



ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

**ОСНОВЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)**

ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ»

ОСНОВЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Москва

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| 1. Механизм полимеразной цепной реакции | 9 |
| 1.1. Основные компоненты | 9 |
| 1.2. Дополнительные компоненты | 10 |
| 1.2.1. Положительный контроль | 10 |
| 1.2.2. Отрицательный контроль | 10 |
| 1.2.3. Внутренний контроль | 10 |
| 1.2.4. Специальные контроли | 11 |
| 1.3. Основные этапы ПЦР | 13 |
| 2. Методы выделения нуклеиновых кислот | 16 |
| 3. Варианты технологии ПЦР. Детекция результатов ПЦР | 18 |
| 3.1. Метод гель-электрофореза | 24 |
| 3.2. Флуоресцентные методы детекции | 26 |
| 3.3. Амплификаторы детектирующие для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени | 41 |
| 4. Общие требования к организации ПЦР-лаборатории | 45 |
| 5. Контаминация и деконтаминационные мероприятия | 63 |
| 6. Контроль качества лабораторных исследований | 66 |
| 6.1. Внутрелабораторный контроль качества | 66 |
| 6.2. Внешний контроль качества | 67 |
| 7. Ошибки ПЦР | 68 |
| 7.1. Ошибки преаналитического этапа | 68 |
| 7.1.1. Место взятия биологического материала | 68 |
| 7.1.2. Качество взятия и обработки биологического материала | 69 |
| 7.1.3. Хранение биологического материала | 71 |
| 7.2. Ошибки аналитического этапа | 71 |
| 7.2.1. Выбор системы пробоподготовки | 71 |
| 7.2.2. Генетическая изменчивость микроорганизмов | 72 |
| 7.2.3. Технические ошибки | 72 |
| 7.3. Ошибки постаналитического этапа | 74 |
| 7.3.1. Ошибки интерпретации результатов | 74 |
| 7.3.2. Сравнение результатов ПЦР и ИФА | 76 |
| 7.3.3. Сравнение результатов ПЦР и микроскопии | 79 |
| 7.3.4. Сравнение результатов ПЦР и культурального метода | 81 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8. Перспективы практического использования ПЦР-диагностики | 84 |
| 8.1. Нормативная база по применению ПЦР-технологий | 84 |
| 8.1.1. Нормативная база по ПЦР для диагностики ЗППП | 84 |
| 8.1.2. Нормативная база по ПЦР для выявления герпесвирусов | 88 |
| 8.1.3. Нормативная база по ПЦР для выявления папилломавирусов | 89 |
| 8.1.4. Нормативная база по ПЦР для выявления вирусов гепатитов В и С, ВИЧ | 93 |
| 8.1.5. Нормативная база по ПЦР для выявления возбудителей ОРВИ и туберкулеза | 96 |
| 8.1.6. Нормативная база по ПЦР для выявления возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) и прочих инфекций | 97 |
| 8.1.7. Нормативная база по ПЦР для анализа микрофлоры УГТ у женщин | 99 |
| 8.1.8. ПЦР в генотипировании человека | 101 |
| 8.2. Определение ГМИ в пищевых продуктах | 115 |
| 8.3. ПЦР в ветеринарии и растениеводстве | 124 |
| 8.3.1. ПЦР в области фитосанитарного контроля | 126 |
| 8.3.2. ПЦР в ветеринарии | 130 |
| 8.4. ПЦР в судебно-медицинской экспертизе | 136 |
| Приложение 1 | 137 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 148 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АлАТ – аланинаминотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфат
ВГВ (HBV) – вирус гепатита В
ВГС (HCV) – вирус гепатита С
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВК – внутренний контроль
ВКК – внутрилабораторный контроль качества
ВОЗ (WHO) – Всемирная организация здравоохранения
ВП – ветеринарные правила
ВПЧ (HPV) – вирус папилломы человека
ВТО – Всемирная торговая организация
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр
ГиФА – гибридикационно-ферментный анализ
ГМИ – генетически модифицированный источник
ГМО – генетически модифицированный организм
ГОСТ – Государственный стандарт
ГЭ – геном-эквивалент
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат
дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат
дГТФ – дезоксигуанозинтрифосфат
дЦТФ – дезоксицитозинтрифосфат
дТТФ – дезокситимидинтрифосфат
ДП (DP) – диагностический протокол
ДС – дезинфицирующие средства
ЗППП – заболевания, передающиеся половым путем
ИА – индекс avidности
ИППП – инфекции, передаваемые половым путем
ИРТ – инфекционный ринотрахеит
ИФА – иммуноферментный анализ
ИФН – интерферон
КВМ – контроль взятия материала
кДНК – комплементарная ДНК
КОЕ – колониобразующая единица
КРС – крупный рогатый скот
кРНК – комплементарная РНК
МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот
МККЗР – Международная конвенция по карантину и защите растений
ММСП – Международные медико-санитарные правила
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МСФМ (ISPM) – Международные стандарты по фитосанитарным мерам
МУ – методические указания
МЭБ – Международное эпизоотическое бюро
НАСКИ – Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи
НИЗ – неинфекционное заболевание
НК – нуклеиновая кислота
ОГС – острый гепатит С
ОКО – отрицательный контрольный образец
ООИ – особо опасные инфекции
ОТ-ПЦР (RT-PCR) – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПБА – патогенные биологические агенты
ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ПКО – положительный контрольный образец
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ (PCR-RT) – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК – рибонуклеиновая кислота
РОДВК – Российское общество дерматовенерологов и косметологов
РООМ – Российское общество онкоматологов
РС – реакционная смесь
РШМ – рак шейки матки
СП – санитарные правила
ССА – серонегативные спондилоартриты

ТОРС (SARS) – тяжелый острый респираторный синдром

УВО – устойчивый вирусологический ответ

УДГ (dUTP) – урацил-ДНК-гликозилаза

УФ – ультрафиолетовое излучение

фДНК – фетальная ДНК

ФСВОК – Федеральная система внешней оценки качества

ХГС – хронический гепатит С

ЦМВ (CMV) – цитомегаловирус

ASCUS (от англ. *Atypical squamous cells of undetermined significance*) – плоскоклеточная атипия неопределенной значимости

CIN (от англ. *Cervical intraepithelial neoplasia*) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия

FLASH (от англ. *Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization*) – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами

FRET (от англ. *Fluorescence resonance energy transfer*) – флуоресцентный резонансный перенос энергии

НВеАg (от англ. *HBe antigen*) – антиген «е» вируса гепатита В

HRM (от англ. *High resolution melting curve analysis*) – анализ кривых плавления с высоким разрешением

HLA (от англ. *Human leucocyte antigens*) – антигены гистосовместимости человека

IgG (от англ. *Immunoglobulin G*) – иммуноглобулин G

IgM (от англ. *Immunoglobulin M*) – иммуноглобулин M

NASBA (от англ. *Nucleic acid sequence based amplification*) – метод амплификации молекул РНК

NIBSC (от англ. *National Institute for Biological*

Standards and Control) – Национальный институт биологической стандартизации и контроля, Великобритания

OR (от англ. *Odds ratio*) – отношение шансов

SNP (от англ. *Single nucleotide polymorphism*) – однонуклеотидный полиморфизм

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (НК) в биологическом материале (пробе).

Открытию полимеразной цепной реакции предшествовало развитие молекулярно-биологических технологий.

В 1869 г. И. Мишером была открыта ДНК. Биологическая функция нового вещества была не ясна.

В 1944 г. ученые О. Эвери, К. Маклеод и М. Маккарти провели ряд экспериментов по трансформации бактерий и доказали, что за трансформацию (приобретение болезнетворных свойств безвредной культурой в результате добавления в нее мертвых болезнетворных бактерий) отвечают выделенные из пневмококков ДНК.

Вплоть до 50-х годов XX века точное строение ДНК и способ передачи наследственной информации оставались неизвестными, хотя и было доказано, что ДНК состоит из нескольких цепочек, состоящих из нуклеотидов.

ДНК – полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков – нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счет дезоксирибозы и фосфатной группы (фосфодиэфирные связи). В подавляющем большинстве случаев (кроме некоторых вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК) макромолекула ДНК

состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу.

В ДНК встречается четыре вида азотистых оснований (аденин, гуанин, тимин и цитозин). Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно *принципу комплементарности*: аденин соединяется только с тимином, гуанин – только с цитозином (рис. 1).

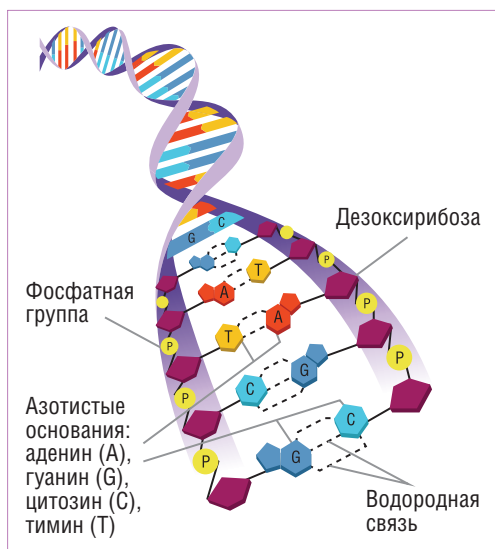


Рис. 1. Строение ДНК

Каждая цепь служит матрицей при синтезе новой цепи, а последовательность в синтезируемой цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Асимметричные концы цепи ДНК называются 3' (три-штрих) и 5' (пять-штрих). Полярность цепи играет важную роль при синтезе ДНК (удлинение цепи возможно только путем присоединения новых нуклеотидов к свободному 3'-концу).

Количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в составе нуклеотидов ДНК были сформулированы в 1949-1951 гг. группой биохимика Э. Чаргаффа и получили название «правила Чаргаффа». Суть этих правил заключалась в следующем:

1. Количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а гуанина (Г) – цитозину (Ц):
 $A = T, G = C$.
2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов: $A + G = T + C$.

Правила Чаргаффа наряду с данными рентгеноструктурного анализа сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году.

В 1955 г. А. Корнберг открыл фермент, который назвал *ДНК-полимеразой*. Этот фермент способен удлинять цепь ДНК, присоединяя нуклеотиды к ее 3'-концу. В искусственных условиях фермент катализирует реакцию достраивания участка искомой ДНК от затравки (праймера), которая комплементарно связана с цепью ДНК (матрицей). Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать нуклеозидтрифосфаты (дНТФ), используемые в качестве строительных блоков.

В 1971 г. Х. Клеппе и соавторы рассмотрели данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК-праймеров для получения новых копий ДНК.

Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеиновых кислот еще не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью трудоемкого синтеза праймеров, и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания и охлаждения ДНК-полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1975 г. Т. Брок и Х. Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена *Taq-полимераза*. Преимуществом данного фермента была способность стабильно работать при повышенных температурах (оптимум 72-80 °С).

В 1983-1984 гг. К. Мюллис провел ряд экспериментов по разработке ПЦР и первым начал использовать *Taq-полимеразу* вместо неустойчивой к высоким температурам ДНК-полимеразы. Это позволило ускорить работы по разработке полимеразной цепной реакции. Кроме того, К. Мюллис вместе с Ф. Фалуном разработали алгоритм циклических изменений температуры в ходе ПЦР.

Таким образом, сформировался принцип использования ПЦР как метода *амплификации in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 г. Саики с соавторами опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности β -глобина. С этого момента количество публикаций о применении ПЦР в своей работе стало увеличиваться в геометрической прогрессии.

Особенно бурное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека». Были созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Это в свою очередь способствовало значительному росту информационных баз данных, содержащих последовательности ДНК биологических объектов.

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

Таким образом, открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

1. МЕХАНИЗМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

1.1. Основные компоненты

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси (РС) ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные (комплементарные) противоположным концам противоположных цепей искомого участка ДНК-мишени. Служат затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы и играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов реакции амплификации.

Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

- ▶ *быть специфичными.* Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. При недостаточной специфичности праймеров в процессе ПЦР будут образовываться продукты, которые, с одной стороны, могут быть идентифицированы как ложноположительный результат, а с другой стороны, на процессы их накопления будут расходоваться компоненты реакционной смеси, что приведет к значительной потере чувствительности реакции как таковой;
- ▶ *не должны образовывать димеры и петли* – устойчивые двойные цепи – при отжиге праймеров самих на себя или друг с другом;
- ▶ *область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций* в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании в такую зону не происходит отжига праймеров и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

Taq-полимераза – термостабильный фермент, который обеспечивает достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) – строительный материал, используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую НК, например ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии НК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

1.2. Дополнительные компоненты

Для удобства детекции и контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

1.2.1. Положительный контроль

Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой искусственно синтезированную олигонуклеотидную последовательность, строго соответствующую искомой. Соответственно, праймеры для ПКО и искомой мишени одинаковые, что позволяет удостовериться в работоспособности и сохранности компонентов РС, необходимых для нормального прохождения ПЦР.

1.2.2. Отрицательный контроль

Отрицательный контрольный образец (ОКО) включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала или препарата НК вносится соответствующее количество деионизованной воды или экстракта, не содержащего исследуемую ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключения учета ложноположительных результатов.

1.2.3. Внутренний контроль

Препарат НК может содержать примеси ингибиторов, которые заметно снижают эффективность ПЦР, а в некоторых случаях могут приводить к полному отсутствию результатов исследования. Кроме того, возможны ошибки на этапе составления РС (например, не добавили какой-либо компонент или саму НК), несоблюдение температурного режима хранения наборов реагентов или отдельных их частей (например, размораживание и потеря активности ферментов) и ряд других технических моментов, которые напрямую влияют на результаты ПЦР. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этого в состав РС вводят дополнительный *внутренний контроль* (ВК).

ВК – это искусственно сконструированный препарат ДНК или РНК, который имеет принципиально отличную от искомой олигонуклеотидную последовательность. Для ВК в состав РС вводят собственные, строго комплементарные праймеры.

Концентрация ВК в РС должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомым молекул НК.

Результаты исследований с учетом ВК интерпретируются следующим образом (табл. 1).

Таблица 1. Интерпретация результатов ПЦР-анализа

| Результат ПЦР | Искомая НК | ВК | Интерпретация |
|------------------------------------------------|------------|----|-------------------------------------------------------------|
| <i>Анализируемые образцы</i> | | | |
| «+» | ✓ | – | Обнаружена искомая НК (корректный результат) |
| | ✓ | ✓ | |
| «–» | – | ✓ | Не обнаружена искомая НК (корректный результат) |
| «НД» | – | – | <i>Недостовверный результат</i> |
| <i>Положительный контрольный образец (ПКО)</i> | | | |
| «+» | ✓ | – | Обнаружен ПКО (корректный результат) |
| | ✓ | ✓ | |
| «–» | – | ✓ | Не обнаружен ПКО (некорректный результат, требует проверки) |
| «НД» | – | – | <i>Недостовверный результат</i> |
| <i>Отрицательный контрольный образец (ОКО)</i> | | | |
| «+» | ✓ | – | Некорректный результат, требует проверки (контаминация?) |
| | ✓ | ✓ | |
| «–» | – | ✓ | Отрицательный результат (корректный результат) |
| «НД» | – | – | <i>Недостовверный результат</i> |

Наличие ампликонов ВК является свидетельством нормального прохождения реакции амплификации. Если ампликоны искомой НК отсутствуют, но не образовались также и ампликоны ВК, можно сделать вывод о технологических нарушениях либо о наличии в анализируемом образце нежелательных примесей. В любом случае результат реакции следует признать недостоверным.

ВК может быть использован не только непосредственно в составе РС для амплификации, но и для контроля качества выделения НК. Для этого его вводят в каждую пробирку с исходным или предварительно обработанным образцом, проводят через этап выделения и только потом добавляют в РС. Введение ВК с *известной концентрацией* на этапе выделения особенно важно для контроля количественного ПЦР-анализа.

1.2.4. Специальные контроли

Использование специальных контролей при постановке ПЦР позволяет решить ряд задач, в первую очередь касающихся оценки эффективности процесса амплификации и контроля специфичности полученных результатов, а также дает возможность реализовать подход к количественному анализу ДНК.

Принципиальным моментом является постановка специальных контролей при исследовании сложных многокомпонентных систем, таких как биоценозы, поскольку появляется возможность качественного и количественного анализа взаимодействия компонентов системы и характеристики их отношения к биотопу.

К специальным контролям можно отнести следующие:

- ▶ маркеры длин фрагментов ДНК;
- ▶ контроль фона;
- ▶ стандарты и калибраторы;
- ▶ контроль взятия материала (КВМ).

Маркеры длин фрагментов ДНК используются при детекции результатов ПЦР методом гель-электрофореза. Стандарты (маркеры) представляют собой фрагменты двухцепочечной ДНК строго определенной длины, позволяющие идентифицировать и охарактеризовать полосы, полученные в геле, и оценить результаты анализа с точки зрения их специфичности.

Контроль фона используется для ПЦР с флуоресцентными методами детекции результатов, причем данный тип контроля наиболее актуален для ПЦР с детекцией результатов по конечной точке (см. ниже).

Анализ уровней флуоресценции искомой мишени и фоновой флуоресценции позволяет установить некоторое пороговое значение и определить критерии достоверности положительного и отрицательного результатов ПЦР с детекцией результатов по конечной точке. Важно, что на величину фоновой флуоресценции могут повлиять: свойства меченых зондов; изменения концентрации отдельных компонентов реакционной смеси в зависимости от серии, режима и продолжительности хранения; свойства используемого пластика; особенности регистрирующей аппаратуры. Поэтому фоновые пробирики должны готовиться в соответствии с инструкцией к применяемому набору реагентов, рекомендациями производителя и к каждой новой серии наборов реагентов.

Внимание! Фоновые пробирики в рамках одной серии могут быть использованы многократно, поэтому чрезвычайно важно соблюдать режим хранения, соответствующий режиму, определенному для всего набора реагентов.

Стандарты и калибраторы наиболее часто используются при осуществлении количественного анализа методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (см. ниже). Стандарт – произвольный фрагмент ДНК или РНК, ограниченный теми же праймерами, что и для искомой мишени. Известные концентрации стандарта соответствуют определенным значениям порогового цикла C_t (номер первого цикла, в котором происходит увеличение флуоресцентного сигнала репортерной группы по сравнению с уровнем фонового сигнала; его величина зависит от исходного количества копий матрицы и от эффективности амплификации ДНК). Введение этого типа контролей предполагает построение калибровочного графика, из которого находят концентрацию искомой НК в исследуемом образце. Точность метода зависит от того, насколько условия ПЦР серии стандартов (прежде всего эффективность амплификации) близки к условиям ПЦР экспериментальных образцов.

Для определения количества матрицы в ПЦР-РВ существуют следующие варианты стандартов:

- ▶ очищенный продукт ПЦР-РВ;
- ▶ рекомбинантная ДНК;
- ▶ рекомбинантная РНК с последующей обратной транскрипцией;
- ▶ синтетический олигонуклеотид, содержащий амплифицируемую последовательность.

Использование стандартов и калибраторов позволяет определить концентрацию ДНК в двух вариантах (например, при анализе на наличие патогенных микроорганизмов в пробе):

- ▶ количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в единице объема клинического образца (ГЭ/мл), что отражает *абсолютную концентрацию* данных микроорганизмов в клиническом материале;
- ▶ расчет соотношения количества геномов на количество геномов клеток человека. Для этой цели в ПЦР-смеси наряду с калибраторами ДНК микроорганизма присутствуют калибраторы человеческой ДНК. Полученные таким образом *относительные значения* концентрации ДНК микроорганизма к ДНК человека могут отражать плотность обсемененности искомыми микроорганизмами.

Контроль взятия материала – ключевой момент в определении качества взятой для исследования пробы. Данный подход позволяет исключить ошибки преаналитического этапа при исследовании биологического материала, содержащего клетки человека, и избежать получения недостоверных, ложноположительных или ложноотрицательных результатов ПЦР. Кроме того, он может быть использован для оценки количества геномной ДНК человека.

Таким образом, существует спектр подходов, обеспечивающий получение достоверных результатов, которые позволяют контролировать качество и эффективность прохождения ПЦР и оптимизировать работу лаборатории.

1.3. Основные этапы ПЦР

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходят изменения, которые обеспечиваются определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов (рис. 2):

1. *Денатурация* – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований противоположных цепей ДНК под воздействием высоких температур.

2. *Отжиг* – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомый фрагмент ДНК и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии

с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

3. *Элонгация (синтез)*. После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера с использованием дНТФ.

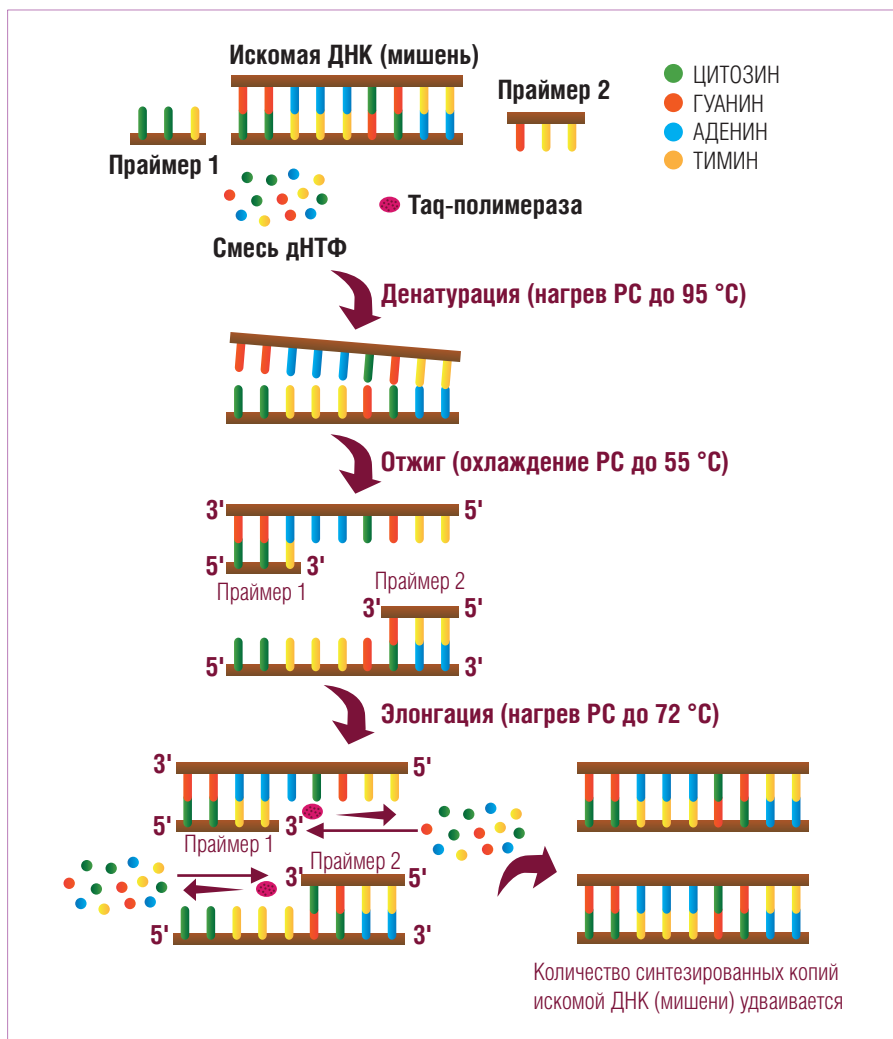


Рис. 2. Основные этапы ПЦР

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (рис. 4).

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n,$$

где A – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

M – начальное количество ДНК-мишеней;

n – число циклов амплификации.

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет, по некоторым данным, 78–97 %. Если в пробе присутствуют ингибиторы реакции, это значение может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

$$A = M \cdot (1 + E)^n,$$

где E – значение эффективности реакции.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

Эффект плато

Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – проявляется *эффект плато*.

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пмоль.

На достижение эффекта плато влияют:

- ▶ утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
- ▶ стабильность реагентов (дНТФ и фермента);
- ▶ количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы;
- ▶ неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
- ▶ концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики выделения в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) из исследуемого материала и удалении или нейтрализации посторонних примесей.

