического агента хламидийной пневмонии – С. рneumonia может привести к получению отрицательного результата. Это будет связано с использованием видоспецифической тест-системы, направленной на выявление только указанного вида микроорганизма, тогда как возбудителем инфекционного процесса может быть C. рsitaci.

Еще одним фактором несовпадения данных ПЦР и ИФА является зависимость результатов анализа методом ПЦР от используемого материала. Материал для ПЦР должен быть получен из места предполагаемой локализации инфекционного и/или неинфекционного воспалительного процесса, а для получения достоверного результата ИФА данный подход не является критичным. Например, при хламидийном сальпингите (воспаление маточной трубы) в крови пациентов будет определяться устойчивый уровень специфических антител, тогда как при анализе соскобного материала из влагалища или шейки матки методом ПЦР хламидии обнаружены не будут. Учитывая тот факт, что в 50% случаев заболевание протекает атипично интерпретация результата ПЦР как отрицательного, может привести к тяжелым последствиям, поэтому для подтверждения положительного результата ИФА и постановки диагноза показана лапароскопия (гидросальпинкс).

Тем не менее, сравнивая возможности ИФА и ПЦР в диагностике заболеваний, следует отметить, что метод ПЦР не позволяет установить стадию инфекционного процесса. В связи с этим, роль ИФА в интерпретации результатов исследования может быть весьма существенной, поскольку данный метод позволяет определить авидность антител.

Авидность – это прочность связи между антителом и антигеном, которая отражает сроки заражения и длительность инфекционного процесса. Определение индекса авидности (ИА) ниже 30-35% указывает на свежую первичную инфекцию, показатель авидности, равный или превышающий 40%, указывает на то, что в сыворотке содержатся анамнестические высоко-авидные антитела, свидетельствующие об инфекции в прошлом. ИА в интервале 31-39% может свидетельствовать о поздней стадии первичной инфекции или недавно перенесенной инфекции только при условии выявления антител в высокой концентрации.

**Сравнение результатов ПЦР и микроскопии**

На данный момент микроскопические методы исследования широко применяют в диагностике инфекционных болезней бактериальной этиологии, паразитарных и (реже) вирусных заболеваний. В повседневной практике лаборатории микроскопическое исследование, как правило, используют для ускоренной ориентировочной диагностики.

**Основные задачи микроскопии:**

* выявление возбудителя в клиническом материале;
* ориентировочная идентификация на основе определения характерных морфологических и тинкториальных признаков микроорганизмов;
* изучение окрашенных мазков из колоний чистых культур.

Этот метод рассматривается, как самый быстрый и дешевый, его использование связано с минимальными требованиями к организации лаборатории.

Тем не менее, существует ряд ограничений в использования микроскопии для диагностики инфекционных заболеваний:

* низкая чувствительность;
* субъективность оценки результатов;
* ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов;
* приблизительная количественная оценка.

Так, при диагностике трихомониаза микроскопический метод имеет самую низкую чувствительность:

* в среднем – 30% (для женщин – 50-60%, для мужчин – 10-12%), тогда как метод ПЦР достоверно
* определяет возбудителя в 90-96% случаев. Такие показатели микроскопии обусловлены потерей микроорганизмом характерной подвижности после извлечения во внешнюю среду.

Особенно затруднительна диагностика в случае низкотитражных препаратов или препаратов, содержащих значительное количество клеток эпителия и лейкоцитов. В очаге воспаления трихомонада часто представлена округлыми формами, напоминающими полиморфноядерные лейкоциты, кроме того, типичные морфологические признаки теряются во время фиксации и окрашивания, создавая трудность для этиологической идентификации.

Сравнение чувствительности микроскопических методов исследования и ПЦР применительно к таким микроорганизмам, как N.gonorhoeae и C.trachomatis, свидетельствует, что в первом случае частота выявляемости патогена в микроскопии у мужчин – 80-95%, у женщин – 30-50%, а во втором – 10-12%. При этом, использование метода ПЦР дает возможность определять указанные микроорганизмы с чувствительность более 95%.

Микроскопия микроорганизмов в нативном состоянии (главным образом фазово-контрастная) имеет ограниченное применение, главным образом, при выявлении их подвижности и изучении морфологии микроорганизмов, лишенных клеточной стенки (микоплазм и L-форм бактерий). L-формы – бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Возникают спонтанно или индуцировано – под воздействием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки: антибиотиков, ферментов, ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, аминокислоты глицина. L-форма обнаружена у патогенных видов холерного вибриона, токсигенных штаммов Clostridium tetani, Treponema pallidum. L-формы нередко обнаруживаются в организме при таких длительно протекающих патологических процессах, как бруцеллез, септический эндокардит. Важно учитывать, что существенным ограничением микроскопических исследований является также использование их для количественного анализа. Например, анализ состояния биоценоза урогенитального тракта предусматривает количественное определение широкого спектра условно-патогенных аэробных и анаэробных микроорганизмов, для которых доказана роль в развитии воспалительных процессов органов малого таза на фоне снижения количества ключевого представителя нормофлоры – бактерий рода Lactobacillus.

Традиционно при световой микроскопии выявляют не более 10 морфотипов: Lactobacillus spp., Gardnerella vaginalis, Bacteroides spp., Mobiluncus spp., Fusobacterium spp., Leptotrihia spp., Veillonella spp., Candida spp. При этом морфотипы факультативно-анаэробных бактерий, обнаруживаемых в мазках, морфологически однотипны у многих видов и родов бактерий – колиформные палочки или грамположительные кокки. Например, Atopobium vaginae не имеет специфических микроскопических признаков, как G.vaginalis и Mobiluncus spp., и выглядит под микроскопом как обычная коринобактерия, довольно часто встречающаяся у здоровых женщин. При этом данный микроорганизм является одним из основных факторов развития рецидивирующего бактериального вагиноза и его осложнений.