Для выделения нуклеиновых кислот в рутинной лабораторной практике используют три наиболее распространенных подхода:

1. **Экспресс-методы** (используются для выделения ДНК) базируются на температурном лизисе клеток и последующем центрифугировании, в результате которого нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а надосадочная жидкость (супернатант), содержащая ДНК, используется для проведения ПЦР.

Метод прост в использовании, занимает не более 10-15 минут, обеспечивает максимальный выход ДНК, но малоэффективен при работе с материалом, содержащим высокое количество примесей и ингибиторов ПЦР. Кроме того, метод не может быть использован для выделения РНК, так как РНКазы устойчивы к нагреванию.

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) целесообразными являются предварительная отмывка и обработка муколитиками.

Более эффективным методом выделения и очистки нуклеиновых кислот (НК) при работе с таким материалом может быть использование сорбентов или сильных хаотропных агентов.

2. **Сорбентные методы выделения** – дифференциальная сорбция нуклеиновых кислот (допустимо выделение как ДНК, так и РНК) на твердом носителе (чаще всего: силикагель с повышенным отрицательным зарядом или модифицированной поверхностью, стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т. д.). Нуклеиновая кислота обратимо связывается со стеклом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей (например гуанидин тиоцианат). Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. Кроме хаотропных солей в лизирующем буфере чаще всего присутствуют детергенты, которые способствуют растворению и лизису белков. С помощью центрифугирования силика с НК осаждается, а супернатант с ингибиторами ПЦР удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата НК.

Актуальная на данный момент модификация сорбентного метода – выделение на магнитных частицах в ручном или автоматическом режимах. Использование магнитных твердых носителей имеет ряд преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами.

Для процесса выделения используются магнитные носители (синтетические полимеры, биополимеры, пористое стекло, оксид железа с модифицированной поверхностью и другие) с высокой аффинностью к конкретной нуклеиновой кислоте. Обычно магнит прикладывается к стенке пробирки, содержащей образец, чтобы частицы агрегировали к стенке, а остаток образца можно было убрать. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР. При этом можно выделять как ДНК, так и РНК с высоким выходом продукта из образцов, содержащих значительное количество примесей.

В целом сорбентные методы обеспечивают высокую степень очистки нуклеиновых кислот, но могут быть сопряжены с потерями (особенно в случае низкого содержания в образце – «низкокопийный образец») вследствие необратимой сорбции на носители или в процессе нескольких промывок. Кроме того, остаточное количество сорбента в конечном растворе ДНК может ингибировать ферментативные реакции ПЦР.

3. Спиртовое осаждение (преципитация) – агрегация НК (как ДНК, так и РНК) в присутствии соли и спирта. После осаждения спиртом НК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую НК, неоднократно промывается спиртами и концентрируется центрифугированием. На завершающем этапе процедуры происходит растворение НК в водном буфере, часто в процессе нагревания до 55–65 °С для лучшего растворения осадка.

Преимуществом данной технологии является возможность работы со «сложными» образцами, выделять в равной степени как ДНК, так и РНК, однако спиртовое осаждение приводит к преципитации не только НК, но и белков, что в свою очередь затрудняет получение чистого препарата. Наиболее простым путем решения проблемы с нежелательными примесями является уменьшение объема анализируемого образца, однако такой подход неприменим, если необходимо получить результат с максимальной чувствительностью.

Для обеспечения качества процесса выделения важно учитывать не только «сложность» материала для исследования и, исходя из этого, подбирать наиболее эффективный метод экстракции, но и особенности целевой нуклеиновой кислоты.

ДНК является достаточно стабильным субстратом, медленнее разрушается под действием ДНКаз, лучше сохраняется при транспортировке и хранении образца и допускает применение длительных методик выделения с использованием большой партии образцов. Напротив, РНК – нестабильный продукт, легко деградирует в условиях длительной транспортировки и хранения без дополнительной стабилизации в специальных средах. В условиях неавтоматизированных методик экстракции выделение нестабилизированной РНК лучше проводить небольшими партиями, исходя, например, из емкости имеющихся в ПЦР-лаборатории центрифуг, чтобы избежать деградации РНК в промежутках между этапами отмывок и центрифугирования.

Таким образом, к выбору метода подготовки пробы к ПЦР следует подходить с пониманием целей проведения предполагаемых анализов и особенностей материала для исследования.

3. ВАРИАНТЫ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР. ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

На данный момент разработаны варианты постановки ПЦР, направленные на решение следующих задач: увеличение эффективности реакции и снижение риска образования неспецифических продуктов; проведение качественного и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК/РНК.

Наиболее распространенными модификациями ПЦР являются:

- ▶ *ПЦР с горячим стартом* (англ. *hot-start PCR*) – модификация метода, направленная на предотвращение неспецифического взаимодействия компонентов реакционной смеси до достижения оптимальных условий амплификации.

В зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления (T_m – температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером в присутствии фермента – полимеразы). При соблюдении оптимальных условий (температура отжига праймеров близка по значениям к температуре плавления) праймер образует стабильную комплементарную связь с матрицей. Если же температура реакционной смеси ниже T_m , то возможен неспецифический отжиг праймера на матрицу, образование димеров. Если в данный момент активный фермент в реакционной смеси отсутствует, то элонгация образовавшегося неспецифического комплекса не происходит, что позволяет избежать ложноположительных результатов ПЦР.

Реализация горячего старта возможна двумя основными способами:

1. Блокировка полимеразы антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody. Полимераза становится активной только при предварительном прогревании реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 10 минут – это условия, при которых разрушаются связи «полимераза – антитело».
2. Использование легкоплавкого парафина отделяет полимеразу от компонентов реакционной смеси, предотвращая их преждевременное взаимодействие. Парафин плавится при достижении реакционной смесью температуры выше 55 °С, этого достаточно для начала специфического взаимодействия между компонентами реакционной смеси.

При реализации данного подхода важным моментом является использование минерального масла, которое при нагревании обеспечивает равномерность плавления парафина и поддержание однородности условий реакции (снижение риска агрегации кристаллов парафина и конденсации компонентов реакционной смеси).

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

- ▶ *ПЦР с обратной транскрипцией* (ОТ-ПЦР, *RT-PCR*) используется для идентификации известной последовательности РНК. Суть реакции – синтез двухце-

почечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК. Для этого одноцепочечную молекулу РНК превращают в *реакции обратной транскрипции* (ОТ, англ. *RT, reverse transcription*) в комплементарную ДНК (кДНК) и далее амплифицируют уже ДНК-матрицу, используя традиционную ПЦР (рис. 3).

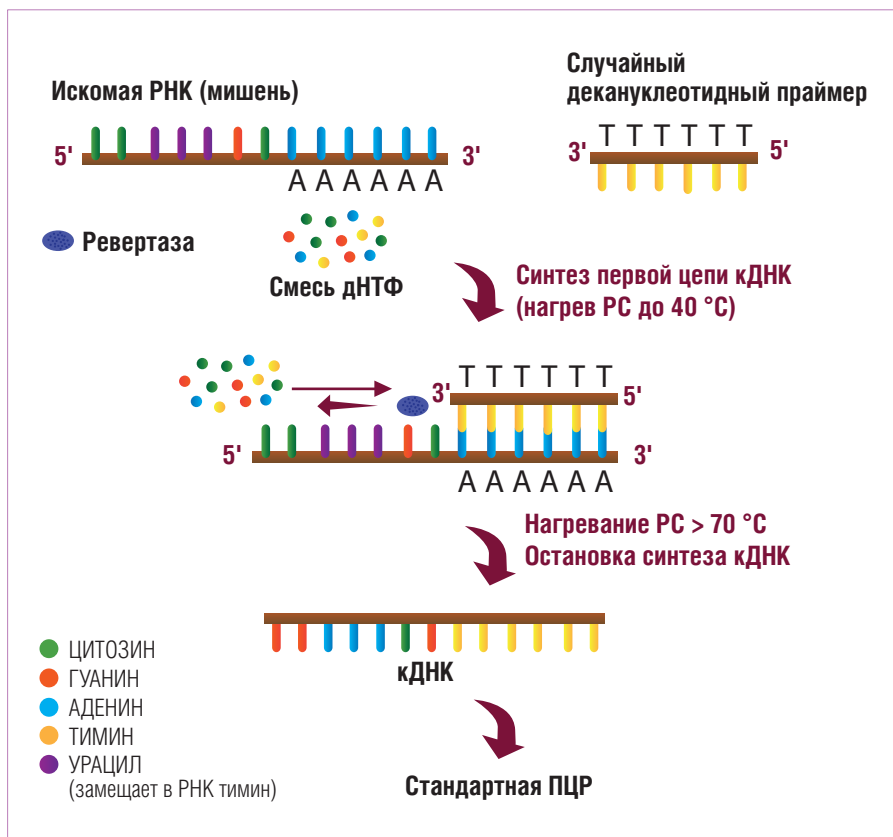


Рис. 3. Принцип ОТ-ПЦР

Использование ревертазы связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, данный фермент термоллабилен и поэтому может быть использован при температуре не выше 42 °С. Так как при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, то эффективность реакции заметно снижается и по разным оценкам приблизительно равна 5 %. Этот недостаток может быть устранен при использовании в качестве обратной транскриптазы *термостабильной полимеразы*, проявляющей активность в присутствии ионов Mn^{2+} . Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную, так и транскриптазную активность.

ОТ-ПЦР широко используется для выявления вирусов, геном которых представлен РНК (ВИЧ, гепатит С, вирусы гриппа и другие), для диагностики генетических заболеваний и полуколичественного определения специфических молекул РНК в клетке или ткани как индикатор экспрессии соответствующих генов.

- ▶ *Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР* – одновременная амплификация двух и более искомым последовательностей ДНК в одной пробирке. Каждая пара праймеров для мультиплексной ПЦР должна обладать строгой специфичностью по отношению к соответствующей искомой мишени, а условия циклирования должны обеспечивать равноэффективный отжиг всех участвующих в реакции пар праймеров, чтобы выход амплифицируемых продуктов был по возможности одинаковым.

Преимуществом данного метода является возможность проведения скрининговых исследований с минимальными затратами на расходные материалы. Кроме того, из одного образца можно получить максимум информации в рамках одной постановки ПЦР.

Тем не менее мультиплексная ПЦР существенно ограничивает возможности при идентификации низкокопийных образцов: если набор реагентов позволяет выявить четыре искомые мишени + внутренний контроль и все четыре мишени присутствуют в исследуемом образце, то в случае преобладающего количества ДНК одной или двух мишеней основной объем компонентов РС будет расходоваться именно на них (конкуренция за компоненты РС). В случае сомнительных результатов мультиплексной ПЦР рекомендуется провести анализ образца с использованием наборов реагентов, предназначенных для выявления одной конкретной мишени. Важно, чтобы мультиплексный и моноплексные наборы реагентов, используемые для проверки сомнительных результатов, были одного производителя.

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабораториях, например:

- ▶ *Гнездовая (вложенная, англ. nested PCR) ПЦР* применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.
- ▶ *ПЦР инвертированная* используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для этого проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов.
- ▶ *Асимметричная ПЦР* проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. Сама ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.
- ▶ *Метод молекулярных колоний.* Данная модификация основана на использовании акриламидного геля, который до начала ПЦР полимеризуют со всеми

ее компонентами на поверхности. В процессе реакции в точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

- ▶ *ПЦР длинных фрагментов* (англ. *long-range, PCR*) – вариант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Для реализации данного подхода используют смесь двух полимераз: *Taq-полимераза*, которая характеризуется высокой процессивностью и способна за один проход синтезировать длинную цепь ДНК; *Pfu-полимеразы*, которая обладает с 3'→5'- экзонуклеазной активностью и необходима для удаления некомплементарных нуклеотидов.
- ▶ *Групп-специфическая ПЦР* (англ. *group-specific PCR*) – ПЦР с использованием консервативных праймеров к последовательностям ДНК для родственных групп внутри одного или между разными видами. В основе метода – подбор универсальных праймеров, например, к рибосомальным генам 18S и 26S для амплификации видоспецифического межгенного спейсера.
- ▶ *ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE-PCR)*.

Важно учитывать, что метод ПЦР применительно к клинико-диагностическим целям классифицируется как *прямой метод диагностики*, то есть направлен на непосредственное выявление возбудителя (его генетического материала) в образце. К прямым методам также относятся бактериоскопический, вирусологический, бактериологический и иммунофлуоресцентный методы. В отличие от них *непрямые (серологические) методы* направлены на выявление ответа организма на патологическое воздействие и/или проводимую терапию (чаще всего – иммуноферментный анализ (ИФА)). В связи с этим метод ПЦР в большинстве своих модификаций (*если в качестве искомой мишени используется ДНК*) не позволяет оценить эффективность проводимой терапии. Это обусловлено тем, что ДНК – достаточно стабильный продукт, медленно разрушается под действием ДНКаз и длительно (в течение нескольких недель при выраженном инфекционном процессе) сохраняется в организме, даже когда антибактериальная терапия (или противовирусная, если геном вируса представлен ДНК) оказалась эффективной.

Чтобы оценить эффективность терапии на этапе ее проведения или сразу после окончания, разработана модификация метода ПЦР – технология *NASBA* (от англ. *Nucleic acid sequence based amplification*). Основу методики составляет амплификация молекул РНК возбудителей заболеваний при участии ферментов: обратной транскриптазы, РНК-полимеразы и РНКазы, двух пар *специфических* праймеров. Выбор РНК в качестве искомой мишени связан с тем, что данная нуклеиновая кислота выделяется только из живых клеток и быстро разрушается после их гибели.

При участии ферментов последовательно формируются комплексы РНК+кДНК, где каждый элемент в равной степени служит матрицей для накопления РНК-ампликонов (рис. 4).

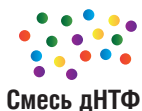
Искомая РНК (мишень)



Праймер 1



Праймер 2



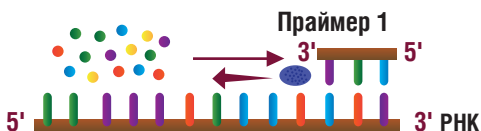
Смесь дНТФ

- Ревертаза
- РНКаза
- РНК-полимераза

- ЦИТОЗИН
- ГУАНИН
- АДЕНИН
- ТИМИН
- УРАЦИЛ
(замещает в РНК тимин)

I фаза — «линейная»

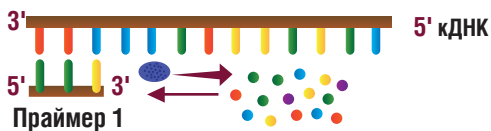
Специфическая гибридизация
Праймера 1 на РНК-мишени.
Снижение температура РС до 40 °С —
обратная транскрипция — образование кДНК



Образуется двуцепочечный гибрид
РНК + кДНК, который подвергается
расщеплению под действием РНКазы



К образовавшейся кДНК при
участии Праймера 2 и Ревертазы
достраивается вторая цепь



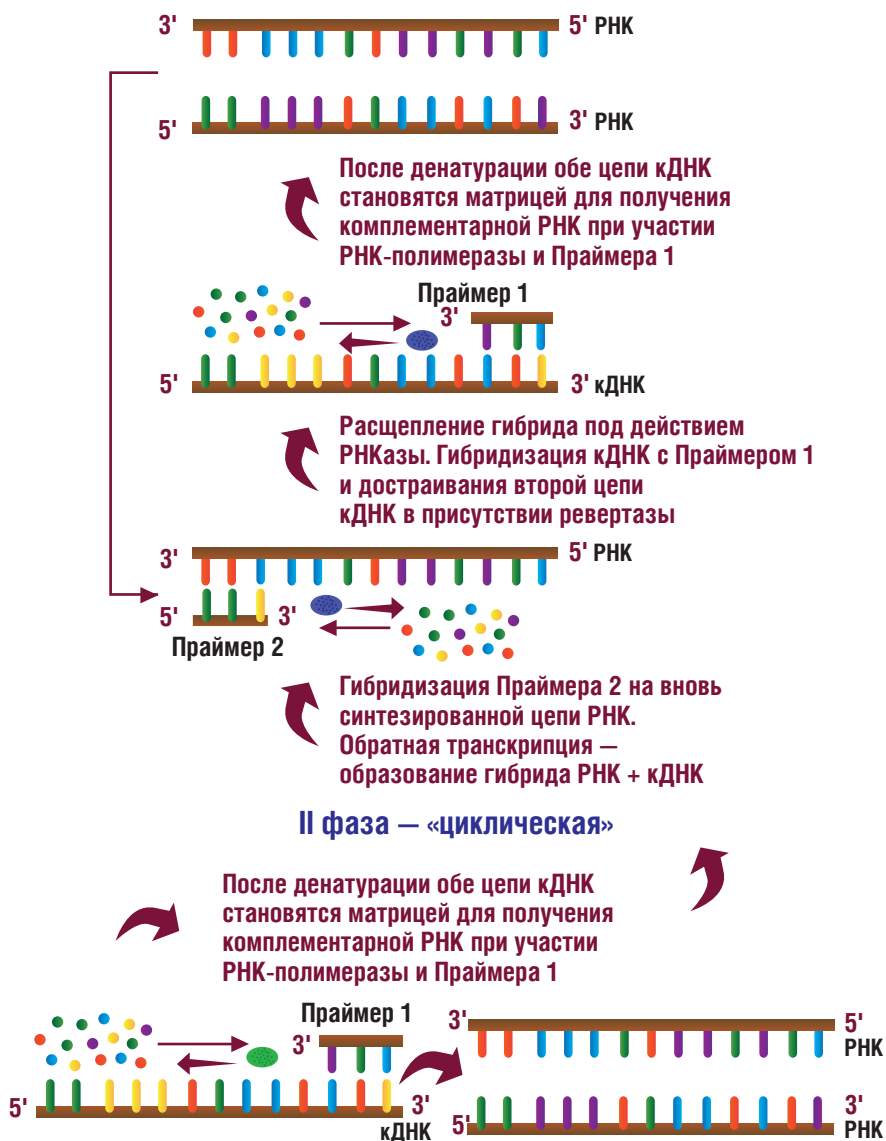


Рис. 4. Основные этапы технологии NASBA

Технология NASBA отличается от ОТ-ПЦР тем, что искомая РНК в процессе амплификации не только является основой для получения кДНК, но и основным объектом накопления и детекции.

Детекция результатов ПЦР

На сегодняшний день существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

- ▶ электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле);
- ▶ гибридизационно-ферментный;
- ▶ гибридизационно-флуоресцентный:
 - регистрация продукта после окончания реакции амплификации — «анализ по конечной точке»;
 - детекция продукта в режиме реального времени.

3.1. Метод гель-электрофореза

Наиболее распространенным до недавнего времени являлся метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру (рис. 5). В этом случае визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5–2,5 % с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия.

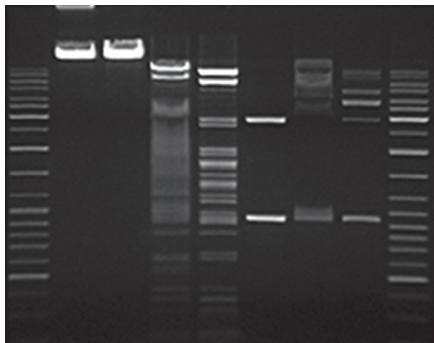


Рис. 5. Разделение молекул ДНК в агарозном геле

Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки в геле формируют лунки, в которые вносят продукты амплификации. Пластины геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения.

Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК.

Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК.

Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 минут до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной, поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид и специальную камеру для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК с точностью до одного нуклеотида. Однако приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного, кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

Оба варианта электрофоретической детекции позволяют осуществлять **только качественный анализ** и сопряжены с рядом проблем:

- ▶ большие затраты времени на стадию детекции;
- ▶ невозможность автоматизации;
- ▶ сложности и субъективность трактовки результатов;
- ▶ высокий риск контаминации и большие затраты на ее устранение:
 - повышенные требования к организации лаборатории;
 - максимальное удаление зоны детекции от других зон проведения ПЦР;
 - выделение отдельного сотрудника на стадию детекции;
 - постоянный контроль смывов;
 - большое количество отрицательных контрольных образцов К- для контроля контаминации ампликонами, что приводит к увеличению объема расходных материалов и времени для подготовки к проведению детекции.

3.2. Флуоресцентные методы детекции

Флуоресцентные методы детекции построены на использовании флуорохромов – молекул, обладающих способностью к свечению в результате поглощения световой энергии. Детекция осуществляется специальными приборами *после* амплификации (ПЦР с анализом результатов по конечной точке) либо *в процессе* амплификации (ПЦР в режиме реального времени).

Технология позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Технологии, которые получили коммерческую реализацию, используют интеркалирующие красители либо флуорофоры в составе олигонуклеотидных гибридационных зондов.

Интеркалирующие красители (лат. *intercalatio* – вставка, добавка) – молекулы, способные обратимо встраиваться (интеркалировать) между двумя комплементарными парами нуклеотидов в двуспиральной ДНК или РНК (рис. 6).

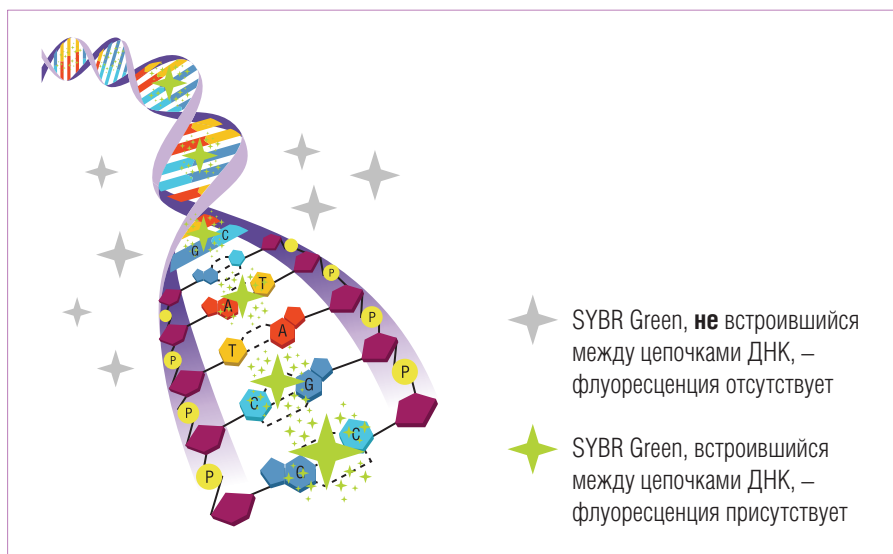


Рис. 6. Принцип действия интеркалирующих красителей (например SYBR Green)

Наиболее распространенными интеркалирующими красителями (ИК) являются: EtBr, SYBR Green I, SYBR Gold, LCGreen, SYTO 9, Eva Green и другие. Их преимущество – относительная дешевизна как самих красителей, так и наборов реагентов с их использованием. Однако есть существенный недостаток: способность связываться с любой двухцепочечной ДНК, появляющейся в реакционной смеси, которая может быть как целевым продуктом ПЦР, так и артефактом. Поэтому для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение продуктов амплификации с помощью плавления ампликонов.

Кроме того, избыток SYBR Green I ингибирует активность Taq-полимеразы, что приводит к получению ложноотрицательных результатов ПЦР.

В связи с этим для диагностических целей лучше использовать наборы реагентов, в состав которых входят гибридационные зонды – более дорогая, но значительно более точная технология. В ее основе – резонансный перенос энергии флуоресценции (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*), который базируется на обмене энергии между двумя фотоактивными молекулами или группами, одна из которых выступает *донором* (первый флуоресцентный краситель), а другая – *акцептором* (второй флуоресцентный краситель или «темновой» тушитель) энергии. Эффективность переноса энергии зависит от взаимного расположения донора и акцептора. На данный момент существует несколько вариантов таких зондов: TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion, Duplex Scorpion и другие.

Система *TaqMan* отличается относительной простотой, высокой специфичностью и представляет собой линейный олигонуклеотид, меченый по 5'-концу флуорофором, а по 3'-концу – гасителем флуоресценции. Место его отжига располагают между участками отжига прямого и обратного праймеров, что исключает детекцию нецелевых продуктов, которые теоретически могут образоваться в результате неспецифического отжига (рис. 7).

Второй по популярности гибридационной системой считаются так называемые молекулярные маяки (*molecular beacons*), представляющие собой шпильчатые олигонуклеотиды, концевые последовательности которых спарены и несут флуорофор и гаситель флуоресценции. При появлении в реакционной смеси ампликонов, которые содержат участок ДНК, комплементарный петлевой части зонда, происходит раскрытие олигонуклеотидной шпильки, что приводит к пространственному отдалению флуорофора и гасителя и, соответственно, к увеличению интенсивности флуоресценции (рис. 8).

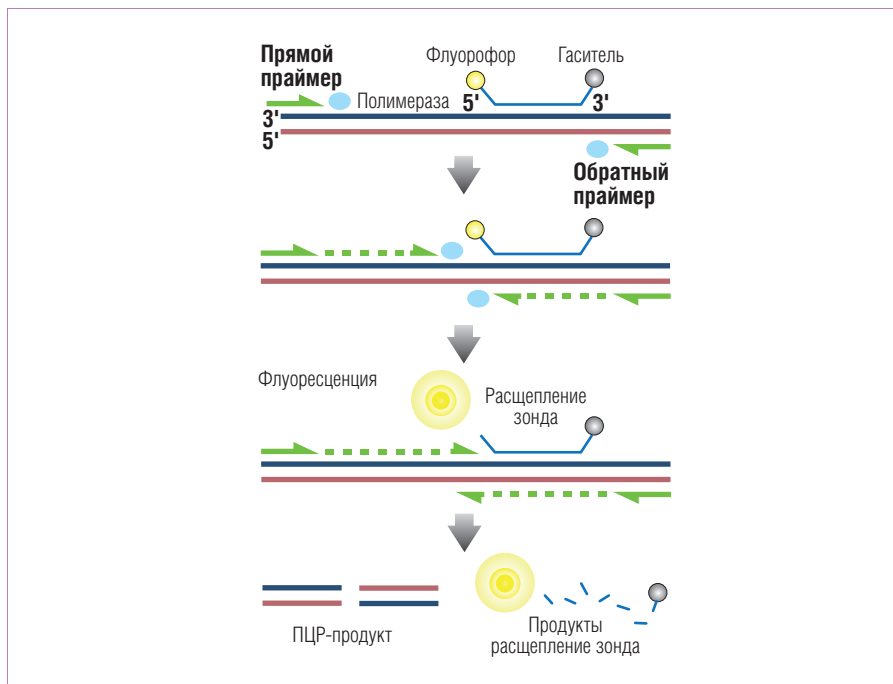


Рис. 7. Технология *TaqMan*

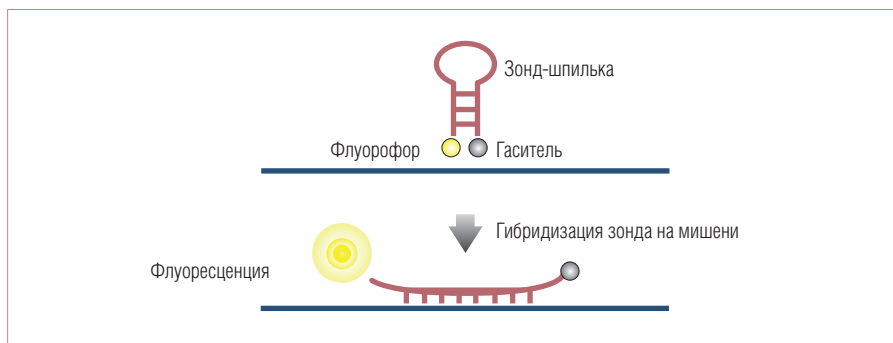


Рис. 8. Технология *Molecular Beacons*

Преимуществами данной системы являются сближенное расположение красителя и тушителя, обеспечивающее максимально возможную эффективность тушения, и более высокая специфичность по сравнению с ИК, а недостатком – необходимость конструирования зондов и оптимизации условий ПЦР.

Весьма высокоспецифичными могут считаться системы *Scorpion* и *Duplex Scorpion*, что обеспечивается необычным строением данных зондов, состоящих из двух последовательностей: затравочной и гибридизационной. Специфичный олигонуклеотид-затравка, расположенный в начале праймера, отделяется от расположенного рядом с ним гибридизационного зонда этиленгликольным спейсером, не позволяющим ДНК-полимеразе использовать в качестве матрицы гибридизационную часть праймера.

Зонд *Scorpion* представляет собой шпильчатую структуру типа молекулярного маяка. На определенной стадии амплификации за счет образования в последовательности ампликона участка, комплементарного данному зонду, а также различий в энергии связей происходит раскрытие и разворачивание шпильки. Как у настоящего скорпиона, «хвост» этого составного праймера, разворачиваясь, «выбрасывается» вперед и отжигается на этом участке, приводя к пространственному разобщению тушителя и красителя и свечению последнего (рис. 9).

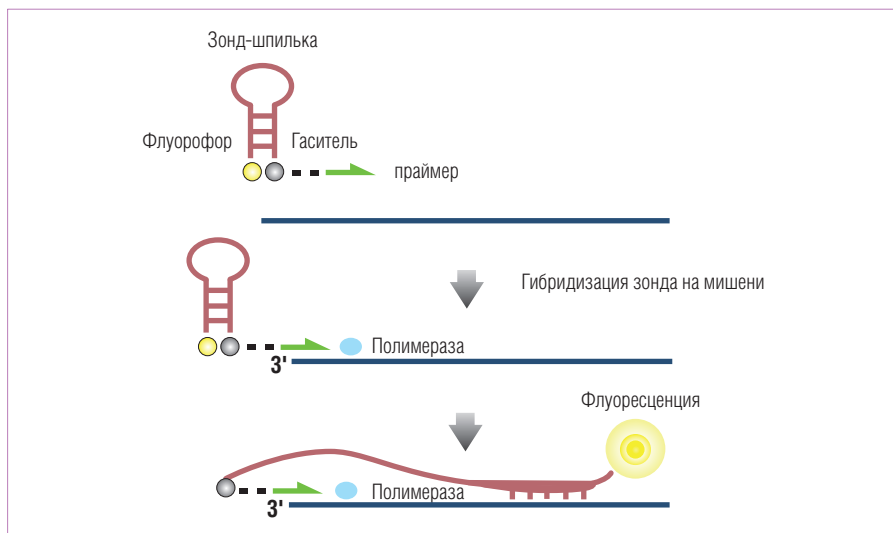


Рис. 9. Технология *Scorpion*

В зонде *Duplex Scorpion* подавление флуоресценции обеспечивается не шпильчатой структурой, а тушителем, входящим в состав дополнительного олигонуклеотида, частично комплементарного гибридизационной части нецельного праймера, состоящего из двух отдельных частей.

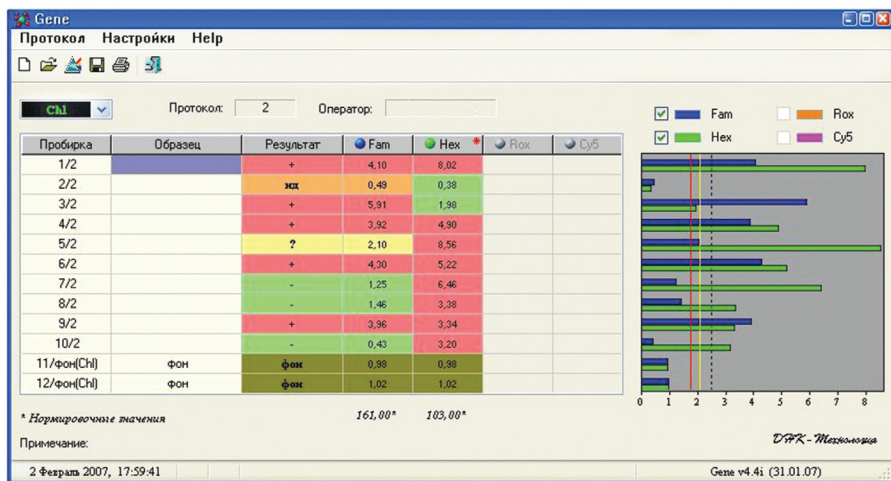
Высокоспецифичным является также подход, названный *PriProET (Primer-Probe Energy Transfer)*. Его отличие заключается в использовании пробы и праймера с одним флуорохромом каждый, и перенос энергии происходит между красителями, входящими соответственно в состав праймера и гибридизационного зонда, отжигающегося на таком расстоянии от праймера, на котором возможен эффективный перенос энергии.

Несмотря на разнообразие вариантов конструирования систем для идентификации мишени (ДНК/РНК), существуют два базовых подхода к детекции результатов ПЦР-анализа с использованием гибридационно-флуоресцентных технологий:

ПЦР с анализом результатов по конечной точке (*End-point PCR*) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации.

Одним из таких вариантов является метод FLASH (*FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization*) – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами.

Для проведения амплификации анализа результатов ПЦР FLASH используют специальное оборудование: термоциклеры и детекторы флуоресценции типа «Джин» и «Джин-4» производства компании ООО «НПО ДНК-Технология». В процессе своей работы прибор регистрирует флуоресцентное излучение, возникающее в реакционной смеси при освещении образца источником возбуждающего света. Регистрация производится последовательно для каждой из пробирок при ее позиционировании относительно оптического блока (рис. 10).



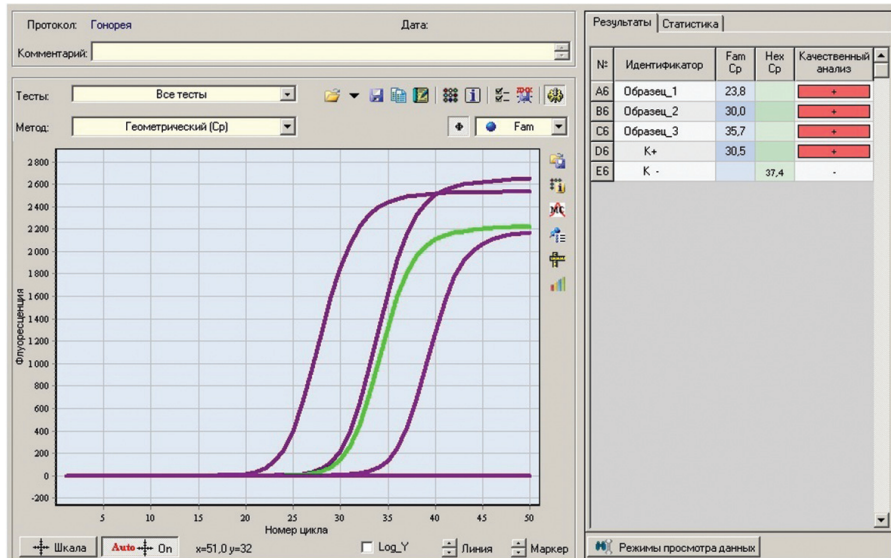
| | |
|-----|--------------------------|
| + | положительный результат |
| - | отрицательный результат |
| ? | сомнительный результат |
| нд | недостовверный результат |
| фон | фоновые пробирки |

Рис. 10. Результаты исследования в формате ПЦР FLASH (детектор флуоресценции «Джин» ООО «НПО ДНК-Технология»)

Метод позволяет проводить только качественный анализ, что существенно сокращает диагностические возможности лаборатории (определение вирусной нагрузки, анализ биоценозов), однако характеризуется простотой получения результата при невысоких затратах на оборудование и расходные материалы.

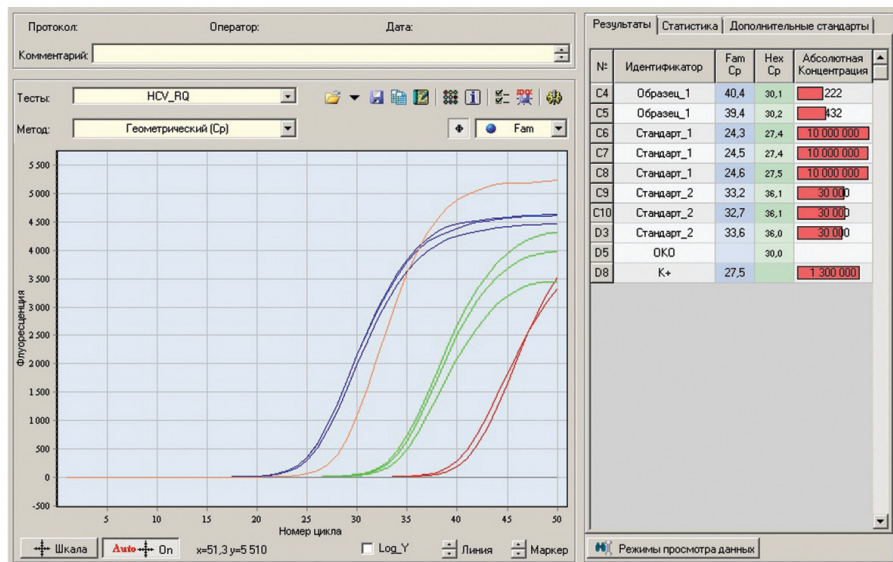
- ▶ ПЦР в режиме реального времени (*Real-Time PCR*, ПЦР-РВ) используется для одновременной амплификации, детекции и (при необходимости) измерения количества искомой мишени. Преимуществом данного подхода является возможность количественного определения специфической последовательности НК в образце после каждого цикла амплификации (рис. 11).

A



| Номер лунки | Идентификатор пробирки | Ср. Fam | Ср. Hex | Результат |
|-------------|------------------------|---------|---------|-----------|
| A6 | Образец_1 | 23,8 | | + |
| B6 | Образец_2 | 30,0 | | + |
| C6 | Образец_3 | 35,7 | | + |
| D6 | K+ | 30,5 | | + |
| E6 | K- | | 37,4 | - |

Б



| Номер лунки | Идентификатор пробирки | Ср, Fam | Ср, Hex | Концентрация, копий/мл |
|-------------|------------------------|---------|---------|------------------------|
| A1 | Образец_1 (HIV_RQ) | 35,4 | 31,9 | 4 460 |
| A2 | Образец_1 (HIV_RQ) | 36,0 | 32,5 | 3 020 |
| A3 | Стандарт_2 (HIV_RQ) | 27,5 | 29,2 | 1 000 000 |
| A4 | Стандарт_2 (HIV_RQ) | 27,4 | 29,3 | 1 000 000 |
| A5 | Стандарт_1 (HIV_RQ) | 27,4 | 29,5 | 1 000 000 |
| A6 | Стандарт_2 (HIV_RQ) | 35,8 | 37,6 | 3 000 |
| A7 | Стандарт_2 (HIV_RQ) | 36,1 | 38,5 | 3 000 |
| A8 | Стандарт_2 (HIV_RQ) | 36,1 | 38,1 | 3 000 |
| B1 | K+ (HIV_RQ) | 28,1 | | 633 000 |
| B1 | K- (HIV_RQ) | | 30,5 | |

Рис. 11. Результаты исследований в формате ПЦР-РВ (детектирующий амплификатор «ДТпрайм» ООО «НПО ДНК-Технология»

А – качественный анализ

Б – количественный анализ

Для анализа результатов ПЦР-РВ используют специальные *ДНК-амплификаторы*, например «ДТпрайм» или «ДТлайт» производства ООО «НПО ДНК-Технология», CFX (BioRad, США), COBAS Amplicor (Roche, США), ABI PRISM (ABI, США), Rotor-Gene (Qiagen, GmbH, Германия), SmartCycler и GeneXpert® System (Cepheid, США) и другие, с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе амплификации.

Детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков:

- 1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора);
- 2 – экспоненциальная амплификация;
- 3 – плато.

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового – так называемый пороговый цикл – зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Оборудование для ПЦР-РВ открывает широкий спектр возможностей:

- ▶ мультиплексный качественный и количественный анализ;
- ▶ ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, в том числе с количественной оценкой содержания искомой мРНК, определение уровня экспрессии гена в отдельной клетке или ткани;
- ▶ технология плавления и другое.

Принципы мультиплексной ПЦР и ОТ-ПЦР рассмотрены выше и давно используются в рутинной лабораторной практике. Интерес представляют диагностические возможности технологии плавления.

Плавление – двухэтапная технология ПЦР-РВ, когда на первом этапе осуществляется стандартная амплификация искомой мишени без детекции результатов накопления продукта амплификации, а на втором этапе происходит постепенное нагревание реакционной смеси, при котором двухцепочечный накопленный продукт денатурирует, то есть разделяется на одиночные нити ДНК. Флуоресцентная метка, связанная с двухцепочечной ДНК, при этом отделяется, и (в зависимости от вариантов реализации технологии плавления) детектируемая флуоресценция либо возрастает, либо убывает.

Профиль плавления – уникальная характеристика, которая определяется для каждой нуклеотидной последовательности содержанием ГЦ-пар. При правильной организации протокола анализ кривых плавления является очень чувствительным методом, позволяя обнаруживать замены одного нуклеотида в идентичных последовательностях, поэтому данная технология наиболее часто используется для генотипирования и идентификации SNP (*однонуклеотидный полиморфизм*, англ. *Single nucleotide polymorphism* – отличие последовательности ДНК размером в один нук-

леотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом) (рис. 12).

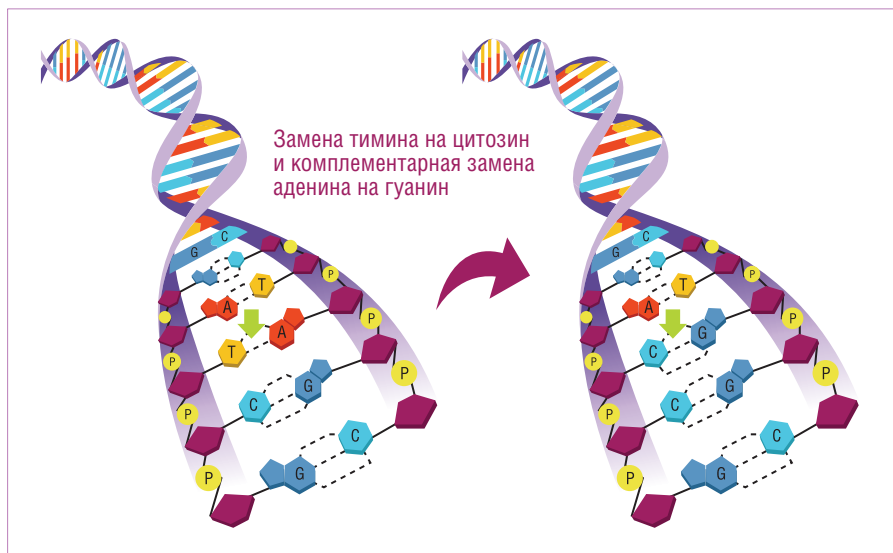


Рис. 12. Однонуклеотидный полиморфизм

Наиболее распространенными вариантами технологии плавления являются *HRM* и *метод примыкающих проб*.

Технология HRM (англ. *High Resolution Melting*) базируется на гетеродуплексном анализе с использованием интеркалирующего красителя (рис. 13).

Первый этап – стандартная ПЦР, приводящая к накоплению ампликонов, которые содержат исходную (условно «нормальную») и измененную (SNP) последовательности нуклеотидов. Поскольку в ПС содержится интеркалирующий краситель типа SYBR Green (или иной), на этапе элонгации он встраивается в двойную цепь и флуоресцирует, на этапе денатурации краситель высвобождается в ПС и флуоресценция прекращается. Тем не менее наличие или отсутствие флуоресценции на данном этапе не детектируется.

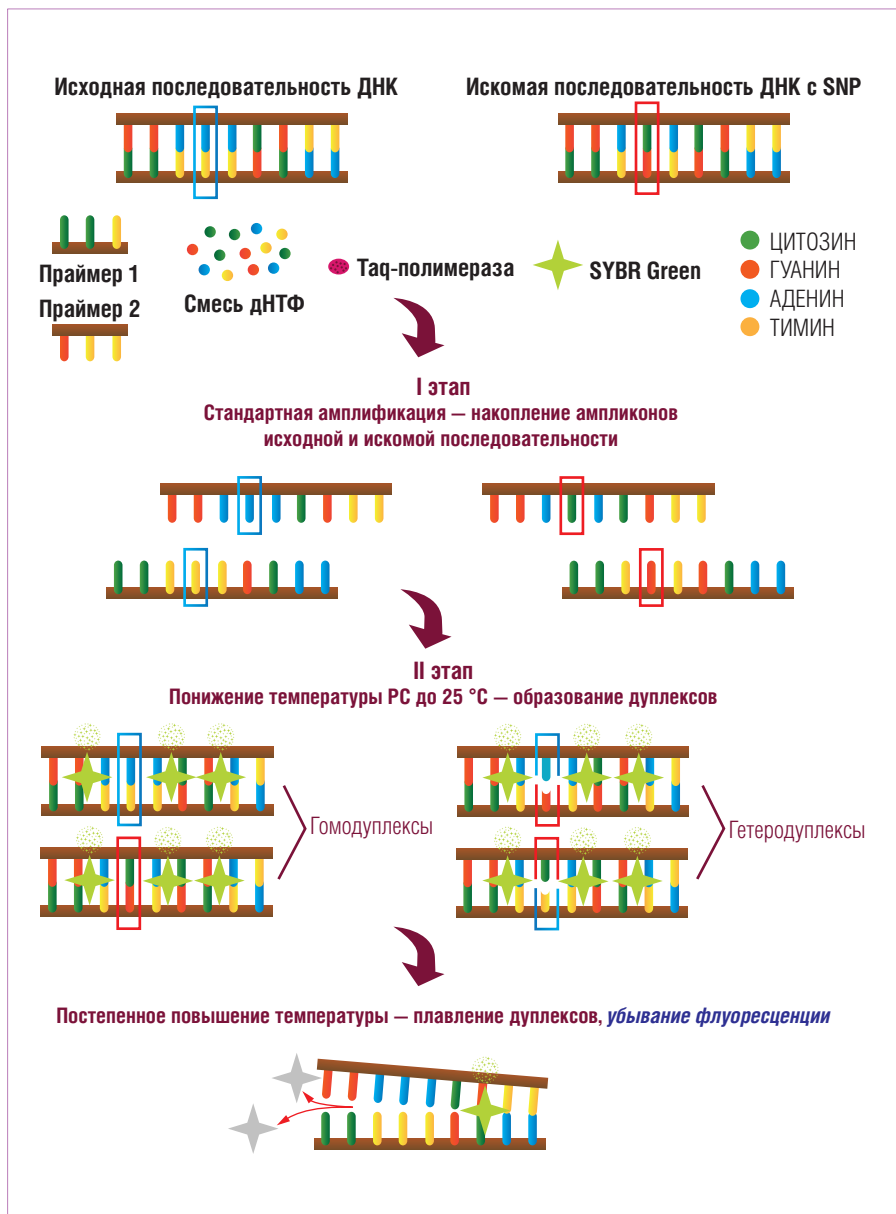


Рис. 13. Технология HRM

На втором этапе температуру РС снижают до 25 °С – условие, при котором одноцепочечные ампликоны в произвольном порядке (с низкой специфичностью с точки зрения принципа комплементарности) связываются между собой – формируются дуплексы. При этом в РС присутствуют два типа дуплексов:

- ▶ высокоспецифичные (полностью комплементарные) гомодуплексы (условно: «нормальный» ампликон + «нормальный» ампликон, SNP-ампликон + SNP-ампликон);
- ▶ низкоспецифичные (частично комплементарные) гетеродуплексы (условно: «нормальный» ампликон + SNP-ампликон).

При этом происходит встраивание интеркалирующего красителя между цепями дуплекса и он начинает флуоресцировать. На этом этапе температуру РС начинают постепенно повышать и фиксировать флуоресцентный сигнал. Плавление (расхождение цепей дуплекса) сопровождается высвобождением в РС интеркалирующего красителя и, как следствие, убыванием флуоресценции. Принципиальной является разница температур плавления каждого вида гомо- и гетеродуплексов, что позволяет их идентифицировать по сочетанию конкретной температуры с уровнем флуоресценции.