Кроме того, при микроскопии мазков можно выявить микроорганизмы, присутствующие в биоматериале в количестве, обычно превышающем 105 КОЕ/мл, тогда как многие факультативноанаэробные и аэробные бактерии могут проявлять патогенный эффект при сравнительно небольшом их количестве (до 104 КОЕ/мл), которое не выявляется при микроскопии. Поэтому диагностическая ценность микроскопического исследования вагинального отделяемого резко снижается.

В связи с этим возникает существенная проблема по установлению этиологии воспалительного процесса/дисбиоза, определению тактики ведения пациента и, как следствие, наблюдается увеличение числа рецидивов.

Результаты, полученные методом ПЦР, в данном случае отличаются высокой специфичностью и чувствительностью, поскольку позволяют избежать субъективной оценки морфотипов и их количества, не зависят от тинкториальных особенностей исследуемых микроорганизмов. Кроме того, появляется возможность дифференцировки процесса: аэробный/анаэробный дисбиоз, дисбиоз смешанного генеза и определение наиболее эффективных в каждом отдельном случае терапевтических или коррекционных мероприятий.

**Сравнение результатов ПЦР и культурального метода**

Культуральный метод, наряду с микроскопией микроорганизмов, входит в «золотой стандарт» диагностики. Объективными причинами тому являются:

* возможность обнаруживать все живые микроорганизмы, которые могут вырасти;
* z возможность определять антибиотикоустойчивость.

Но в применении культурального метода существуют не менее объективные ограничения:

* длительные сроки культивирования – от 5 дней до 2-х месяцев;
* повышенные требования к транспортировке и хранению материала;
* отсутствие возможности культивирования большинства анаэробов;
* невозможность выявлять некультивируемые формы микроорганизмов;
* повышенные требования к лаборатории.

Существует несколько общих условий взятия материала для проведения исследований с помощью культурального метода. Пробы берут до начала антибактериальной терапии или после выведения антибактериального препарата из организма. Если исследование необходимо провести в период лечения, то при посеве материала в него добавляют ингибитор препарата (например, пенициллиназу в случае применения бета-лактамного антибиотика).

Количество материала должно быть достаточным для проведения анализа. Материал, полученный от больных с хроническими вялотекущими инфекционными процессами, содержит меньше микроорганизмов, чем при остром процессе, поэтому для выделения возбудителя требуется большее его количество. Транспортировку материала для исследования осуществляют в предельно сжатые сроки. Охлаждение материала в холодильнике при температуре 4°С (или на льду) позволяет увеличить время до начала исследования на 30-60 мин. Более длительное хранение может привести к гибели возбудителей или изменению количественных соотношений компонентов микрофлоры.

Поэтому в случаях, когда хранение и транспортировка длятся более суток, используют консервант или транспортные (поддерживающие, накопительные) среды и специальные средства, сохраняющие жизнедеятельность микроорганизмов. Так, для транспортировки образцов материала, предназначенных для выделения анаэробных бактерий, применяют герметизированные флаконы или пробирки, заполненные бескислородным газом.

В некоторых случаях посев необходимо производить ex tempore (при коклюше, менингококковой инфекции, дизентерии). Методы, позволяющие провести посев материала у постели больного, значительно повышают вероятность выделения возбудителя.

При соблюдении перечисленных требований чувствительность культурального метода, например, при диагностике гонореи у мужчин, составляет – 95-98%, тогда как у женщин – не более 80-85%. В случае выявления трихомонады – 70-85%, С.trachomatis – 60-80%. Во всех перечисленных случаях метод ПЦР демонстрирует чувствительность не менее 95-98%. Метод ПЦР особенно эффективен при выявлении труднокультивируемых, некультивируемых, требующих сложной питательной среды 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.

Некультивируемыми называют такие формы микроорганизмов, которые в ответ на действие неблагоприятных факторов прекращают рост на питательных средах, но сохраняют жизнеспособность, а при улучшении условий культивирования возобновляют пролиферацию. В настоящее время известно около 45 видов микроорганизмов, относящихся к 30 родам, у которых обнаружена некультивируемая форма. Из них 30 видов – патогенны для человека, 15 видов – условно-патогенны или являются эубионтами человека, животных или растений. Среди бактерий есть возбудители таких инфекций, как чума, холера, тулерямия, легионеллез, шигеллез, сальмонеллез.

Достаточно часто наблюдаются расхождения результатов культурального метода и ПЦР на этапе количественной оценки компонентов сложных систем, таких, как биоценозы. Это вполне объяснимо с точки зрения невозможности синхронизировать рост микроорганизмов – компонентов биоценоза - и определить их соотношения в единицу времени. Кроме того, основные этиологические агенты анаэробных дисбиозов не культивируются в стандартных лабораторных условиях, что искажает картину при анализе состояния микрофлоры того или иного биотопа. Таким образом, можно заключить, что несовпадение результатов между различными лабораторными методами исследования и ПЦР – достаточно распространенная ситуация, которая обоснована пределами чувствительности методов, поставленными задачами и квалификацией специалиста.

Проведенная в зарубежных исследовательских центрах оценка чувствительности различных методов диагностики показала, что экспресс-тесты, имеют чувствительность 40-60%, ИФА-50-70 %, прямая иммунофлуоресценция – 55-75%, культуральное исследование – 60-80%, а ПЦР – 90-100 %