Особенностью и плюсом HRM-анализа является чрезвычайно малый шаг увеличения температуры на втором этапе: не более 0,1–0,3 °С, что позволяет не только идентифицировать уже известные SNP, но и обнаруживать новые однонуклеотидные замены. Однако такой малый шаг является одновременно и минусом, поскольку не остается возможности для визуальной интерпретации результатов. Кривые плавления для разных генотипов почти не отличаются, и эти минимальные различия необходимо обрабатывать математическими методами, что потенциально увеличивает ошибку в интерпретации результатов, особенно в случае гетерозигот.

В рутинной диагностической практике более надежным является использование другого варианта технологии плавления – *метода примыкающих проб* (рис. 14).

Первый этап аналогичен технологии HRM – стандартная ПЦР, приводящая к накоплению ампликонов, которые содержат исходную (условно «нормальную») и измененную (SNP) последовательности нуклеотидов. Принципиальным отличием является то, что в РС вводят не интеркалирующий краситель, а зонды, меченные флуорофорами.

Компания «ДНК-Технология» для повышения качества и специфичности SNP-генотипирования использует два типа зондов: *сиквенс-специфичные типизирующие зонды* (нуклеотидная последовательность зонда строго специфична участку искомой матрицы в зоне предполагаемого полиморфизма) и *универсальный тугоплавкий зонд* с гасителем флуоресценции (нуклеотидная последовательность этого зонда комплементарна участку матрицы **вне** зоны предполагаемого полиморфизма, но в непосредственной близости от нее). Важной особенностью является и то, что для идентификации конкретного SNP используется пара зондов, меченных разными флуорофорами, то есть становится возможной двойная проверка результата гибридизации «зонд-мишень».

Так же, как и в технологии HRM, наличие или отсутствие флуоресценции на первом этапе не детектируется.

На втором этапе температуру РС снижают до 25 °С – условие, при котором одноцепочечные ампликоны в произвольном порядке (с низкой специфичностью с точки зрения принципа комплементарности) связываются с зондами – формируются дуплексы. При этом в состав каждого дуплекса входит универсальный тугоплавкий зонд, который блокирует флуоресценцию типизирующих зондов. При этом в РС присутствуют два типа дуплексов:

- ▶ высокоспецифичные (полностью комплементарные) гомодуплексы (условно: «нормальный» ампликон + «нормальный» типизирующий зонд, SNP-ампликон + SNP-типизирующий зонд);
- ▶ низкоспецифичные (частично комплементарные) гетеродуплексы (условно: «нормальный» ампликон + SNP-типизирующий зонд или SNP-ампликон + «нормальный» типизирующий зонд).

На этом этапе температуру РС начинают постепенно повышать и фиксировать флуоресцентный сигнал. Плавление (расхождение цепей дуплекса) сопровождается высвобождением в РС не интеркалирующего красителя, как в технологии HRM, а универсального зонда с гасителем флуоресценции и, как следствие, *нарастанием* флуоресцентного сигнала. Так же, как и в технологии HRM, температура плавления у каждого вида гомо- и гетеродуплексов своя, что позволяет их идентифицировать по сочетанию конкретной температуры с уровнем флуоресценции.

Плюсом данной технологии по сравнению с HRM-анализом является *определение аллельных вариантов гена в диапазоне температур не менее 4–5 °С* – максимальная стабильность и воспроизводимость результатов, не имеет технологических аналогов у других производителей. Кривые плавления для разных генотипов существенно отличаются по температурам и могут быть оценены как программно, так и визуально, что принципиально важно для идентификации гетерозигот. Минус технологии – невозможность выявлять новые (ранее неизвестные) SNP (рис. 15).

Исходная последовательность ДНК



Смесь дНТФ



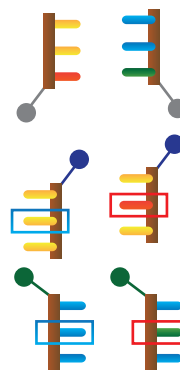
Тақ-полимераза



Искомая последовательность ДНК с SNP



ЦИТОЗИН
ГУАНИН
АДЕНИН
ТИМИН



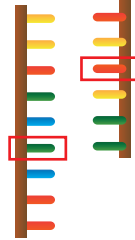
Сиквенса-специфичные тигрующие зонды

Универсальный тигрующий зонд с тагителем



I этап

Стандартная амплификация — накопление ампликонов исходной и искомой последовательностей



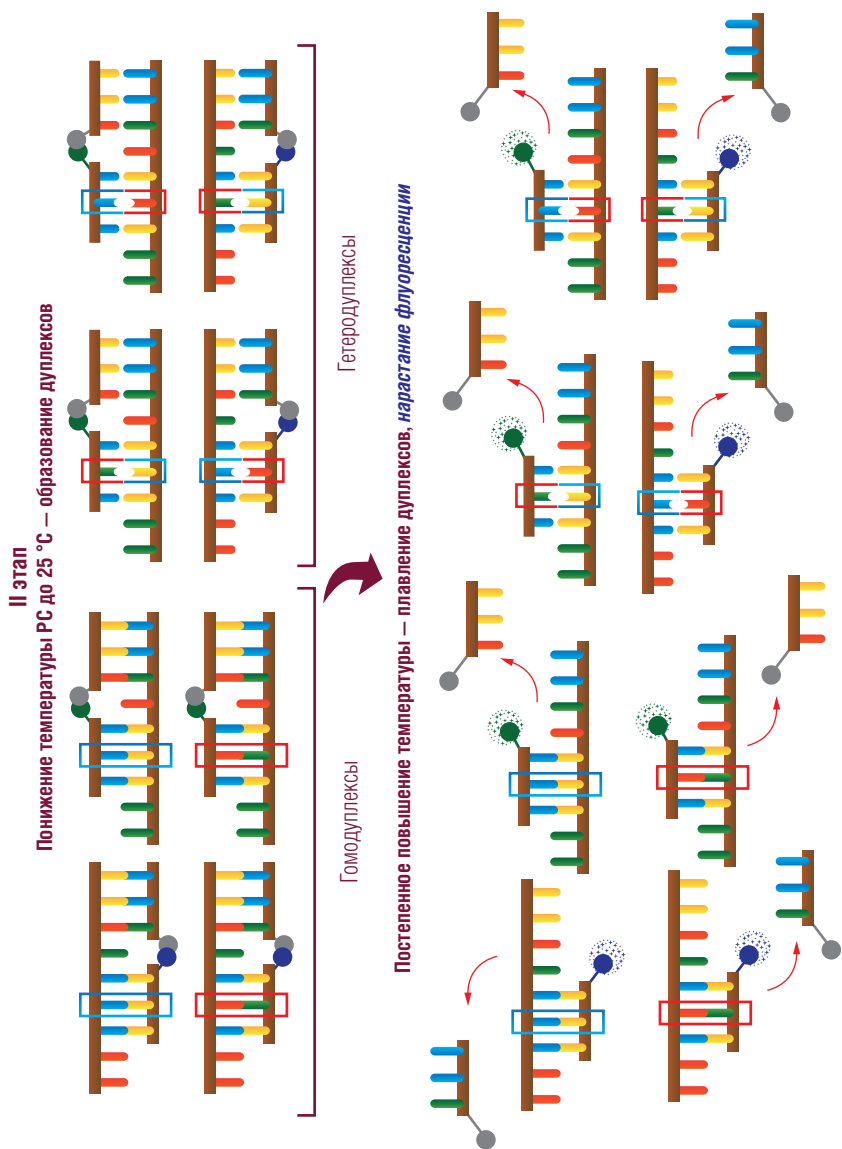
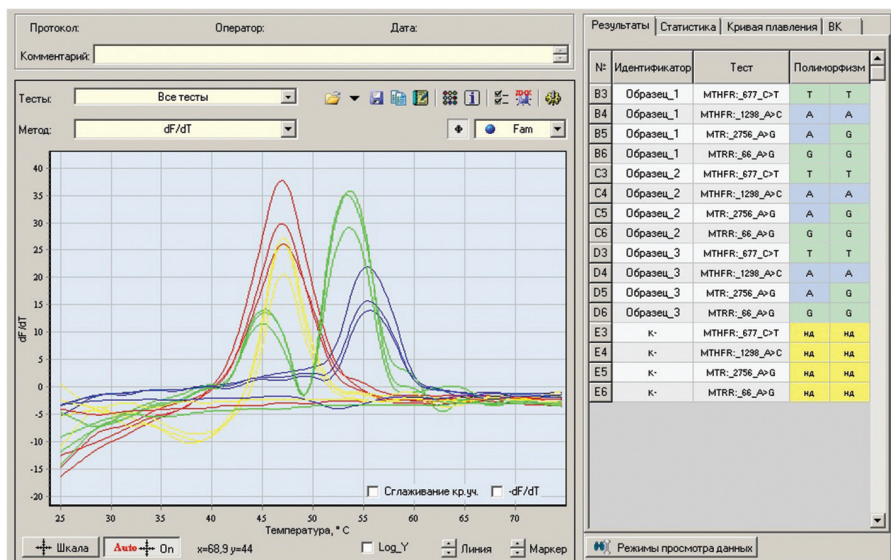


Рис. 14. Технологии плавления: метод примыкающих проб



Идентификатор образца: Образец_1

| № | Наименование исследования | Результаты | |
|---|---------------------------|------------|---|
| | | Генотип | |
| 1 | MTHFR:_677_C>T | T | T |
| 2 | MTHFR:_1298_A>C | A | A |
| 3 | MTR:_2756_A>G | A | G |
| 4 | MTRR:_66_A>G | G | G |

Рис. 15. Анализ кривых плавления (метод примыкающих проб) в формате ПЦР-РВ (детектирующий амплификатор «ДТпрайм» ООО «НПО ДНК-Технология», набор реагентов «Генетика метаболизма фолатов»)

С точки зрения вариантов идентификации SNP достаточно распространена *аллель-специфическая ПЦР*, которая строится на использовании *аллель-специфических праймеров*. Для реализации технологии могут быть использованы два варианта универсальных праймеров: первый вариант – праймер должен быть строго комплементарен посвоему 3'-концевому нуклеотиду, соответствующему нуклеотиду матричной ДНК. В противном случае эффективность удлинения праймера во время ПЦР резко снижается и при определенных сочетаниях ошибочно спаренных нуклеотидов может отсутствовать вообще. Второй вариант – универсальный праймер содержит 3'-концевой нуклеотид, всегда некомплементарный матрице, а мутантный нуклеотид матрицы попадает в его внутреннюю часть. В этом случае продукты ПЦР отсутствуют, если в гибриде

во внутреннюю часть праймера попадает любой некомплементарный мутантный нуклеотид матричной ДНК вне зависимости от его точной локализации. Такие праймеры позволяют обнаруживать любые точечные мутации в гомозиготном состоянии.

Для выявления гетерозиготного состояния анализируемого гена могут быть использованы «мутантный» и «нормальный» праймеры разных размеров, которые различаются по длине их 5'-концевых последовательностей, полностью комплементарных анализируемой ДНК. В этом случае в процессе ПЦР в реакционную смесь можно одновременно добавлять оба аллель-специфических праймера вместе с общим для обоих встречным праймером.

Идентификация SNP происходит по сравнению C_r (метод прямого сравнения кривых разгорания флуоресценции) между «нормой» и «мутацией».

Минусом данной технологии в большинстве коммерческих тестов является необходимость использования двух пробирок для выявления единственного SNP, что делает систему уязвимой и зависимой:

- ▶ от наличия/отсутствия ингибиторов (в одной пробирке может быть, в другой — нет);
- ▶ необходимости полной синхронности старта ПЦР в обеих пробирках;
- ▶ равномерности внесения реагентов и ДНК в обе пробирки.

В совокупности метод ПЦР-РВ обладает широким спектром вариантов реализации и точек приложения в научной и клинической практике. Существенным плюсом технологии является возможность частичной или полной автоматизации процесса, что позволяет стандартизовать условия работы, повысить качество получаемых результатов и увеличить пропускную способность лабораторий.

3.3. Амплификаторы детектирующие для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени

Внимание! Выбор модели прибора для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени должен определяться:

- ▶ диагностическими (в медицинских учреждениях) или научными (в научно-исследовательских учреждениях) задачами;
 - ▶ планируемым объемом исследований за единицу времени;
 - ▶ режимом работы лаборатории (одна смена или более);
 - ▶ необходимостью сочетать несколько вариантов технологий ПЦР-РВ.
-

В связи с этим на первом этапе важно *определить базовый перечень наборов реагентов*, удовлетворяющих диагностическим/научно-исследовательским потребностям лаборатории и обеспечивающих возможность их адаптации к амплификаторам

определенного типа (данная информация предоставляется производителями наборов реагентов на сайтах компаний и в рекламно-информационных материалах).

Наиболее распространенные модели амплификаторов относятся к категории *открытых* приборов, то есть большинство производителей наборов реагентов осуществило адаптацию своей продукции к этому оборудованию. *Закрытые* приборы позволяют реализовать только тот перечень исследований, который определен их производителем (он же, как правило, является и производителем наборов реагентов).

Важной характеристикой *открытых* приборов является возможность использования для ПЦР-анализа широкого спектра расходных материалов: одиночные и стрипованные микропробирки с выпуклой или плоской крышками, микропланшеты для ПЦР разных производителей. В данном случае преимуществом обладают те амплификаторы, в функционал которых входит возможность *настройки термоблока по высоте пробирок* – измерение высоты пробирок рекомендуется производить при переходе на другой тип пробирок или стрипов, при возникновении сомнения в качестве прижима пробирок «горячей крышкой».

Емкость термоблока (количество лунок в термоблоке) – важная характеристика при определении объема лабораторных исследований, которые необходимо провести за единицу времени. В данном случае необходимо рассчитать количество пробирок с РС, необходимое для анализа образцов, с учетом ПКО, ОКО, стандартов или калибраторов (в случае количественной ПЦР), дублей (если это предусмотрено технологией), которые будут амплифицироваться одновременно. Кроме того, следует обратить внимание на возможность совмещения нескольких разных тестов при одном запуске прибора (программа амплификации должна быть единой для выбранного перечня).

В большинстве своем термоблоки амплификаторов с детекцией результатов в режиме реального времени рассчитаны на 96 пробирок. При значительных потоках лабораторных исследований или на этапе планирования увеличения пропускной способности лаборатории целесообразнее рассмотреть варианты приобретения 384-луночных приборов с возможностью автоматизации процесса составления РС и внесения выделенной НК. При малой пропускной способности лаборатории, напротив, экономически выгоднее и эргономичнее, с точки зрения рутинной работы, приборы с 48-луночными термоблоками. Причем наличие двух и более приборов с малой емкостью термоблока позволяет совмещать за единицу времени несколько тестов с разными программами амплификации, что дает возможность небольшим лабораториям поддерживать широкий перечень исследований при максимальной эффективности использования амплификаторов.

С точки зрения других характеристик приборов, необходимых для реализации выбранных тестов, принципиальным может оказаться число *каналов детекции* для проведения мультиплексного анализа.

Наиболее часто оптическая система амплификаторов для детекции результатов в режиме реального времени включает четыре-шесть каналов детекции. Соответственно, для 4-канальных приборов максимально возможный мультиплексный ва-

риант – три искомых мишени (например, три возбудителя) + ВК, детектируемые в одной пробирке. Для 6-канальных приборов возможно использование мультиплексов на пять мишеней + ВК. Увеличение числа каналов детекции сопряжено со значительным удорожанием наборов реагентов за счет введения дополнительных флуорофоров и снижением качества регистрации флуоресценции по причине «кросс-токов» (перекрестных сигналов между каналами детекции).

ВАЖНО! Амплификаторы детектирующие для ПЦР-РВ относятся к категории медицинских изделий. В соответствии с Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 29.07.2017) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (статья 38): на территории Российской Федерации разрешается обращение медицинских изделий, *зарегистрированных* в порядке, установленном Правительством Российской Федерации, уполномоченным им федеральным органом исполнительной власти. Сами приборы и их производители должны входить в государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. Реестр доступен для ознакомления на сайте Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор) (<http://www.roszdravnadzor.ru>).

Утвержден перечень медицинских изделий, подлежащих отнесению к средствам измерений в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений в соответствии со следующими документами:

- ▶ Постановлением Правительства Российской Федерации от 20 апреля 2010 г. № 250 «О перечне средств измерений, поверка которых осуществляется только аккредитованными в установленном порядке в области обеспечения единства измерений государственными региональными центрами метрологии»;
- ▶ Постановлением Правительства РФ от 21 февраля 2017 г. № 219 «О внесении изменений в перечень средств измерений, поверка которых осуществляется только аккредитованными в установленном порядке в области обеспечения единства измерений государственными региональными центрами метрологии» (не вступило в силу);
- ▶ Положением части 8 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ;
- ▶ Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15.08.2012 № 89н «Об утверждении порядка проведения испытаний в целях утверждения типа средств измерений, а также перечня медицинских изделий,

относящихся к средствам измерений в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, в отношении которых проводятся испытания в целях утверждения типа средств измерений»;

- ▶ Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.02.2014 № 81н «Об утверждении перечня измерений, относящихся к сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, выполняемых при осуществлении деятельности в области здравоохранения, и обязательных метрологических требований к ним, в том числе показателей точности».

С учетом положений указанных документов *автоматические анализаторы для молекулярно-биологических исследований не включены в перечень медицинских изделий, относящихся к средствам измерений, и при государственной регистрации не подлежат испытаниям в целях утверждения типа средств измерений*. Соответственно, амплификаторы детектирующие для ПЦР-РВ не подлежат проверке в установленном для средств измерения порядке.

Актуальный перечень средств измерений, в том числе изделий медицинского назначения, используемых в ПЦР-лабораториях, доступен на официальном сайте РОС-СТАНДАРТ (Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений): <http://www.fundmetrology.ru>.

4. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОРГАНИЗАЦИИ ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ

Базовые требования к организации работы медицинских лабораторий отражены в следующих нормативных документах:

- ▶ ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности»;
- ▶ ГОСТ Р 53022.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 2 «Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)»;
- ▶ ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 3 «Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»;
- ▶ ГОСТ Р 53022.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 4 «Правила разработки требований к своевременности предоставления лабораторной информации»;
- ▶ ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии клинические лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований». Часть 4 «Правила ведения преаналитического этапа»;
- ▶ ГОСТ Р 53133.2-2008 «Технологии клинические лабораторные. Контроль качества клинических лабораторных исследований». Часть 2 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»;
- ▶ ГОСТ Р 52905-2007 (Национальный стандарт РФ) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»;
- ▶ СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и СП 1.3.2885-11 Дополнения и изменения № 2 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»;
- ▶ СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях. М., 2015;
- ▶ Применение установок импульсного ультрафиолетового излучения сплошного спектра в медицинских организациях. Методические рекомендации. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015;

- ▶ СП 3.5.1378-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и осуществлению дезинфекционной деятельности»;
- ▶ МР 3.5.1.0103-15 по применению метода аэрозольной дезинфекции в медицинских организациях;
- ▶ ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы»;
- ▶ ОСТ 91500.13.0001-2003 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»;
- ▶ СанПиН 2.1.7.2527-09 Изменения 1 к санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений»;
- ▶ СП 158.13330.2014 «Здания и помещения медицинских организаций. Правила проектирования»;
- ▶ СН 535-81 «Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций»;
- ▶ СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»;
- ▶ Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».

На данный момент принципы организации лаборатории и этапы проведения ПЦР-анализа, а также деятельность персонала лабораторий, использующих молекулярно-генетические методы исследования, регламентированы МУ 1.3.2569-09. 1.3 «Эпидемиология. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

ВАЖНО!

Данные МУ распространяются не только на лаборатории, которые работают с материалом, содержащим (или вызывающим подозрения на содержание) микроорганизмы I–IV групп патогенности, но и все другие ПЦР-лаборатории (в том числе осуществляющие медико-генетические исследования, анализ пищевых продуктов и материалов из объектов окружающей среды). Во многом это оправдано универсальностью самого метода ПЦР. Соответственно, МУ 1.3.2569-09. 1.3 определяют общие требования к организации и проведению работ с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), помещениям и оборудованию лаборатории, контролю качества проводимых исследований, а также базовый перечень требований к обработке помещений и обеззараживанию материала.

Согласно действующей нормативной документации (СП 158.13330.2014 «Здания и помещения медицинских организаций. Правила проектирования»), *диагностические лаборатории следует планировочно изолировать от остальных подразделений медицинской организации, то есть они должны быть непроходными, иметь вход для персонала и вход или передаточное окно для доставки материалов на анализы. Лаборатории следует планировочно разделять на две зоны: зону для исследований и зону для персонала и работы с документацией.*

В зависимости от мощности и профиля лаборатории зона для исследований может быть предусмотрена в виде:

- ▶ зала автоматизированных линий по проведению анализов с автоматами для пробоподготовки, анализаторами и компьютерами для обработки результатов;
- ▶ отдельных лабораторных помещений, разделенных по этапам и видам анализа.

При этом СП 158.13330.2014 определяет, что в составе клинических диагностических лабораторий *микробиологическая группа помещений выделяется из общей зоны исследований* в отдельную зону со входом через шлюз. Принадлежность к структурным подразделениям (отделы, лаборатории) микробиологической группы определяется наличием лицензии на деятельность, связанную с использованием возбудителей инфекционных заболеваний конкретной группы патогенности, и регулируется в соответствии с СП 1.3.2322-08 и СП 1.3.3118-13.

Помещения микробиологической группы подразделяются на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с патогенными биологическими агентами (ПБА) и их хранение, и «чистую» зону, где не проводятся работы с ПБА.

Планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать точность продвижения ПБА, персонала и выполнение иных требований настоящих санитарных правил. **В «чистой» зоне лабораторий необходимо располагать:**

- ▶ гардероб для верхней одежды;
- ▶ помещения для проведения подготовительных работ (препараторская, моечная, приготовление и разлив питательных сред и другие);
- ▶ помещение для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды (стерилизационная);
- ▶ помещение с холодильной камерой или холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов;
- ▶ комнаты для работы с документами и литературой;
- ▶ комнату отдыха;
- ▶ кабинеты заведующего и сотрудников;
- ▶ подсобные помещения;
- ▶ туалет.

В «заразной» зоне располагают:

- ▶ блок для работы с инфицированными животными;
- ▶ боксированные помещения для проведения микробиологических исследований, состоящие из бокса и предбоксника;

- ▶ боксированные помещения для проведения серологических исследований;
- ▶ боксированные помещения для люминесцентной микроскопии;
- ▶ боксированные помещения для проведения зооэнтомологических работ;
- ▶ боксированные помещения для проведения генодиагностических исследований (ПЦР-лаборатория);
- ▶ автоклавную для обеззараживания материала;
- ▶ термостатную (термальную) комнату;
- ▶ комнату для ведения записей в рабочих журналах.

На границе «чистой» и «заразной» зон необходимо располагать санитарный пропускник, состоящий из помещения для личной одежды, душевой и помещения для рабочей одежды. На границе зон на входе в помещение душевой необходимо устанавливать герметичную дверь, на которую должен быть нанесен знак «Биологическая опасность».

При наличии в организации на одной территории нескольких лабораторий разрешается размещение и оборудование централизованных автоклавных и стерилизационных.

При расположении в одном блоке нескольких профильных лабораторий общими для них могут быть: блок для работы с инфицированными животными, санитарный пропускник, автоклавные или установки для обеззараживания отходов, моечные, комнаты для приготовления питательных сред и другие помещения.

В научно-исследовательских учреждениях, имеющих единые санитарные пропускники, централизованные автоклавные и прочие места, обслуживающие несколько лабораторий, допускается размещение в «заразной» зоне вспомогательных помещений, в которых не проводят работы, связанные с использованием или хранением ПБА. Набор помещений определяется функциональными задачами подразделений.

В соответствии с МУ1.3.2569-09. 1.3 зонирование собственно ПЦР-лаборатории (набор *последовательно* расположенных самостоятельных рабочих помещений или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений) осуществляется в зависимости от способа детекции результатов анализа (рис. 14):

- ▶ **Рабочая зона 1** – прием, регистрация, разбор и первичная обработка материала для исследования.
- ▶ **Рабочая зона 2** – выделение нуклеиновых кислот.
- ▶ **Рабочая зона 3** – проведение реакции амплификации и учет ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции.
- ▶ **Рабочая зона 4** – учет результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот на ДНК-чипах и/или секвенирования; детекция методом электрофореза или гибридационно-ферментным методом.

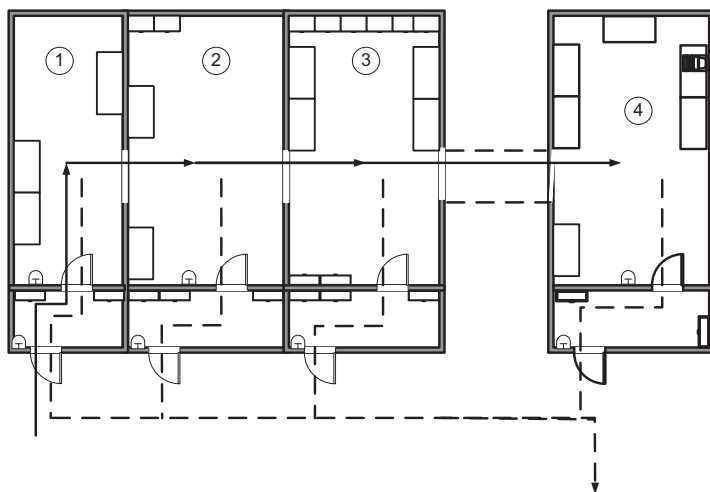
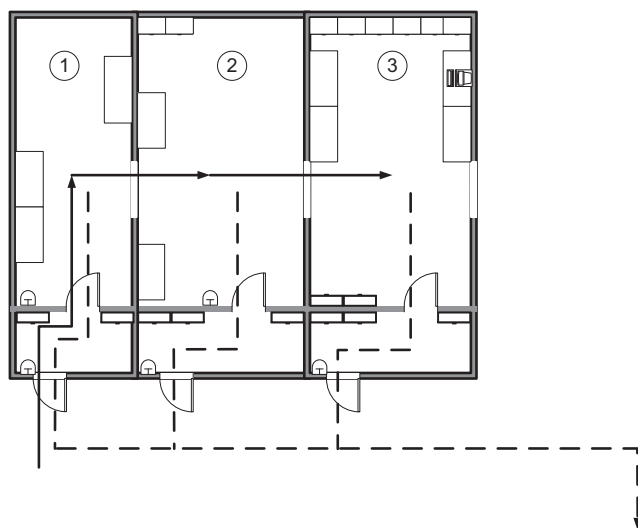
А**Б**

Рис. 16. Зонирование ПЦР-лаборатории

А – ПЦР на ДНК-чипах и/или секвенирование; детекция методом электрофореза или гибридационно-ферментным методом

Б – ПЦР с гибридационно-флуоресцентными методами детекции

На данный момент отсутствуют какие-либо регламентирующие положения относительно необходимых площадей конкретно для ПЦР-лабораторий. Первоначально за основу проектирования помещений данной категории брали нормы, определенные в СН 535-81 «Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций (действующие)», поэтому минимальная площадь рабочих зон соответствовала 12 м² (нормы для бактериологической лаборатории).

Площадь и специфику работы в каждой зоне необходимо принимать во внимание при расчете мощности вентиляции, поскольку МУ 1.3.2569-09. 1.3 определяют необходимость оснащения ПЦР-лаборатории индивидуальной приточно-вытяжной вентиляцией, при этом в Рабочих зонах 1 и 2 вытяжка должна преобладать над притоком, а в Рабочей зоне 3 объем приточного воздуха должен соответствовать объему на вытяжке. Рабочие зоны 4-1 и 4-2 располагают изолированно от Рабочих зон 1–3 для предотвращения их контаминации продуктами амплификации через воздушный поток. Исходя из указанных рекомендаций и основываясь на СН 535-81 (нормы для бактериологической лаборатории), расчеты кратности воздухообмена могут быть следующими (табл. 2).

Таблица 2. Пример расчета кратности воздухообмена в зависимости от помещения

| Наименование помещения | Кратность воздухообмена (м ³ /ч) | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|
| | приток | вытяжка |
| Зона приема и первичной обработки материала | 5 | 6 |
| Зона подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот | 5 | 6 |
| Зона приготовления реакционных смесей, проведения ПЦР, ОТ-ПЦР, учет результатов гибридационно-флуоресцентных методов ПЦР | 5 | 5 |
| Зона учета результатов методом электрофореза или гибридационно-ферментного анализа | 5 | 7 |

При этом в МУ 1.3.2569-09.1.3. обозначено, что при необходимости возможно совмещение Рабочей зоны 2 и Рабочей зоны 3 в одном помещении при наличии в нем отдельных боксов биологической безопасности II или III класса для каждой из рабочих зон. Исходя из этого, приточно-вытяжная вентиляция будет общей для указанных зон, однако не указано, какая в этом случае должна быть кратность воздухообмена.

Зонирование ПЦР-лаборатории определяет следующий порядок работы:

1. В Рабочей зоне 1 осуществляют прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, первичную подготовку (концентрирование материала путем центрифугирования, фильтрации, иммуносорбции, суспендирование, перевод сухих и плотных материалов в жидкую фазу и т. д.), объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала.

Допускается проведение приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала, исследуемого другими методами диагностики (бактериологическими, вирусологическими, иммунологическими и т. д.). При работе с микроорганизмами I–II групп патогенности допускается размещение Рабочей зоны 1 в помещениях блока для работы с инфицированными животными.

Материал из Рабочей зоны 1 подлежит передаче в Рабочую зону 2 только после обеззараживания в маркированных одноразовых микроцентрифужных пробирках объемом 1,5–2 мл с закрытой крышкой.

2. В рабочей зоне 2 проводят выделение и очистку нуклеиновых кислот. После окончания работы в Рабочей зоне 2 пробирки передают в Рабочую зону 3.

3. В Рабочей зоне 3 осуществляют приготовление реакционных смесей, проведение обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции.

ВАЖНО! Согласно МУ 1.3.2569-09.1.3, приготовление реакционных смесей для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот осуществляют до доставки в Рабочую зону 3 проб, подготовленных в Рабочей зоне 2.

В случае необходимости проведения обратной транскрипции (отдельно от этапа амплификации) важно обеспечить корректные условия хранения выделенной РНК до момента ее внесения в подготовленную РС для ОТ. Это обусловлено нестабильностью нуклеиновой кислоты, особенно при комнатной температуре (хранение – не более 30 минут), поэтому полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции ОТ. На этапе составления РС для ОТ пробирки с выделенной РНК желательно убрать в холодильник (при +2 ... +8 °С – хранение до 4 часов). Реагенты для ОТ и/или амплификации, режим хранения которых соответствует –18 ... –20 °С, также не рекомендуется долго держать вне морозильной камеры.

Вообще, если процесс ОТ и/или амплификации существенно отдален по времени от процесса выделения НК, то допускается длительное хранение выделенных НК (очищенные препараты РНК и ДНК, кДНК) при температуре до –20 °С в течение 1 месяца, при –70 °С – до 6 месяцев. При этом важно учитывать, что *любой выбранный режим хранения сопряжен с деградацией препарата НК* и, как следствие, приводит к снижению чувствительности ПЦР. Особенно критичным это может быть для низкокопийных образцов (высокий риск ложноотрицательных результатов). Рекомендацией в данной ситуации может быть строгое следование инструкциям конкретного производителя наборов реагентов для выделения, ОТ и амплификации. При этом

в соответствии с МУ 1.3.2569-09.1.3 образцы проб, содержащих нуклеиновые кислоты и (или) ампликоны, хранят отдельно от реагентов в разных холодильниках.

В целом зональность ПЦР-лаборатории должна обеспечить поточность движения (однонаправленное движение) исследуемого материала, проб нуклеиновых кислот, продуктов амплификации. При этом передачу исследуемого материала в Рабочую зону 1 и проб при смежном расположении помещений Рабочих зон 1, 2, 3 желательно осуществлять через шлюзовые передаточные окна, а в Рабочие зоны 4–1 и 4–2 – через передаточные окна.

С точки зрения оснащения ПЦР-лаборатории в МУ 1.3.2569-09.1.3 даны рекомендации по базовому перечню оборудования для каждой рабочей зоны. Важно понимать, что данный перечень не в полной мере удовлетворяет потребностям каждой отдельно взятой лаборатории. Как и в случае с амплификаторами с детекцией результатов в режиме реального времени, для того чтобы оптимально подобрать оборудование, необходимо учитывать:

- *диагностические и/или научные задачи;*
- *планируемый объем исследований за единицу времени;*
- *режим работы лаборатории (одна или более смен);*
- *необходимость сочетать несколько вариантов технологий ПЦР.*

Например, в соответствии с МУ 1.3.2569-09.1.3 оснащение Рабочей зоны 1 должно включать:

1. Бокс биологической безопасности II или III класса защиты.
2. Центрифугу для пробирок объемом 5–100 мл до 3 тыс. об./мин.
3. Микроцентрифугу/вортекс.
4. Настольную центрифугу для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5–2 мл до 10 000 г.
5. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25–100 °С.
6. Термостатируемый шейкер для пробирок.
7. Установку для фильтрации воды с набором фильтров.
8. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки 1,5 или 2,0 мл.
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
11. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.
12. Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С и не выше –16 °С (для хранения исследуемого материала). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от +2 до +8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру не выше –16 °С.

13. Морозильную камеру на $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (при необходимости, в случае длительного хранения материала).

14. Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.

15. Емкость с 70%-м этиловым спиртом.

Тем не менее, если ПЦР-лаборатория по своему функционалу входит в состав *микробиологической группы помещений*, то прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, первичную подготовку (объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала) допускается проводить в помещении, общем для нескольких структурных подразделений. Соответственно, необходимость организации для ПЦР-лаборатории отдельной Рабочей зоны 1 отсутствует.

Рекомендуемое оснащение Рабочей зоны 2 в соответствии с МУ 1.3.2569-09.1.3:

1. Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.
2. Микроцентрифуга/вортекс.
3. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5–2 мл до 10 000 г.
4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25–100 $^{\circ}\text{C}$.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл.
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл.
10. Штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл.
11. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 $^{\circ}\text{C}$ и не выше $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ (для хранения наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от +2 до +8 $^{\circ}\text{C}$, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру не выше $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$.
12. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от +2 до +8 $^{\circ}\text{C}$ (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
14. При исследовании материала, подозрительного с точки зрения зараженности возбудителями III–IV групп патогенности, не образующими спор, допускается использование автоматизированного оборудования для выделения нуклеиновых кислот.

В данном случае перечень и количество оборудования будет напрямую зависеть от:

- ▶ технологий выделения НК;
- ▶ объема и спектра реализуемых (или планируемых к реализации) исследований за единицу времени.

При выборе технологий выделения НК необходимо заранее ознакомиться с рекомендациями производителей наборов реагентов для выделения НК.

Например, лаборатория планирует осуществлять пренатальную диагностику. Особенность данной технологии – необходимость выделения фетальной ДНК (фДНК), которая на ранних сроках беременности содержится в крови матери в низком количестве и требует дополнительных манипуляций в процессе выделения. Существующие на данный момент коммерческие наборы реагентов для выделения фДНК используют либо колоночный метод выделения, либо модификацию метода преципитации, для реализации которого строго необходимо приобретение дополнительного оборудования – ледяного штатива, который поддерживает температурный режим внутри лунок от -10 до -20 °С в течение 3 часов при комнатной температуре окружающей среды.

Если в лаборатории планируется использование технологии выделения на магнитных частицах в ручном режиме, то необходимым дополнительным оборудованием будет магнитный штатив.

Объем и спектр исследований, а также режим работы лаборатории определяют необходимость приобретения не дополнительного (не входит в перечень МУ 1.3.2569-09.1.3), а базового рекомендованного оборудования.

Если лаборатория планирует широкий спектр исследований (анализ на выявление возбудителей ЗППП, количественный анализ микрофлоры УГТ, выявление и определение вирусной нагрузки возбудителей гемотрансмиссивных инфекций, генотипирование человека и т. д.), то даже при небольших ежедневных поступлениях биоматериала необходимо учитывать совмещение нескольких технологий выделения НК (экспресс-методы, метод преципитации или сорбентный метод), которые технически могут быть реализованы последовательно, но не синхронно.

Соответственно, важно определить срок выдачи результатов ПЦР-анализа из лаборатории: если допустимым является один раз в 3–5 дней, то процедура выделения может быть проведена оператором последовательно за несколько смен и не потребует увеличения числа приобретаемого оборудования. Выделенная ДНК или кДНК образцов может храниться при температуре от -16 до -20 °С до момента амплификации.

ВНИМАНИЕ! Если лаборатория выбирает режим «накопления» материала для последующей амплификации, то важно, чтобы на длительное хранение при низких температурах отправлялись именно препараты выделенной ДНК/кДНК, а не исходные образцы. Это связано с тем, что размора-

живание приводит к существенному снижению качества образца и, как следствие, снижению чувствительности ПЦР и риску получения ложно-отрицательных результатов. Кроме того, некоторые виды биоматериала в принципе нельзя замораживать, как, например, цельную кровь для генетического тестирования или выявления вирусов. Особенно чувствительными к корректному хранению образцов будут методы, направленные на выделение РНК (в этом случае время от момента взятия крови до получения плазмы не должно превышать шесть часов. Полученную плазму можно хранить при -20°C до трех месяцев, но размораживание допускается однократное).

Когда лаборатория выбирает режим выдачи результатов «в день обращения», то даже при небольших потоках образцов, если технологии выделения НК отличаются, возникает необходимость синхронизировать процессы. В этом случае, во-первых, следует обратить внимание на выбор модели настольной центрифуги для микропробирок с ротором не на 12 лунок, а, например, на 24 лунки, во-вторых, рассмотреть возможность приобретения двух центрифуг, чтобы параллельно можно было проводить два независимых центрифугирования в соответствии с используемыми методами выделения.

Даже если технология выделения едина для партии образцов, но методика ПЦР предусматривает необходимость постановки стандартов/калибраторов, дублей самих образцов + обязательное для ПЦР проведение ОКО через этап выделения, то емкость ротора центрифуги и количество самих центрифуг может оказаться критическим, особенно при выделении РНК.

Для оптимизации процессов выделения НК также можно рассмотреть возможность приобретения дополнительного термостата, поскольку при совмещении нескольких технологий выделения могут потребоваться разные температуры нагрева за единицу времени. Кроме того, ряд методик выделения предусматривает нагрев одной партии образцов от меньшей температуры к большей, что существенно увеличивает время ожидания последовательного изменения температуры в одном термостате. В этом случае оптимальным может быть программирование двух независимых термостатов на заданные температуры (один – на меньшую, другой – на большую), потому что перенос пробирок из одного термостата в другой ощутимо сокращает время ожидания.

В соответствии с МУ 1.3.2569-09.1.3 комплектация Рабочей зоны 3 предусматривает обеспечение двух процессов – приготовление чистых реакционных смесей и амплификацию:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса *или* настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс, УФ-бокс).

2. Программируемые термоциклеры (персональные, многомодульные, с функцией амплификации в режиме реального времени) и автоматизированные станции.
3. Флуориметр (флуоресцентный детектор), только при учете продуктов амплификации гибридационно-флуоресцентным методом детекции по конечной точке.
4. Микроцентрифуга/вортекс.
5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
6. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,5 (0,2) мл.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл, свободные от РНКаз.
8. Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) мл.
9. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С и от –18 °С до –25 °С (для хранения наборов, предназначенных для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот). Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от +2 до +8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от –18 °С до –25 °С.
10. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.
11. С целью автоматизации процедуры приготовления реакционных смесей для амплификации допускается использование автоматизированного оборудования для раскапывания реагентов.

Рабочая зона 4 комплектуется в соответствии со способами детекции результатов амплификации.

Рабочая зона 4-1 для электрофоретического анализа продуктов амплификации и их очистки для секвенирования*:

1. Камера для горизонтального электрофореза.
2. Источник постоянного тока с напряжением 150–460 В.
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.
5. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в «чистой» зоне и предназначенным для анализа результатов электрофореза).
6. Аквадистиллятор.
7. Микроволновая печь или другой нагревательный прибор для плавления агарозы.
8. Колба коническая объемом 250 мл из термостойкого стекла для плавления агарозы.
9. Мерные цилиндры объемом 100 мл и 1000 мл.
10. Столик и набор гребенок для приготовления геля.
11. Штатив для микропробирок на 0,5 мл.
12. Отдельная автоматическая пипетка переменного объема до 100 мкл.
13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл в штативе.

14. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от +2 до +8 °С (для хранения наборов электрофоретической детекции).

15. Емкость с дезинфицирующим раствором для сброса отработанных расходных материалов.

16. Пластиковая емкость объемом 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

* *Дополнительное оборудование и расходные материалы требуются для осуществления очистки продуктов амплификации (секвенирование).*

Для гибридационно-ферментной детекции продуктов амплификации:

1. Термостат планшетный, поддерживающий температуру 37 °С (термошейкер).
2. Вошер (не обязательно).
3. Планшетный спектрофотометр.
4. Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в «чистой» зоне и предназначенным для анализа результатов гибридазации).
5. Восьмиканальная пипетка до 200 мкл.
6. Отдельный набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема.
8. Мерный цилиндр объемом 1 л.
9. Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С (для хранения наборов ГиФА) и не выше –16 °С (для хранения ампликонов).
10. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

Рабочая зона 4-2. Для секвенирования продуктов амплификации перечень оборудования определяется в соответствии с рекомендациями производителей автоматических секвенаторов в инструкциях по их эксплуатации. Аналогично – для гибридазации и анализа продуктов амплификации с помощью ДНК-чипов.

Общим требованием к оснащению ПЦР-лабораторий является то, что оборудование и измерительные приборы должны быть зарегистрированы в установленном порядке и исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации, соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости. *Не реже 1 раза в год измерительные приборы должны подвергаться метрологическому контролю (поверке).*

Ключевым моментом функционирования ПЦР-лаборатории являются дезинфекция и поддержание деконтаминационного режима в соответствии с установленным порядком. По сути данные мероприятия начинаются с проектирования и оснащения лаборатории, поскольку в соответствии с СП 1.3.2322-08 и СП 1.3.3118-13:

- ▶ внутренняя отделка помещений должна быть выполнена в соответствии с их функциональным назначением и гигиеническими нормативами. Поверхность пола, стен,

потолка в лабораторных помещениях должна быть гладкой, без щелей, устойчивой к многократному действию моющих и дезинфицирующих средств;

- ▶ не допускается устройство подвесных потолков, не отвечающих указанным требованиям, и подпольных каналов;
- ▶ выступающие и проходящие трубы (батареи отопления) располагают на расстоянии от стен с целью возможности проведения их дезинфекции, места ввода инженерных коммуникаций должны быть герметичными;
- ▶ отопительные приборы должны иметь гладкую легко очищаемую поверхность;
- ▶ лабораторное оборудование и мебель должны быть гладкими, без острых краев и шероховатостей и иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих средств. Поверхность столов не должна иметь швов и трещин;
- ▶ не допускается использование мебели из древесины и с мягким покрытием;
- ▶ в лабораторных помещениях должна быть предусмотрена защита рабочих столов от попадания прямого солнечного света. Для этих целей могут быть использованы светозащитная пленка, жалюзи из материала, устойчивого к воздействию дезинфицирующих растворов.

Порядок уборки помещений ПЦР-лаборатории включает следующее:

- ▶ ежедневно в конце рабочего дня проводят текущую влажную уборку полов разрешенными к применению дезинфицирующими средствами;
- ▶ рабочие зоны должны подвергаться ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 до начала работы и после окончания влажной уборки. Ультрафиолетовые лампы должны соответствовать следующим параметрам:
 - длина волны – 260 нм (типа ДБ-60);
 - расчетная мощность – 2,5 Вт на 1 м³;
 - продолжительность работы лампы: в течение 45 минут – 1 часа до начала и 45 минут – 1 часа после окончания работы операторов;
- ▶ перед началом работы рабочую поверхность столов (биологических боксов) и оборудования обрабатывают 70%-м этиловым спиртом;
- ▶ еженедельно проводится генеральная уборка с применением дезинфицирующих средств путем протирания поверхностей мебели, приборов, оборудования, а также стен на высоту до 2 м. Допускается использование аэрозольного метода дезинфекции;
- ▶ стеклянные поверхности бактерицидных ламп следует протирать в выключенном положении ветошью, смоченной спиртом, не реже 1 раза в неделю.

ВАЖНО!

Каждая рабочая зона (помещение) лаборатории должна быть обеспечена промаркированным набором уборочного инвентаря, не допускается использование индивидуального уборочного инвентаря для уборки других помещений лаборатории.

Если в лаборатории для поддержания нормируемых параметров микроклимата установлены кондиционеры, то, во-первых, на время работы они должны быть выключены, а, во-вторых, радиаторная решетка и накопитель конденсата должны подвергаться ежемесячной очистке и обработке хлорсодержащими средствами с заменой фильтров.

Не реже чем один раз в год осуществляют обработку автоматических дозаторов. Автоклавируемые дозаторы обеззараживают паром под давлением 1,7 атм при температуре 120 ± 1 °С в течение 20 минут. По окончании обработки дозаторы собирают и проводят калибровку в соответствии с прилагаемой инструкцией по пользованию дозаторами.

С точки зрения выбора оптимальных средств для уборки и дезинфекции в соответствии с «Федеральными клиническими рекомендациями по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях» (2015) к применению в медицинских организациях допускаются только средства, зарегистрированные в установленном порядке и соответствующие требованиям Федерального закона № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

Для дезинфекции поверхностей в помещениях, медицинского оборудования, приборов, мебели, стен, пола, которые загрязнены биологическими жидкостями пациента, выбирают дезинфицирующие средства (ДС), обладающие бактерицидной (включая туберкулоцидную), вирулицидной и фунгицидной активностью в отношении грибов рода *Candida*.

В помещениях, где поверхности могут быть загрязнены кровью, для проведения различных видов уборок и дезинфекции применяют средства по режимам, эффективным в отношении вирусов.

При выборе ДС, используемых для механизированной мойки и дезинфекции, предпочтение следует отдавать малопеняющимся средствам. Пена может значительно снизить эффективность механизированной обработки.

Для дезинфекции выделений человека (фекалии, моча, мокрота, рвотные массы, кровь), остатков пищи, смывных вод, посуды из-под выделений, контейнеров для сбора медицинских отходов целесообразно использовать ДС, содержащие в качестве действующего вещества (ДВ) *неорганические соединения хлора*. Для обеззараживания больших объемов крови не следует использовать ДС на основе перекиси водорода ввиду интенсивного пенообразования при взаимодействии средства с кровью.

Для дезинфекции медицинских изделий применяют ДС, обладающие широким спектром антимикробной активности (вирулицидной, бактерицидной, фунгицидной – в отношении грибов рода *Candida*). Выбор режимов дезинфекции в медицинских организациях фтизиатрического профиля проводят из тех ДС, которые эффективны в отношении микобактерий туберкулеза. Об этом имеется информация в инструкции по применению данного средства, в которой говорится, что оно протестировано на *Mycobacterium terrae*. В микологических стационарах (кабинетах) выбирают режимы, эффективные в отношении грибов рода *Trichophyton*.

Для обеззараживания текстильных изделий следует выбирать средства на основе *кислородактивных соединений*. Перекись водорода в концентрациях выше 3 % влияет на прочность тканей. Наиболее предпочтительными являются средства для дезинфекции, совмещенной со стиркой текстильных изделий.

Для дезинфекции систем кондиционирования должны использоваться средства, обладающие бактерицидной (в том числе в отношении легионелл), вирулицидной и фунгицидной активностью.

Для гигиенической обработки рук выбирают кожные антисептики на основе спирта (смеси спиртов) или кожные антисептики композиционного состава на водной основе. Наряду с кожными антисептиками в виде готовых к применению средств применяют антисептики в виде геля, дезинфицирующих салфеток.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» подавляющее большинство отходов ПЦР-лаборатории относится к классу Б (инфицированные и потенциально инфицированные отходы, в том числе материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями), исключением могут быть ПЦР-лаборатории, работающие с микроорганизмами I группы патогенности.

Важно, что материал для исследования, который поступил в Рабочую зону 1, подвергается там первичной обработке и *обеззараживанию* путем лизиса, поэтому дальнейшие процедуры ПЦР-анализа условно безопасны для оператора.

В целом выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

В случае отсутствия в организации участка по обеззараживанию/обезвреживанию отходов класса Б или централизованной системы обезвреживания медицинских отходов, принятой на административной территории, отходы класса Б обеззараживаются персоналом данной организации в местах их образования химическими/физическими методами.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку.

Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов:

- ▶ для сбора острых отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости (контейнеры). Емкость должна иметь плотно прилегающую крышку, исключающую возможность самопроизвольного вскрытия;
- ▶ для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости с крышкой (контейнеры), обеспечивающей их герметизацию и исключающей возможность самопроизвольного вскрытия.

Дезинфекция многоцветных емкостей для сбора отходов класса Б внутри организации производится ежедневно.

Медицинские отходы класса Б в закрытых одноразовых емкостях (пакетах) помещают в контейнеры и затем перемещают в них на участок по обращению с отходами или помещение для временного хранения медицинских отходов до последующего вывоза транспортом специализированных организаций к месту обеззараживания или обезвреживания.

При организации участков обеззараживания/обезвреживания медицинских отходов с использованием аппаратных методов разрешается сбор, временное хранение, транспортирование медицинских отходов класса Б без предварительного обеззараживания в местах образования при условии обеспечения необходимых требований эпидемиологической безопасности.

Эти общие требования к классу Б уточняются в МУ 1.3.2569-09.1.3 с учетом специфики ПЦР-лабораторий, в частности:

- ▶ дезинфицирующие растворы после обработки ими исследуемого материала и истечения времени их экспозиции сливают в канализацию, открытую емкость с обработанным материалом помещают в плотный термостойкий пакет (контейнер) для последующего автоклавирования под давлением $2,0 \text{ кгс/см}^2$ ($0,2 \text{ МПа}$) при температуре $132 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 60 минут;
- ▶ использованные пробирки с ампликонами* (исключая пробирки с ампликонами, передаваемые для анализа в Рабочие зоны 4-1 и 4-2), наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в боксе биологической защиты или ПЦР-боксе собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в Рабочую зону 4-1 с целью последующей инактивации. При ее отсутствии отходы переносят в специально предназначенное вспомогательное помещение, где проводят их инактивацию;
- ▶ в Рабочих зонах 4-1 и 4-2 или при их отсутствии во вспомогательном помещении использованные наконечники, пробирки с ампликонами (не открывать), перчатки, ветошь после окончания работы помещают в плотный термостойкий пакет (контейнер) для последующего автоклавирования*;
- ▶ после автоклавирования пакет с инактивированным материалом выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов или на сжигание в специальных печах;
- ▶ рабочую одежду сотрудников лаборатории маркируют индивидуально и в соответствии с зональным распределением ее смену проводят не реже одного раза в неделю. В зоне детекции результатов желателно использовать одноразовую рабочую одежду;
- ▶ стирку рабочей одежды сотрудников проводят в прачечной организации. Не допускается одновременно производить стирку рабочей одежды разных рабочих зон. Обработку рабочей одежды сотрудников, осуществляющих учет результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот, проводят отдельно от одежды из других зон.

***ВНИМАНИЕ!** *Автоклавирование пробирок с ампликонами категорически не рекомендуется проводить на территории медицинского учреждения, где находится ПЦР-лаборатория: чрезвычайно высок риск контаминации ампликонами при перемещении персонала и вспомогательного оборудования для вывоза отходов. Рекомендуется отдавать амплификационные пробирки во внешние организации, специализирующиеся на утилизации отходов класса Б.*

С точки зрения снижения риска распространения ампликонов на этапе утилизации отходов ПЦР-лаборатории при отсутствии возможности привлечения внешних организаций рекомендуется использовать не автоклавы, а СВЧ-установки, например зарегистрированную на территории РФ для обеззараживания медицинских отходов класса Б (опасных) и класса В (чрезвычайно опасных) установку УОМО-01/150 производства Обнинского «Научно-производственного предприятия ОМИТЕКС».

5. КОНТАМИНАЦИЯ И ДЕКОНТАМИНАЦИОННЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ

Контаминация (лат. *contaminatio*; смешение) – попадание в определенную среду какой-либо примеси, изменяющей изучаемые или используемые свойства этой среды.

Применительно к ПЦР контаминация может быть двух основных видов:

- ▶ *Контаминация ампликонами.* Возникает тогда, когда продукты ПЦР попадают в окружающую среду. Это может происходить по нескольким причинам: вследствие неправильной организации ПЦР-лаборатории и порядка работы в ней; из-за ошибок при постановке полимеразной цепной реакции или детекции результатов ПЦР (человеческий фактор); по причине большого потока исследований. Контаминация может проявляться в ложноположительных результатах ПЦР или возникновении неспецифических продуктов ПЦР.
- ▶ *Перекрестная контаминация* от одной пробы к другой может возникать при обработке образцов или в процессе приготовления реакционной смеси. Следствие перекрестной контаминации – спорадические ложноположительные результаты.

При несоблюдении мер безопасности с течением времени в лаборатории могут накапливаться ампликоны, что приводит к появлению *тотальной контаминации*, когда ампликонами «заражена» лабораторная посуда, автоматические пипетки и лабораторное оборудование, поверхность лабораторных столов, одежда или даже поверхность кожи сотрудников лаборатории (часто бывает при автоклавировании амплификационных пробирок), что приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Основные правила предотвращения контаминации в лаборатории ПЦР:

- ▶ разделение функциональных рабочих зон;
- ▶ соблюдение точности и направления движения анализируемых образцов;
- ▶ отдельные лабораторные халаты в каждой рабочей зоне;
- ▶ одноразовые перчатки *без талька*;
- ▶ наконечники для дозаторов *с фильтрами*, защищающими от аэрозоля;
- ▶ одноразовые пластиковые пробирки, посуда, наконечники;
- ▶ химическая и УФ-дезинфекция всех поверхностей рабочих зон.

Кроме того, активно внедряется в практику ПЦР-лабораторий еще одно направление по предупреждению контаминации: введение в состав реакционной смеси для ПЦР фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ), который катализирует высвобождение урацила из урацил-содержащей одно- или двухцепочечной ДНК, но не действует на dUTP. Образующийся при этом абазический сайт блокирует работу ДНК-полимераз и весьма подвержен гидролитическому расщеплению при повышенной температуре и высоких значениях pH. Сам фермент также чувствителен к нагреванию и может быть инактивирован при температуре выше 70 °С.

Борьба с контаминацией РС продуктами предыдущих амплификаций состоит из трех этапов:

1. Частичная или полная замена в реакционных ПЦР-смесях dTTP на dUTP, которая приводит к тому, что все получающиеся ампликоны содержат урациловые основания.

2. Введение в реакционную смесь УДГ и добавление к протоколу этапа предобработки, например, 5 минут при 50 °С.

3. Введение в протокол амплификации этапа температурной инактивации фермента, в результате которой происходит также гидролитическое разрушение ампликонов с выщепленным урацилом, например, 3 минуты при 95 °С.

В результате внесения перечисленных этапов в протокол эксперимента все ампликоны с урацилом, попавшие в реакционную смесь из предыдущих амплификаций, перестают быть матрицами для ДНК-полимераз.

Другим способом инактивации ампликонов служит фотохимическое воздействие на молекулы ДНК. Для этого используют псорален или изопсорален, который активируется кратковременным облучением ультрафиолетовым светом. Модифицированные этими соединениями молекулы ДНК не могут участвовать в реакции амплификации.

Однако, как известно, ни одна биологическая или химическая реакция не идет со 100%-й эффективностью. Кроме того, всегда остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе выделения НК.

В соответствии с Информационным письмом № 03/724 от 10.12.2013 ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора в случае возникновения контаминации лаборатории проводят следующие мероприятия:

- ▶ утилизацию всех находящихся в контаминированной зоне реактивов;
- ▶ утилизацию исследуемых материалов на всех промежуточных стадиях обработки (кроме исходной);
- ▶ генеральную уборку, химическую и ультрафиолетовую дезинфекцию всех поверхностей лабораторных помещений;
- ▶ дезинфекцию мебели, рабочих поверхностей, а также поверхностей корпусов приборов и оборудования химическим методом и ультрафиолетовым излучением.

С точки зрения ультрафиолетовой дезинфекции помещения в условиях контаминации рекомендуется использование импульсной плазменно-оптической технологии, основанной на облучении объектов (воздуха, открытых поверхностей) высокоинтенсивными потоками ультрафиолетового излучения сплошного спектра, что приводит к фрагментации ДНК-ампликонов.

На сегодняшний день широкое применение получили импульсные ксеноновые установки серии «Альфа» НПП «Мелитта», Россия (передвижные, переносные и стационарные), использование которых рекомендовано Федеральными клиническими рекомендациями «Применение импульсных ультрафиолетовых установок в эпидемиологическом обеспечении медицинских организаций» (НАСКИ, 2015 г.). Установки имеют регистрационные удостоверения и могут быть использованы в медицинских

учреждениях, режим работы в зависимости от модели определен в Методических рекомендациях МР 3.5.1.0100-15 «Применение установок импульсного ультрафиолетового излучения сплошного спектра в медицинских организациях» (2015 г.).

Для химической обработки контаминированной лаборатории рекомендуются растворы с ферментативной активностью против ДНК, РНК и РНКазы, что значительно более безопасно с точки зрения работы персонала и коррозии приборов по сравнению с ранее используемыми растворами хлорсодержащих препаратов. Доступными для использования реагентами являются спреи и растворы производства AppliChem GmbH (серия ExitusPlus), Thermo Scientific (серия AWAY) и Invitrogen (серия Alert).

Порядок проведения деконтаминационных мероприятий описан в МУ 1.3.2569-09.1.3. Контроль качества деконтаминации осуществляется посредством смывов с рабочих поверхностей и оборудования.

ВАЖНО!

Смывы исследуют на наличие нуклеиновых кислот и (или) ампликонов возбудителей инфекционных заболеваний, диагностика которых наиболее часто осуществляется в данной лаборатории. Такая схема может быть использована не только в порядке проведения деконтаминации, но и в рутинном режиме контроля чистоты и качества работы лаборатории.

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Контроль качества лабораторных исследований проводится в соответствии с нормативными документами оценки аналитического качества: Приказ МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ», ГОСТ Р ИСО 15189-2015, ГОСТ Р 53022.2-2008, ГОСТ Р 53022.3-2008, ГОСТ Р 53079.4-2008, ГОСТ Р 53133.2-2008, ОСТ 91500.13.0001-2003.

Согласно Приказу МЗ РФ № 45 обеспечение качества клинических лабораторных исследований на уровне клиничко-диагностической лаборатории состоит в разработке и осуществлении мер, предупреждающих отрицательное влияние факторов *преаналитического* (нарушение правил маркировки, хранения, первичной обработки), *аналитического* (нарушение правил проведения аналитической процедуры, ошибок калибровки метода и настройки измерительного прибора, приобретение и использование реагентов и других расходных материалов, не допущенных к использованию) и *постаналитического* (оценка правдоподобия и достоверности полученных результатов исследований, их предварительная интерпретация) этапов, способных помешать получению достоверного результата лабораторного исследования. Разработка и осуществление мер обеспечения качества клинических лабораторных исследований на уровне клиничко-диагностической лаборатории и их отражение в «Руководстве по качеству клинических лабораторных исследований» данной лаборатории является обязанностью заведующего лабораторией.

Лаборатории, использующие в своей работе метод ПЦР, должны осуществлять следующие виды контроля:

- ▶ внутрилабораторный;
- ▶ внешний контроль работы лаборатории.

6.1. Внутрилабораторный контроль качества

В соответствии с Приказом МЗ РФ № 45 внутрилабораторный контроль качества (ВКК) состоит в постоянном (повседневном, в каждой аналитической серии) проведении контрольных мероприятий: исследовании проб контрольных материалов или применении мер контроля с использованием проб пациентов.

Целью ВКК является оценка соответствия результатов исследований установленным критериям их приемлемости при максимальной вероятности обнаружения недопустимой погрешности и минимальной вероятности ложного отбрасывания результатов выполненных лабораторией аналитических серий.

ВКК обязателен в отношении всех видов исследований, выполняемых в лаборатории. Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества должен быть отражен в «Руководстве по качеству клинических лабораторных исследований» данной лаборатории. Организация внутрилабораторного контроля качества исследований

в соответствии с нормативными документами Минздрава России является обязанностью заведующего лабораторией и уполномоченных им сотрудников лаборатории. *Наличие системы внутрилабораторного контроля качества является одним из основных для аккредитации и лицензирования лабораторий.*

Периодичность ВКК зависит от объема выполняемой работы, но осуществляется *не реже одного раза в квартал* (по МУ 1.3.2569-09.1.3). В процессе ВКК могут использоваться аттестованные на наличие аналита (его количества) панели производителей коммерческих наборов или внутрилабораторные аттестованные образцы, содержащие и не содержащие нуклеиновые кислоты конкретных возбудителей в различной концентрации, стабильные в условиях хранения (в том числе ВК, ОКО, ПКО, специальные контроли).

6.2. Внешний контроль качества

Внешняя оценка качества – контроль сравнимости результатов, которые получены в нескольких лабораториях на одном и том же контрольном материале одними и теми же методами или методами, дающими статистически достоверно совпадающие результаты.

Важность участия ПЦР-лабораторий в системах внешней оценки качества отражена в ISO 15189:2012, где установлены требования к деятельности клинико-диагностических лабораторий, а также в аналогичном отечественном стандарте ГОСТ Р ИСО 15189-2015, Приказах МЗ РФ и других ГОСТах (ГОСТ Р 53022.1-2008, ГОСТ Р 53079.2-2008).

В большинстве российских ПЦР-лабораторий внешняя оценка качества выполняемых исследований осуществляется системой межлабораторных сличительных испытаний «ФСВОК» (МСИ «ФСВОК»).

Межлабораторные сличительные испытания (МСИ) – термин, введенный Федеральным законом от 28.12.2013 № 412-ФЗ «Об аккредитации в национальной системе аккредитации», – оценка качества сопоставлением результатов разных (в т. ч. референтных) лабораторий.

В перечень объектов МСИ «ФСВОК» включены:

- ПЦР-выявление *M. genitalium*,
- ПЦР-выявление *N. gonorrhoeae* и *C. trachomatis*,
- ПЦР-выявление ДНК ВГВ,
- ПЦР-выявление ДНК ВПЧ,
- ПЦР-выявление ИППП,
- ПЦР-выявление РНК ВГС,
- ПЦР-выявление РНК ВИЧ,
- ПЦР-определение концентрации ДНК ВГВ,
- ПЦР-определение концентрации РНК ВГС,
- ПЦР-определение концентрации РНК ВИЧ.

В соответствии с действующими нормативными актами лаборатория в установленном порядке должна принимать участие в мероприятиях (программах) по внешней оценке качества лабораторных исследований по конкретным нозологическим формам *не реже 1 раза в год.*

7. ОШИБКИ ПЦР

Выделяют три основные 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.

7.1. Ошибки преаналитического этапа

В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 *преаналитический этап* включает условия и процедуры взятия образца, его первичной обработки и транспортирования в лабораторию. Соблюдение правил преаналитики должно исключить или ограничить влияния внелабораторных факторов на результаты лабораторных исследований, поэтому ГОСТ регламентирует:

- ▶ условия периода, предшествующего взятию у пациента образца биологического материала;
- ▶ условия и процедуры взятия образца биологического материала у пациента;
- ▶ процедуры первичной обработки образца биологического материала;
- ▶ условия хранения и транспортирования образцов биоматериалов в клинико-диагностические лаборатории.

Несмотря на наличие общих рекомендаций по корректному проведению преаналитического этапа, метод ПЦР имеет ряд особенностей, которые наиболее часто проявляются в типичных ошибках преаналитики.

7.1.1. Место взятия биологического материала

Методы лабораторной диагностики подразделяют на две основные группы:

- ▶ *прямые методы* направлены на непосредственное выявление возбудителя в образце (*бактериоскопический, вирусологический* или *бактериологический* метод), его антигенов (*иммунофлуоресцентный* метод) или генетического материала (ПЦР);
- ▶ *непрямые (серологические) методы* направлены на выявление антител (ответ организма на возбудителя) в биологическом материале (чаще всего – ИФА).

Для прямых методов диагностики инфекционных заболеваний важной особенностью является необходимость **строгого соответствия места взятия биоматериала локализации процесса**. В первую очередь это касается тех микроорганизмов, для которых известна тропность ко многим видам тканей, например

M. tuberculosis (обуславливает 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, восходящий инфекционный процесс – поражения слизистой оболочки матки, труб, яичников, околоматочных связок). Поэтому 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 или не доказан, поэтому 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.

7.1.2. Качество взятия и обработки 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 и должен 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* и вируса папилломы человека (ВПЧ)). При исследовании на наличие вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) и цитомегаловируса (ЦМВ) целесообразно использовать лейкоцитарную массу крови. При этом концентрация искомых микроорганизмов в пробе будет зависеть от стадии заболевания (ремиссия или обострение).

Современные наборы реагентов для ПЦР-анализа позволяют контролировать количество эпителиальных клеток, взятых для анализа, путем введения контроля взятия материала (КВМ) в РС для амплификации. Также могут быть использованы специальные транспортные среды, которые имеют химический индикатор pH, информирующий о попадании достаточного количества биоматериала в пробирку для образца.

Кроме того, на результаты исследования могут повлиять «привнесенные» микроорганизмы – транзитная флора от полового партнера на фоне незащищенного полового контакта либо микроорганизмы, поступающие в организм при приеме пробиотических или симбиотических препаратов. Данный фактор особенно важно учитывать

при проведении количественного ПЦР-анализа для образцов, взятых из УГТ (влияет половой контакт и/или пробиотики) или ЖКТ (влияет прием пробиотиков).

Не менее важно минимизировать количество нежелательных примесей в пробе, например слизи, гноя и крови (применительно к эпителиальному соскобу), для чего их избыток необходимо удалить стерильным ватным тампоном непосредственно перед взятием образца. Аналогичное требование предъявляется и к химическим примесям, которые могут попасть в биоматериал, если накануне его взятия были проведены некоторые манипуляции.

Например, наличие гепарина в крови у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, может привести к получению недостоверных результатов в ПЦР, поэтому забор крови у таких пациентов рекомендовано проводить до очередного введения препарата.

В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 взятие материала для выполнения лабораторного теста должно быть проведено до осуществления лечебного или диагностического мероприятия или отложено на тот или иной период времени, зависящий от длительности последствий лечебной или диагностической меры.

Лекарственные средства, способные повлиять на результаты назначенного теста *in vitro*, должны быть отменены за 2–3 дня до проведения теста, если это возможно по состоянию пациента. Если отмена лекарств нежелательна, следует их возможное влияние учитывать при интерпретации результатов исследования. В бланке назначения должны быть указаны принимаемые пациентом лекарства, если они могут влиять на лабораторные результаты.

При необходимости лабораторного исследования на фоне лекарственной терапии взятие образца крови должно быть произведено до приема очередной дозы лекарства.

Применительно к образцам из УГТ важно учесть следующие правила взятия биоматериала (табл. 3).

Таблица 3. Условия корректного взятия биоматериала из УГТ

| Противопоказания | Как правильно |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Применение препаратов – ингибиторов ПЦР (ультразвуковой контактный гель, гепарин, хлоргексидин и другие хлорсодержащие препараты) | Не ранее чем через 24 часа после применения препарата |
| Кольпоскопия | Не ранее чем через 24–48 часов после кольпоскопии |
| Трансвагинальное УЗИ | Не ранее чем через 24 часа после трансвагинального УЗИ |
| Проведение пациенткой спринцевания | Не проводить туалет половых органов и спринцевание влагалища в день обследования |
| Использование пациенткой тампонов | Не использовать в день обследования |

| Противопоказания | Как правильно |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Пациенты после незащищенного полового контакта | Не вступать в <i>незащищенный</i> половой контакт за 48–72 часа до обследования |
| Пациенты после защищенного полового контакта | Воздержаться от <i>защищенного</i> полового контакта накануне обследования |
| Применение антибактериальных препаратов | Не ранее чем через 2 недели после применения антибактериальных препаратов |
| Применение пробиотиков и зубиотиков | Не ранее чем через 2 недели после применения препаратов, содержащих микроорганизмы |

При необходимости можно использовать в качестве материала для исследования мочу (клеточный осадок первой порции утренней мочи). Пробу важно тщательно промыть физиологическим раствором, так как осадок содержит большое количество солей и мочевины, которые денатурируют зонды и приводят к ложноположительным результатам при использовании технологий флуоресцентной детекции.

7.1.3. Хранение биологического материала

Принципиальным для получения адекватных результатов ПЦР является **хранение биологического материала**.

В настоящее время процессы взятия материала, его предварительная обработка, хранение и перевозка, передача исследуемого материала в другие организации осуществляются согласно 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.

7.2. Ошибки аналитического этапа

7.2.1. 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;
- ▶ сорбентные методы;
- ▶ методы на основе преципитации.

Выбор метода выделения должен определяться характером биоматериала, степенью его загрязнения потенциальными ингибиторами 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 РНК-содержащих (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.

В совокупности данные факторы могут привести к большим потерям материала на этапе пробоподготовки, поскольку и сорбентный метод, и преципитация сопровождаются неоднократными отмытками. Повышение эффективности выделения и получение адекватных результатов ПЦР возможно при использовании гемолитика для предварительной обработки цельной крови и увеличения выхода осадка лейкоцитов.

7.2.2. Генетическая изменчивость микроорганизмов

Вероятность получения ложноотрицательного результата может быть обусловлена **изменчивостью микроорганизмов**. При конструировании тест-системы в качестве мишени используется высококонсервативный 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, до 2008 г. у 30 % пациентов с установленным диагнозом «хламидиоз», вызванным *C. trachomatis*, при проведении исследований методом ПЦР результат анализа был отрицательным при полном соблюдении технологии. Это обусловлено тем, что некоторые коммерческие тест-системы в качестве мишени использовали плазмиду патогена, тогда как патологический процесс был связан с бесплазмидными штаммами бактерий.

7.2.3. Технические 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 ПКО 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 увеличиваться 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 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 **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.

7.3. Ошибки постаналитического этапа

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

7.3.1. Ошибки интерпретации результатов

Одной из наиболее распространенных ошибок при интерпретации результатов ПЦР-анализа является **непринятие во внимание особенностей персистенции и элиминации возбудителя**, например, назначение контрольного исследования через одну неделю после окончания курса антибиотикотерапии. В подавляющем большинстве случаев результат анализа на предмет наличия 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 21 день – 1 месяц после курса антибиотикотерапии. Этот срок необходим для смены эпителиального слоя.

С другой стороны, если целью анализа является оценка состояния микрофлоры урогенитального или желудочно-кишечного тракта, 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 недель – 1 месяца, тогда проведение ПЦР-анализа будет информативным и позволит оценить динамику состояния и 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 развиваться 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 для идентификации типов 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 значение, если на фоне ВПЧ-инфекции наблюдается неоплазия эпителия шейки матки, что позволяет прогнозировать степень канцерогенного риска.

Еще одной ошибкой является **неверная интерпретация результатов количественного ПЦР-анализа**.

Например, в соответствии с Клиническими рекомендациями Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В (2014 г.), показания для проведения противовирусной терапии ВГВ – наличие ДНК возбудителя в количестве 2000 МЕ/мл при повышенных значениях АлАт и индексе гистологической активности или фиброза > 1 балла по шкале METAVIR. Прекращение терапии аналогами нуклеозидов/нуклеотидов возможно в тех случаях, когда достигается устойчивый вирусологический ответ (УВО): аналогично ответу на ИФН его можно определить как снижение уровня ДНК ВГВ ниже 2000 МЕ/мл, что сохраняется не менее 12 месяцев после прекращения лечения.

Важно отметить, что стандартизация количественных методов определения ДНК вирусных гепатитов в сыворотке крови привела к появлению Международных единиц (МЕ). И в этом случае возник нюанс: **соотношение между ранее использовавшимися единицами (копиями) и МЕ в тест-системах разных производителей может быть различным** – от 1,5 до 8 (при отсутствии данных о коэффициенте принято использовать усредненное значение 5, т. е. 1 МЕ = 5 копий). Большинство современных тестов для количественного определения ДНК ВГВ основано на ПЦР в реальном времени и имеет широкий линейный диапазон измерений – от 5–200 МЕ/мл до 10^8 – 10^9 МЕ/мл.

То есть разница результатов в МЕ при исходно одинаковых показателях копий/мл при использовании разных тест-систем может отличаться в 8 раз! И один и тот же пациент при оценке вирусной нагрузки за единицу времени в равной степени может быть отнесен к категории, например, не достигшей УВО, и к категории с успешным достижением УВО!

В связи с отсутствием единого стандарта определения МЕ при определении и мониторинге вирусной нагрузки на фоне противовирусной терапии *рекомендуется проводить анализ в одной и той же лаборатории*.

Проведение количественных исследований методом ПЦР для ряда бактериальных и вирусных инфекций на данный момент не регламентировано, 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*, *Mycoplasma*, *Gardnerella*) при отсутствии клинических проявлений воспаления, жалоб пациента может привести к гипердиагностике и необоснованному назначению антибактериальной терапии. Как следствие, стремительный рост антибиотикорезистентности, увеличение числа случаев рецидивирующего бактериального вагиноза и дисбиоза.

Так, на Междисциплинарном российском консенсусе по генитальным микоплазмам в 2006 г. был сформирован документ, принятый на совместном совещании

дерматовенерологов, акушеров-гинекологов, урологов, клинических микробиологов, организаторов здравоохранения Российской Федерации, согласно которому: «*Ureaplasma spp.* и *M. hominis* присутствуют на слизистых оболочках и в выделениях урогенитального тракта у 40–80 % практически здоровых людей репродуктивного возраста в количестве менее 10^4 КОЕ/мл. Лечение следует назначать при наличии клинических проявлений воспалительного процесса и в случае, если *U. urealyticum* и *M. hominis* выявляются в количестве более 10^4 КОЕ/мл».

На данный момент убедительных доказательств клинической значимости результатов количественного определения *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* не существует. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что данный тип анализа выявляет только количество микроорганизмов в пробе, но не отражает реального количества их в половых органах и вследствие этого не может быть стандартизован.

В связи с этим в «Федеральных клинических рекомендациях. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем» (РОДВК, 2016 г) указано, что при выявлении *M. hominis* и/или *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 КОЕ/мл (или ГЭ/г) и при отсутствии клинических и/или лабораторных признаков воспалительного процесса мочеполовой системы лечение не проводится.

Кроме того, при исследовании урогенитального тракта у женщин важно проводить сравнение количества представителей условно-патогенных микроорганизмов с количеством бактерий рода *Lactobacillus* – ведущих представителей нормофлоры. Это позволяет выявить этиологическую значимость тех или иных микроорганизмов в развитии дисбиоза, степень его выраженности и дает возможность определить объем терапевтического вмешательства и назначить этиотропную терапию.

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).

7.3.2. Сравнение результатов 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.

Положительный результат в ПЦР и отрицательный результат в ИФА может быть обусловлен **наличием «серологического окна»**, что наиболее актуально для выявления вирусов гепатитов и иммунодефицита человека. В условиях постоянно повышающихся концентраций антигена в результате репродукции ви-

руса происходит активное снижение концентрации антител за счет 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: у 90–95 % зараженных они обнаруживаются в течение трех месяцев после заражения, у 5–9 % – через шесть 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 патоген 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.

В соответствии с Рекомендациями МЗ РФ по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С (2014) особую диагностическую ценность для установления диагноза «острый гепатит С» (ОГС) имеет обнаружение анти-ВГС в динамике болезни (через 4–6 недель) при отрицательном результате исследования этого маркера в ранние сроки болезни, а также исключение гепатита иной природы. Наличие РНК ВГС в фазе «серологического окна» (в период отсутствия анти-ВГС) – важный критерий диагноза среди комплекса диагностических признаков ОГС. Если у пациента в сыворотке крови определяется РНК ВГС на протяжении более 6 месяцев, то можно говорить о хроническом гепатите С.

В том случае, если у пациента зарегистрирован положительный тест на анти-ВГС, но РНК ВГС обнаружить не удается, оснований для диагноза ХГС недостаточно. Кроме того, нужно помнить о необходимости дифференциального диагноза ХГС с ОГС, который в 80 % случаев протекает в безжелтушной форме. РНК ВГС может определяться в крови уже через 2 недели от момента заражения, еще до появления анти-ВГС; последние могут не отмечаться в течение первых 8–12 недель.

Кроме того, отсутствие положительных результатов ИФА на фоне положительного результата в ПЦР может наблюдаться у иммуносупрессивных 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 варьируются 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 при обследовании наличием антигена HLA-B27.

Еще один вариант несовпадения результатов ПЦР и ИФА (отрицательный результат в ПЦР и положительный результат в ИФА) может быть обусловлен **выявлением «иммунологического следа»** – остаточного уровня 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 (*C. pneumonia*, *C. pecorum*, *C. psittaci*), определяет получение положительного результата. При этом направление на анализ методом ПЦР с указанием только наиболее распространенного этиологического агента хламидийной пневмонии – *C. pneumonia* 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. psittaci*.

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 (воспалении 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 avidность антител.

Авидность – это прочность связи между антителом и антигеном, которая отражает сроки заражения и длительность инфекционного процесса. Определение индекса avidности (ИА) ниже 30–35 % указывает на свежую первичную инфекцию, показатель avidности, равный или превышающий 40 %, указывает на то, что в сыворотке содержатся анамнестические высокоavidные 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.

7.3.3. 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 используют микроскопическое исследование 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 необходимо отметить, что в использовании микроскопии для диагностики инфекционных заболеваний есть недостатки:

- ▶ низкая чувствительность;
- ▶ субъективность оценки результатов;
- ▶ ограниченность спектра выявляемых микроорганизмов;
- ▶ приближительность количественной оценки.

Так, при диагностике трихомоноза по данным российских и зарубежных клинических рекомендаций по диагностике и лечению ЗППП 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. gonorrhoeae* и *C. trachomatis*, свидетельствует, что в первом случае (в микроскопии) частота выявляемости патогена у мужчин – 80–95 %, у женщин – 30–50 %, а во втором – 10–12 %. При этом использование метода ПЦР дает возможность определять указанные микроорганизмы с чувствительностью более 95 %.

Микроскопия микроорганизмов в нативном состоянии (в основном 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 лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Возникают спонтанно или индуцированно – 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 орга-

нов 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 коринебактерия, довольно часто встречающаяся у здоровых женщин. При этом *A. vaginae* – один из основных факторов развития рецидивирующего бактериального вагиноза и его осложнений, поэтому его однозначная идентификация крайне важна при назначении терапии, особенно с точки зрения выбора препарата между «Метронидазолом» и линкозамидами.

Кроме того, при микроскопии мазков можно выявить микроорганизмы, присутствующие в биоматериале в количестве, обычно превышающем 10^5 КОЕ/мл, тогда как многие факультативно-анаэробные и аэробные бактерии могут проявлять патогенный эффект при сравнительно небольшом их количестве (до 10^4 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 дифференцирования процесса (аэробный/анаэробный дисбиоз, дисбиоз смешанного генеза) и определения наиболее эффективных в каждом отдельном случае терапевтических или коррекционных мероприятий.

7.3.4. Сравнение результатов ПЦР и культурального метода

Культуральный метод наряду с микроскопией микроорганизмов входит в золотой стандарт диагностики. При использовании этого метода появляется:

- ▶ возможность обнаруживать все живые микроорганизмы, которые могут вырасти;
- ▶ возможность определять антибиотикоустойчивость.

Но в применении культурального метода существуют не менее объективные ограничения:

- ▶ длительные сроки культивирования – от пяти дней до двух 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 минут. 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 %, *C. 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 возоб-

новляют 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 зубионтами человека, животных или растений. Среди бактерий есть возбудители таких инфекций, как чума, холера, туляремия, 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, полученных различными лабораторными методами исследования и в ходе ПЦР, – достаточно распространенная ситуация, которая обусловлена 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 %.

Потенциально высокая чувствительность полимеразной цепной реакции делает совершенно необходимым особенно тщательное устройство ПЦР-лаборатории. Это связано с наиболее острой проблемой метода – контаминацией.

Таким образом, технология ПЦР предъявляет высокие требования к соблюдению правил преаналитического, аналитического и постаналитического этапов, которым необходимо следовать с целью получения корректных результатов исследования и клинической интерпретации данных.

8. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

На данный момент метод ПЦР широко используется в следующих отраслях:

1) медицина, система санитарно-эпидемиологического контроля:

- диагностика инфекций;
- диагностика иммунных патологий;
- генетические исследования наследственных заболеваний;
- определение ГМИ пищевых продуктов;

2) ветеринария и растениеводство:

- инфекционные заболевания;
- определение видовой принадлежности;

3) наука:

- генная инженерия, микробиология, генетика и др.;

4) промышленность:

- определение биологического загрязнения (санитарный контроль);

5) судебная медицина:

- идентификация личности.

8.1. Нормативная база по применению ПЦР-технологий

На сегодняшний день нормативно-методическая база по применению ПЦР в клинико-диагностической практике определена в стандартах оказания медицинской помощи, клинических рекомендациях, методических указаниях и др.

8.1.1. Нормативная база по ПЦР для диагностики ЗППП

В соответствии с российскими и зарубежными нормативно-методическими документами высокие чувствительность и специфичность ПЦР позволяют рекомендовать данный метод для диагностики ИППП и урогенитальных инфекций:

- ▶ Приказ МЗ РФ от 1 ноября 2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)"»;
- ▶ Приказ МЗ РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. РОДВК, 2016;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных бактериальным вагинозом. РОДВК и РОАГ, 2015;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, сопро-

вождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин. РОАГ, 2019;

- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных урогенитальным кандидозом. РОДВК и РОАГ, 2015;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных хламидийной инфекции. РОДВК и РОАГ, 2015;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных урогенитальными заболеваниями, вызванными *Mycoplasma genitalium*. РОДВК и РОАГ, 2015;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных урогенитальными заболеваниями, вызванными *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*. РОДВК и РОАГ, 2015;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных гонококковой инфекции. РОДВК, 2015;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по ведению больных урогенитальным трихомониазом. РОДВК, 2016;
- ▶ Урология. Российские клинические рекомендации. РОУ, 2017.

На данный момент молекулярно-биологические методы выявления возбудителей инфекций урогенитального тракта включены в перечень лабораторных методов диагностики в действующих стандартах оказания медицинской помощи (табл. 4).

Таблица 4. Молекулярно-биологические методы выявления возбудителей инфекций урогенитального тракта в стандартах оказания медицинской помощи

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1557н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при воспалении вульвы и влагалища» | Отделяемое женских половых органов | A26.20.020 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1380н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при хронической бактериальной инфекции» | Кровь (<i>Chlamydia spp.</i>) | A26.05.012 |
| | | Отделяемое конъюнктивы (<i>Chlamydia trachomatis</i>) | A26.26.007 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1512н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)» | Кровь (<i>Chlamydia spp.</i>) | A26.05.012 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 866н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при анкилозирующем спондилите, псориатическом артрите, других спондилоартритах» | Отделяемое из уретры | A26.21.007 |
| | | Отделяемое конъюнктивы | A26.26.007 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1751н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неуточненном уретральном синдроме» | Отделяемое из уретры | A26.21.007 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1684н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при фимозе, баланопостите, баланите, язве и лейкоплакии полового члена и других воспалительных заболеваниях полового члена» | Отделяемое из уретры | A26.21.007 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1675н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неспецифическом и другом уретрите» | Отделяемое из уретры | A26.21.007 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1664н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при других циститах» | Отделяемое женских половых органов | A26.20.020 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1502н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при воспалительных заболеваниях половых органов» | Отделяемое женских половых органов | A26.20.020 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 696н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при острых простатите, орхите и эпидидимите» | Отделяемое из уретры | A26.21.007 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1521н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при многоплодной беременности» | Кровь (Chlamydia spp.) | A26.05.012 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7 ноября 2012 г. № 685н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите С» | Кровь (Chlamydia spp.) | A26.05.012 |
| | Приказ от 9 ноября 2012 г. № 786н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите В» | Кровь (Chlamydia spp.) | A26.05.012 |
| | Приказ от 9 ноября 2012 г. № 826н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при остром вирусном гепатите С легкой степени тяжести» | Кровь (Chlamydia spp.) | A26.05.012 |
| | Приказ от 7 ноября 2012 г. № 682н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите В среднетяжелой степени тяжести» | Кровь (Chlamydia spp.) | A26.05.012 |
| | Приказ от 7 ноября 2012 г. № 678н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С тяжелой степени тяжести» | Кровь (Chlamydia spp.) | A26.05.012 |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1751н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неуточненном уретральном синдроме» | Кровь | A26.05.018 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1675н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неспецифическом и другом уретрите» | Кровь | A26.05.018 |
| | Приказ от 13 марта 2006 г. № 148 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным при бактериальном сепсисе новорожденного» | Кровь | A26.06.018 |

8.1.2. Нормативная база по ПЦР для выявления герпесвирусов

Молекулярно-биологические методы исследования в диагностике герпесвирусных инфекций регламентированы следующими российскими и зарубежными нормативно-методическими документами:

- ▶ Приказ МЗ РФ от 1 ноября 2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)"»;
- ▶ Приказ МЗ РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»;
- ▶ Приказ МЗ РФ от 30 августа 2012 г. № 107н (ред. от 11.06.2015) «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации «Дерматовенерология 2015: болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем». Российское общество дерматовенерологов и косметологов (РОДВК), 2016 г.;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых респираторных заболеваний (ОРЗ); лечению пневмонии у детей. Союз педиатров России и Ассоциация медицинских обществ по качеству, 2014 г.;
- ▶ Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным цитомегаловирусной инфекцией. ФГБУ НИИДИ ФМБА России, 2015;
- ▶ Клинические рекомендации (проект) по диагностике, лечению и профилактике врожденной цитомегаловирусной инфекции. Российская ассоциация специалистов перинатальной медицины (РАСПМ), 2018 г.;
- ▶ Клинические рекомендации (проект) по диагностике, лечению и профилактике врожденной инфекции, вызванной вирусами простого герпеса. РАСПМ, 2018 г.;
- ▶ Постановление Главного государственного санитарного врача РФ «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП «Профилактика ветряной оспы» (подготовлен Роспотребнадзором 22.12.2016);
- ▶ Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции у взрослых. Национальная вирусологическая ассоциация. Профильная комиссия Минздрава России по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции, 2014 г.;
- ▶ Клинические рекомендации «Инфекционный мононуклеоз у взрослых». ННОИ, 2014 г.;
- ▶ Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным инфекционным мононуклеозом. ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (НИИДИ), 2013 г.;
- ▶ Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным ветряной оспой. НИИДИ, 2015 г.;

- ▶ Клинические рекомендации «Ветряная оспа у взрослых». Национальное научное общество инфекционистов (ННОИ), 2014 г.;
- ▶ Клинические рекомендации «Простой герпес у взрослых». ННОИ, 2014 г.;
- ▶ Клинические рекомендации «Цитомегаловирусная инфекция у взрослых после трансплантации солидных органов». ННОИ, 2014 г..

Кроме того, молекулярно-биологические методы исследования входят в перечень действующих стандартов оказания медицинской помощи (приложение 1).

8.1.3. Нормативная база по ПЦР для выявления папилломавирусов

На сегодняшний день в соответствии с действующими Рекомендациями ВОЗ по скринингу и лечению предраковых поражений для профилактики рака шейки матки («WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention», 2013) скрининг должен включать три базовых метода:

- ▶ выявление ВПЧ (базовая чувствительность метода: ≥ 1 пг/мл);
- ▶ цитология (базовая чувствительность: ASCUS +/- – атипические клетки плоского эпителия неопределенного происхождения);
- ▶ визуализация с использованием уксусной кислоты (VIA, от англ. *visual inspection with acetic acid*), которая рекомендуется к использованию у женщин моложе 50 лет.

Алгоритм скрининга определяет, что в случае положительного результата одного из рекомендованных методов исследования может рассматриваться возможность о проведении криотерапии и/или петлевой электрокоагуляции шейки матки (рис. 17).

ВАЖНО!

Ключевым моментом скрининга рака шейки матки (РШМ) является выявление типов ВПЧ, поскольку это определяет прогноз течения заболевания. Известно, что риск развития плоскоклеточного РШМ выше в 400 раз после инфицирования ВПЧ 16 и примерно в 250 раз после инфицирования ВПЧ 18 по сравнению с риском возникновения рака у неинфицированных женщин. Персистирование ВПЧ 16 типа более двух лет ассоциировано с риском развития CIN в 40–50 % случаев; для 31, 58 и 82 типов риск развития CIN – 20–30 %; для ВПЧ 18, 33, 35, 51 и 52 типов – 10–20 %.

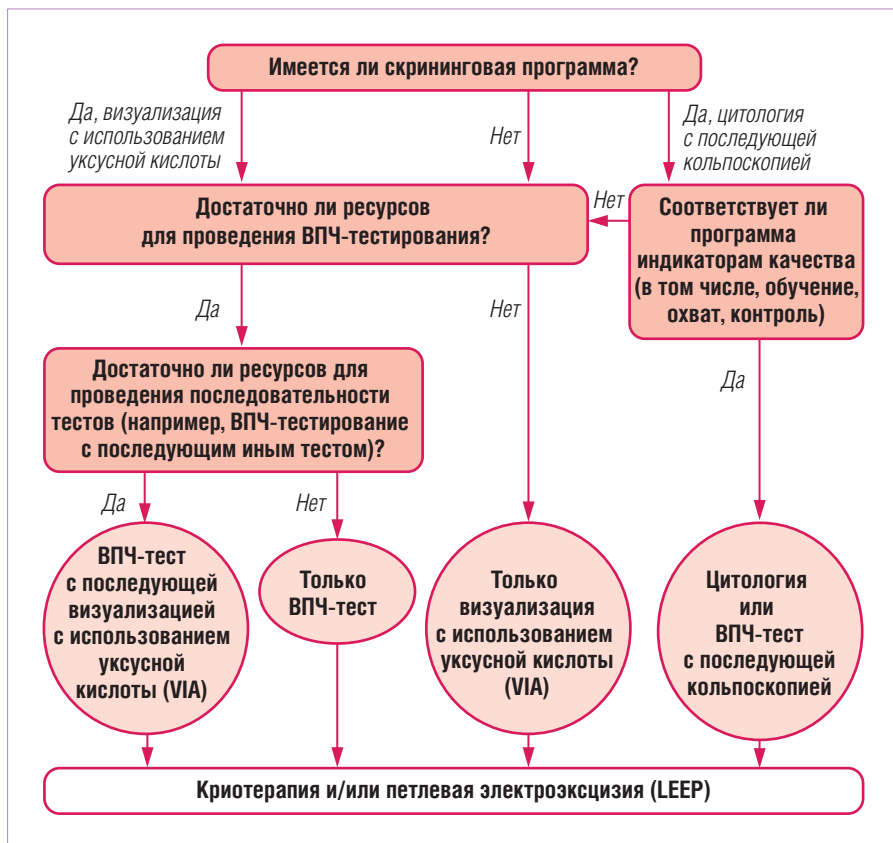


Рис. 17. Схема скрининговых мероприятий в рамках профилактики рака шейки матки (ВОЗ, 2013)

На долю двух высокоонкогенных типов ВПЧ (16 и 18) приходится до 70 % случаев РШМ (60,6 % случаев – 16 тип и 10,2 % – 18 тип), до 80 % – рака вульвы и влагалища, 87 % – анального рака, 95 % – рака ротовой полости, 89 % – рака ротоглотки, 63 % – рака полового члена. При этом 16 тип имеет самый высокий канцерогенный потенциал. В соответствии с Клиническими рекомендациями «Вакцинопрофилактика заболеваний, вызванных вирусом папилломы человека» (2017) примерно в 90 % случаев плоскоклеточной карциномы выявляются 16, 18, 45, 31, 33, 52 и 58 типы ВПЧ.

При этом все действующие рекомендации по диагностике папилломавирусной инфекции и выявлению неопластических процессов, ассоциированных с ВПЧ высокого онкогенного риска, указывают на то, что естественная элиминация, как правило, происходит в течение двух лет. Хроническая ВПЧ-инфекция развивается у 5–10 % женщин и определяется наличием типоспецифичной ДНК ВПЧ при исследовании по-

вторных клинических биологических проб в течение обычно шести месяцев. Интервал между приобретением ВПЧ-инфекции и прогрессированием до инвазивного рака, как правило, составляет около 10 лет или более (Вакцины против папиллома-вирусной инфекции человека: документ по позиции ВОЗ, октябрь 2014).

Таким образом, на сегодняшний день принято положение, что выявление ВПЧ высокого онкогенного риска является достаточным для определения пациенток в группу риска развития неопластических процессов и является основанием для проведения терапии.

Молекулярно-биологические методы исследования для выявления папиллома-вирусов регламентированы следующими нормативными документами:

- ▶ Приказ Минздрава РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых пациентов с остроконечными кондиломами перианальной области и анального канала, 2013.
- ▶ Федеральные клинические рекомендациями. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем (РОДВК, 2016);
- ▶ Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака: Клинические рекомендации (протоколы диагностики и ведения больных) (МЗ РФ, 2017).

Кроме того, данная технология входит в перечень лабораторных методов диагностики, определенных стандартами оказания медицинской помощи (табл. 5).

ВАЖНО!

Наличие HPV высокого онкогенного риска в урогенитальном тракте является фактором риска развития рака, но не может быть основанием для диагностики онкозаболевания. Единственным методом диагностики рака шейки матки является *цитологическое исследование*.

Таблица 5. Молекулярно-биологические методы выявления вирусов папилломы человека в стандартах оказания медицинской помощи

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Вирусы папилломы человека | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1557н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при воспалении вульвы и влагалища» | Отделяемое из цервикального канала | A26.20.009 |
| | | Влагалищное отделяемое | A26.20.012 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1664н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при других циститах» | Влагалищное отделяемое | A26.20.012 |
| | | Отделяемое из цервикального канала | A26.20.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1423н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи детям при сальпингите и оофорите» | Отделяемое из цервикального канала | A26.20.009 |
| | | Влагалищное отделяемое | A26.20.012 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1511н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией)» | Отделяемое из цервикального канала | A26.20.009 |
| | | Влагалищное отделяемое | A26.20.012 |
| Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1521н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при многоплодной беременности» | Отделяемое из цервикального канала | A26.20.009 | |

Факт наличия HPV может быть использован для корректировки схемы обследования и периодичности наблюдения. Положительный результат исследования имеет высокое диагностическое значение у женщин старше 30 лет. ДНК-диагностика используется в качестве подтверждающего теста при обнаружении ASCUS (после жидкостной цитологии и визуального метода) и контроля терапии при CIN II, III.

8.1.4. Нормативная база по ПЦР для выявления вирусов гепатитов В и С, ВИЧ

Метод ПЦР для выявления возбудителей гемотрансмиссивных инфекций и определения вирусной нагрузки регламентирован следующими нормативно-методическими документами:

- ▶ Приказ Минздрава РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С. МЗ РФ, 2017;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В. МЗ РФ, 2014;
- ▶ Проект Методических рекомендаций «Лабораторная диагностика вирусных гепатитов» ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, 2017;
- ▶ Клинические рекомендации «Молекулярно-биологическое исследование «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови», 2014 г.;
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России) от 2 апреля 2013 г. № 183н г. Москва «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов» ГОСТ Р 53470-2009 «Кровь донорская и ее компоненты. Руководство по применению компонентов донорской крови»;
- ▶ Приказ Минздрава России от 30.08.2012 № 107н (ред. от 11.06.2015) «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;
- ▶ Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 11 января 2011 г. Об утверждении СП 3.1.5.2826-10 «ПРОФИЛАКТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ»;
- ▶ Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 22 октября 2013 г. № 58 ОБ УТВЕРЖДЕНИИ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ПРАВИЛ СП 3.1.3112-13 «ПРОФИЛАКТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С»;
- ▶ Проект Методических рекомендаций «Лабораторная диагностика вирусных гепатитов» ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, 2017.

Кроме того, метод ПЦР для определения вирусов гепатитов В и С, ВИЧ входит в стандарты оказания медицинской помощи (табл. 6).

Таблица 6. Молекулярно-биологические методы выявления вирусов гепатитов В и С, ВИЧ в стандартах оказания медицинской помощи

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Вирусы гепатита В, С и ВИЧ | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1511н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией)» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) Исследование крови на вирусный гепатит В (Hepatitis B virus) Исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.019 A26.05.020 A26.05.021 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1512н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)» | Исследование плазмы крови на наличие мутаций лекарственной резистентности в РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.022 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1128н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при хронических вирусных гепатитах (в дневном стационаре)» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) Исследование крови на вирусный гепатит В (Hepatitis B virus) Исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.019 A26.05.020 A26.05.021 |
| | Приказ Минздрава России от 09.11.2012 № 827н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при остром вирусном гепатите С средней степени тяжести» | Исследование плазмы крови на наличие мутаций лекарственной резистентности в РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.022 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 года № 733н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С средней степени тяжести» | Молекулярно-биологическое исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) Молекулярно-биологическое исследование крови на вирусный гепатит В (Hepatitis B virus) | A26.05.019 A26.05.020 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 года № 733н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С средней степени тяжести» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) Исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.019 A26.05.021 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 года № 733н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С средней степени тяжести» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) | A26.05.019 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7 ноября 2012 г. № 685н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите С» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) | A26.05.019 |
| | Приказ от 9 ноября 2012 г. № 826н Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при остром вирусном гепатите С легкой степени тяжести» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) Исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.019 A26.05.021 |
| | Приказ Минздрава России от 07.11.2012 № 678н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С тяжелой степени тяжести» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) | A26.05.019 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 861н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при дорентгеве аутологичного костного мозга» | Исследование крови на вирусный гепатит С (Hepatitis C virus) Исследование крови на вирусный гепатит В (Hepatitis B virus) | A26.05.019 A26.05.020 |
| | Приказ от 9 ноября 2012 г. № 786н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите В согласно приложению» | Исследование крови на вирусный гепатит В (Hepatitis B virus) | A26.05.020 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1536н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при вирусном энцефалите, миелите» | Исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.021 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1535н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при внутричерепных и внутрипозвоночных абсцессах» | Исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus HIV-1) | A26.05.021 |

8.1.5. Нормативная база по ПЦР для выявления возбудителей ОРВИ и туберкулеза

Определение возбудителя ОРВИ в каждом конкретном случае имеет важнейшее значение для выбора терапии, поскольку лечение может быть как симптоматическим (при риновирусной инфекции), так и предполагающим использование противовирусных препаратов, а также для прогнозирования вероятных осложнений.

Метод ПЦР рекомендован для выявления возбудителей респираторных инфекций в соответствии со следующими документами:

- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1450н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при острых респираторных заболеваниях тяжелой степени тяжести»:
 - A26.09.017 – Молекулярно-биологическое исследование лаважной жидкости на респираторно-синтициальный вирус (Respiratory syncytial virus);
 - A26.09.018 – Молекулярно-биологическое исследование лаважной жидкости на аденовирус (Adenovirus);
 - A26.09.019 – Молекулярно-биологическое исследование лаважной жидкости на вирус гриппа (Influenzae virus);
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 724н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при гриппе средней степени тяжести»:
 - A26.09.019 – Молекулярно-биологическое исследование лаважной жидкости на вирус гриппа (Influenzae virus);
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 878н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при вирусной инфекции неуточненной локализации легкой степени тяжести»:
 - A26.08.008 – Молекулярно-биологическое исследование носоглоточных смывов на коронавирус (Coronavirus);
- ▶ Национальные клинические рекомендации «Грипп у взрослых», 2014;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых, 2014;
- ▶ Национальные рекомендации по диагностике и лечению тяжелых форм гриппа. Российское Респираторное Общество, 2013;
- ▶ СП 3.1.2.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций», 2013;
- ▶ МУ 3.4.3008-12 Методические указания «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней», 2012;
- ▶ Клинические рекомендации МЗ РФ «Выявление и диагностика туберкулеза у детей, поступающих и обучающихся в образовательных организациях», 2017.

Использование ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволяет проводить исследования на наличие *M. tuberculosis* и определять чувствительность микобактерий к широкому спектру препаратов как в специализированном, так и в общем лечебном учреждении уже на первичном этапе. В рамках лабораторной диагностики туберкулеза метод ПЦР рекомендован в следующих нормативно-методических документах:

- ▶ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания, 2014;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией, 2014;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя, 2014 г.;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания у детей, 2014;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей, 2013.

8.1.6. Нормативная база по ПЦР для выявления возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) и прочих инфекций

Согласно Международным медико-санитарным правилам (ММСП), ООИ – это «инфекционные заболевания, которые вошли в перечень событий, что могут являть собой чрезвычайную ситуацию в системе охраны здоровья в международном масштабе».

Приложение № 2 ММСП-2005 определяет перечень таких инфекций, разделенный на две группы. Первая – «болезни, которые являются необычными и могут оказать серьезное влияние на здоровье населения»: оспа, полиомиелит, вызванный диким полиовирусом, человеческий грипп, вызванный новым подтипом, тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС, или SARS).

Вторая группа – это «болезни, любое событие с которыми всегда оценивается как опасное, поскольку эти инфекции обнаружили способность оказывать серьезное влияние на здоровье населения и быстро распространяться в международных масштабах»: холера, легочная форма чумы, желтая лихорадка, геморрагические лихорадки, лихорадка Западного Нила.

Метод ПЦР полностью удовлетворяет перечисленным требованиям, в связи с чем, согласно Приказам Роспотребнадзора от 03.07.2006 № 14 «Об обеспечении мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации», от 17.03.2008 № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» и Постановлению Главного государственного врача РФ Г. Г. Онищенко от 05.09.2005 № 21 «О совершенствовании государственного санитарно-эпидемиологического надзора по противодействию угрозе биотерроризма», Приказу Минздрава РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований» и в соответствии с МУ 3.4.3008-12 – Методическими указаниями «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней», он был

признан обязательным методом ускоренной диагностики для идентификации и лабораторной диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы в клиническом материале и пробах из объектов окружающей среды.

Среди прочих инфекций наиболее часто метод ПЦР рекомендован для выявления *Toxoplasma gondii* (табл. 7).

Таблица 7. Молекулярно-биологические методы выявления *Toxoplasma gondii* в стандартах оказания медицинской помощи

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 816н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при псевдотуберкулезе и иерсиниозе средней степени тяжести» | Молекулярно-биологическое исследование крови на токсоплазмы (<i>Toxoplasma gondii</i>) | A26.05.013 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1511н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией)» | | |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7 ноября 2012 г. № 685н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите С» | | |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1512н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)» | | |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 733н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С средней степени тяжести» | | |
| | Приказ Минздрава России от 07.11.2012 № 678н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С тяжелой степени тяжести» | | |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 786н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите В» | | |

8.1.7. Нормативная база по ПЦР для анализа микрофлоры урогенитального тракта у женщин

Компания «ДНК-Технология» разработала уникальную запатентованную технологию оценки состояния нормофлоры УГТ у женщин «Фемофлор®» – количественное исследование методом ПЦР в режиме реального времени условно-патогенных и патогенных микроорганизмов – возбудителей бактериального вагиноза и дисбиотических нарушений.

Технология включает несколько вариантов тестов по количеству определяемых параметров (табл. 8).

Возможности метода:

- ▶ количественная оценка общей бактериальной массы;
- ▶ количественное определение доли урогенитальной нормофлоры (лактобактерии, типичные для урогенитального тракта женщин);
- ▶ количественный анализ комплекса аэробных и анаэробных микроорганизмов, микоплазм, грибов рода *Candida*, участвующих в развитии дисбиотических процессов в урогенитальном микробиоценозе;
- ▶ определение этиологии дисбиотического процесса (*аэробный, анаэробный, смешанный дисбиоз*);
- ▶ дифференцированный анализ степени выраженности дисбиотических нарушений (*нормоценоз, условный нормоценоз, умеренный или выраженный дисбиоз*);
- ▶ качественный анализ патогенов;
- ▶ возможность определения объема назначаемой терапии, индивидуальный подбор схемы лечения;
- ▶ возможность проведения динамических наблюдений;
- ▶ исключение ошибок преаналитического этапа (контроль взятия материала).

Спектр представленных в «Фемофлор®-16» анаэробов соответствует перечню микроорганизмов в разделе 9.1.2.1.3 «Условно-патогенные облигатные анаэробные микроорганизмы – возбудители гнойно-септических и оппортунистических заболеваний», подлежащих определению в соответствии с Приказом МЗ РФ от 21.02.2000 № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований».

Технология «Фемофлор®» рекомендована для диагностики бактериального вагиноза в соответствии с Клиническими рекомендациями по диагностике и лечению заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин. РОАГ, 2019.

Таблица 8. Варианты комплектов реагентов ФЕМОФЛОР®

| Группа | Выявляемые показатели | ФЕМОФЛОР®-8 | ФЕМОФЛОР® СКРИН | ФЕМОФЛОР®-16 |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------|--------------|
| Диагностика нормоценоза | Общая бактериальная масса | ✓ | ✓ | ✓ |
| | <i>Lactobacillus</i> spp. / ВК | ✓ | ✓ | ✓ |
| Аэробные микроорганизмы | Сем. <i>Enterobacteriaceae</i> | | | ✓ |
| | <i>Streptococcus</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Staphylococcus</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas</i> spp. | ✓ | ✓ | ✓ |
| Анаэробные микроорганизмы | <i>Eubacterium</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Sneathia</i> spp. + <i>Leptotrichia</i> spp. + <i>Fusobacterium</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Megasphaera</i> spp. + <i>Veillonella</i> spp. + <i>Dialister</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Mobiluncus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Peptostreptococcus</i> spp. | | | ✓ |
| | <i>Atopobium</i> <i>vaginae</i> | | | ✓ |
| | <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> | ✓ | ✓ | ✓ |
| | <i>Ureaplasma</i> (<i>urealyticum</i> + <i>parvum</i>) | ✓ | ✓ | ✓ |
| | <i>Candida</i> spp. / контроль взятия материала (КВМ) | ✓ | ✓ | ✓ |
| Патогены | <i>Trichomonas vaginalis</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i> / <i>Chlamydia trachomatis</i> / ВК | | ✓ | |
| | <i>Herpes simplex virus 2</i> / <i>Cytomegalovirus</i> / <i>Herpes simplex virus 1</i> / ВК | | ✓ | |

8.1.8. ПЦР в генотипировании человека

Одним из наиболее перспективных направлений ПЦР-диагностики является изучение генома человека. Особенно актуальны данные исследования при использовании молекулярно-генетических методов для профилактики и борьбы с неинфекционными заболеваниями, в первую очередь раком, сердечно-сосудистыми, респираторными заболеваниями, сахарным диабетом.

На сегодняшний день спектр ПЦР-исследований в области генотипирования человека чрезвычайно широк, в последние годы формируется нормативно-методическая база для применения этого подхода в клинико-диагностической практике. Коммерческую реализацию и разрешение использовать технологию ПЦР как медицинскую услугу получили следующие направления:

- ▶ **Исследование главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-типирование).** HLA-комплекс включает в себя область генов на 6-й хромосоме, которые кодируют HLA-антигены, участвующие в различных реакциях иммунного ответа.
- ▶ **Генетика наследственных болезней.** Выявление генетических маркеров заболеваний, для которых главным этиологическим фактором является генная, хромосомная или геномная мутация.
- ▶ **Генетика репродукции.** Особенностью данной области диагностики является обследование супружеской пары.
- ▶ **Генетика многофакторных заболеваний.** Многофакторные заболевания (болезни с наследственной предрасположенностью) развиваются в результате взаимодействия определенных комбинаций аллелей разных локусов и специфических воздействий факторов окружающей среды.
- ▶ **Иммуногенетика.** Раздел иммунологии и генетики, изучающий закономерности наследования антигенной специфичности различных тканей организма и роль генетических механизмов в осуществлении иммунологических процессов.
- ▶ **Онкогенетика.** Раздел онкологии, изучающий роль генетических факторов в этиологии и патогенезе опухолей.
- ▶ **Фармакогенетика.** Раздел медицинской генетики и фармакологии, изучающий зависимость реакций организма на лекарственные средства от наследственных факторов.

Современные представления о роли генетических изменений в развитии патологических состояний основываются на том, что все болезни в зависимости от относительной значимости наследственных и средовых факторов в их развитии можно разделить:

- ▶ на *наследственные* – вызваны мутациями, патологическое действие которых практически не зависит от среды (гемофилия, фенилкетонурия, болезнь Дауна и другие);
- ▶ с *наследственной предрасположенностью* (мультифакторные) – развиваются у лиц с определенной генетической характеристикой под влиянием факторов

окружающей среды (диабет, атеросклероз, бронхиальная астма и т. д.);

- ▶ **ненаследственные** – определяющим фактором развития заболеваний является среда (в первую очередь травмы, большинство инфекционных заболеваний). Генетические изменения могут влиять только на течение патологического процесса, но не являются этиологическим фактором.

В соответствии со структурой изменений в генетическом материале **наследственные болезни** можно классифицировать:

- ▶ на **моногенные** (миотоническая дистрофия, туберозный склероз, мукополисахаридозы и другие) – определяются критичными изменениями в одном гене и наследуются согласно законам Менделя:
 - у человека, как у любого диплоидного организма, гены находятся в парах на связанных (гомологических) хромосомах. Исключение составляют лишь половые хромосомы (X и Y) у мужчин. Если пара представлена *двумя одинаковыми вариантами гена* (аллелями) – генотип *гомозиготен*, если *аллели не идентичны* – генотип *гетерозиготен*;
 - патологические изменения могут наследоваться:
 - аутосомно-доминантно;
 - аутосомно-рецессивно;
 - сцепленно с полом (X-сцепленный доминантный, X-сцепленный рецессивный и Y-сцепленный типы наследования);
 - термин «аутосомный» указывает на то, что мутантный ген локализован в аутосоме (неполовой хромосоме), «X-сцепленный» – в половой X-хромосоме, а «Y-сцепленный» – в половой Y-хромосоме;
 - *доминантный тип наследования* – для реализации фенотипических проявлений достаточно одной мутантной аллели – клиническое проявление болезни обнаруживается и у гомо-, и у гетерозигот;
 - *рецессивный тип наследования* – для реализации фенотипических проявлений необходимы две мутантные аллели – клиническое проявление болезни обнаруживается только у гомозигот;
- ▶ **хромосомные** (например синдромы Дауна, Тернера, Эдвардса) – изменения в структуре или количестве хромосом;
- ▶ **митохондриальные** (синдромы Кернса-Сейра, Вольфрама, Пирсона; болезнь Лебера и другие) – обусловлены мутациями в собственно митохондриальной ДНК или ядерными мутациями, приводящими к нарушению функции митохондрий. Характеризуются неменделевским типом наследования.

Тем не менее накопление и анализ фактических данных по наследованию патологических признаков и результаты проекта «Геном человека» выявили, что практически для каждого наследственного заболевания существует несколько вариантов изменений, приводящих к развитию клинического фенотипа.

Так, для моногенных наследственных заболеваний было установлено, что традиционное представление: заболевание = мутация (-ии) *единственного* гена, ассоции-

рованного с ним, – не так однозначно, поскольку для большинства моногенных заболеваний на сегодняшний день описано несколько генов, клиническую картину может вызывать мутация (-ии) в *любом одном из описанных генов*. Соответственно, основной задачей клинической генетики стал *поиск индивидуального генетического дефекта в каждой конкретной семье с клиническим фенотипом моногенной патологии*.

В структуре заболеваний, ассоциированных с генетическими изменениями, мультифакторные преобладают с существенным перевесом по сравнению с моногенными и хромосомными наследственными болезнями (рис. 18).

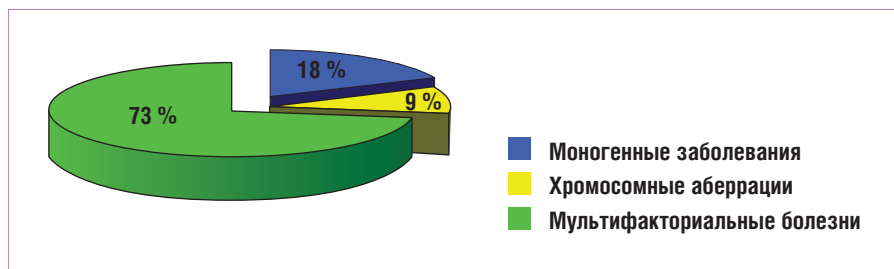


Рис. 18. Структура наследственных патологий

Мультифакторные заболевания связаны преимущественно с однонуклеотидными полиморфизмами в *группе* генов. При этом групповое действие генов может быть *аддитивным*, когда равные по величине воздействия на организм гены (каждый с небольшим эффектом) в сумме ассоциированы с риском развития клинической картины, а может быть связано с действием ключевого гена (с выраженным эффектом), тогда как остальные оказывают модифицирующее влияние на клинические проявления болезни (Фолкнер, 1965).

С генетической точки зрения мультифакторные заболевания разделяют на две группы:

- ▶ возникшие внутриутробно (большинство врожденных пороков развития) – диагностируются в самые ранние периоды постнатального развития и являются следствием взаимодействия генетических факторов с неблагоприятными факторами на этапе внутриутробного развития (тератогены, отягощенный анамнез матери);
- ▶ в любом периоде постнатального развития (наследственная предрасположенность) – развиваются в результате взаимодействия генетических факторов с неблагоприятными факторами в постнатальном онтогенезе.

Важно учитывать, что под неблагоприятными факторами или *факторами риска* подразумеваются две категории:

- *модифицируемые* – способные к изменениям, активно управляемые внешне. Системное и комплексное воздействие на модифицируемые факторы может существенно ослабить или нейтрализовать их патогенную (нозогенную) составляющую. К модифицируемым факторам относят курение, злоупотребление алкоголем, нерациональное питание, гиподинамию, психоэмоциональный стресс и т.д.;
- *немодифицируемые* (возраст, пол и генетические особенности) – коррекции не поддаются, однако их используют для оценки и прогноза индивидуального, группового и популяционного риска развития заболеваний.

Принципиальные отличия мультифакторных заболеваний от моногенных болезней:

- ▶ Для развития клинической картины как таковой необходимо взаимодействие генетической составляющей с неблагоприятными факторами среды.
- ▶ Реализация заболевания происходит при условии либо накопления патологических вариантов генов, которые обуславливают аддитивный эффект генетической составляющей, либо преодоления порога генетических и средовых влияний (превышение критической массы).
- ▶ Наследование не соответствует менделевским закономерностям.
- ▶ Соотносительная роль генетических и средовых факторов (компонент) как для конкретной патологии, так и для каждого индивида своя. Величина предрасположенности может быть различной для индивидов мужского и женского пола, разных конституциональных типов, биохимических, иммунологических характеристик.

Таким образом, выраженные популяционные, этнические и, главное, индивидуальные различия геномов обусловлены различными изменениями в генетической информации, приводящими к **генетическому полиморфизму**, встречающемуся в популяции с частотой не менее 1 %.

ВАЖНО!

Генетические различия в российской популяции кластеризуются в несколько крупных этногеографических групп: славяне, популяции Северного Кавказа, финно-угры Севера Европейской части и Волго-Уральского региона, популяции Южной Сибири и Средней Азии, народы Восточной Сибири и Северной Азии. Географическая структурированность генофонда народов России прослеживается по всем системам генетических маркеров – линиям мтДНК, Y-хромосомы, X-хромосомы, аутомсомным маркерам, включая полногеномные наборы SNP.

Полиморфными принято называть гены, которые представлены в популяции несколькими разновидностями – аллелями. Главной формой генетического полиморфизма является **однонуклеотидный полиморфизм** (от англ. *single nucleotide polymorphism*, SNP) – вариации единичных нуклеотидов в определенных областях генома, возникающие по следующим причинам (рис. 19):

- ▶ *транзигция* – замена одного пуринового основания на другое (А на Г) или одного пиримидинового основания на другое (У или Т на Ц) (рис. 31);
- ▶ *трансверсия* – замена пуринового основания на пиримидиновое (А или Г на Т, У или Ц) или пиримидинового основания на пуриновое (Т, У или Ц на А или Г);
- ▶ *делеция* единичных нуклеотидов – потеря одной или более нуклеотидных позиций в последовательности ДНК;
- ▶ *инсерция* – вставка новых нуклеотидов в последовательности ДНК;
- ▶ *дупликация* – повторение участка гена.

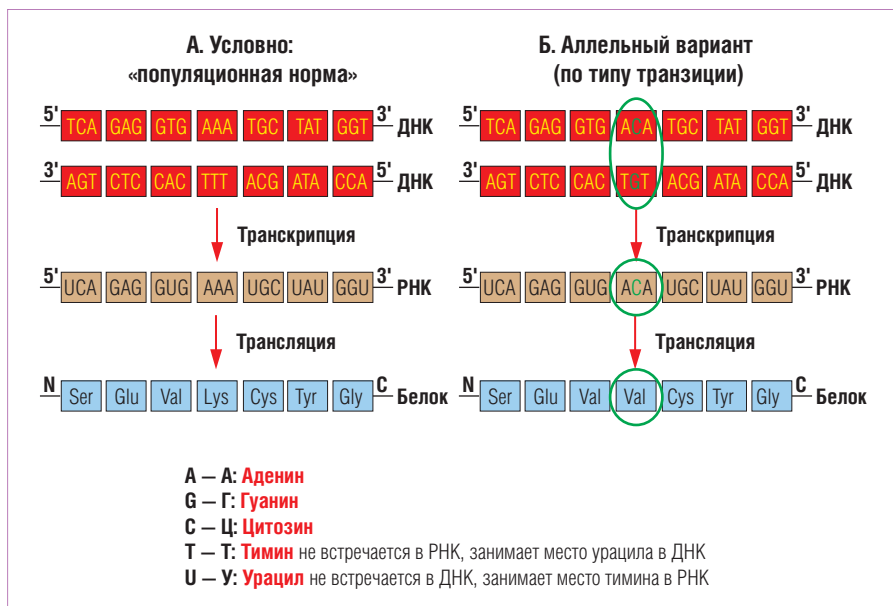


Рис. 19. Однонуклеотидный полиморфизм, образовавшийся путем транзигции

Однонуклеотидные замены происходят на всем протяжении гена, однако не все из них имеют фенотипическое или клиническое значение. Принципиальными могут быть замены в кодирующих и регулирующих областях гена.

В соответствии с международными рекомендациями Human Genome Variation Society (HGVS) Recommendations for the Description of Sequence Variants (2016), описание однонуклеотидных замен строится следующим образом (табл. 9, рис. 20):

Таблица 9. Номенклатура и примеры описания полиморфизмов

| НАЗВАНИЕ | ОБОЗНАЧЕНИЕ | ПРИМЕР ЗАПИСИ |
|--------------------------------------|--------------|--------------------|
| Замена (транзикация или трансверсия) | > | *g.1318 G>T |
| Делеция | del | g.3661_3706del |
| Инсерция | ins | g.7339_3340insTAGG |
| Дупликация | dup | g.3661_3706dup |
| Делеция-инсерция | delins/indel | g.112,117delinsTG |

* *Примечание: g – геномная ДНК (нумерация нуклеотидов в хромосоме)*



Рис. 20. Расшифровка записи однонуклеотидного полиморфизма гена коагуляционного фактора V (по типу транзиции)

В зависимости от положения нуклеотида (-ов) в нуклеотидной последовательности гена, претерпевшего какие-либо из указанных выше изменений, можно предполагать, затронута ли регуляторная область либо транскрируемый участок («матрица»):

1. Если в записи однонуклеотидного полиморфизма присутствует знак минус, это означает, что изменения затронули нетранскрируемый участок гена в начале кодирующей области (промотор) с 5'-конца (рис. 21).

FGV: - 455 G > A

Эффект: повышенная экспрессия гена фибриногена

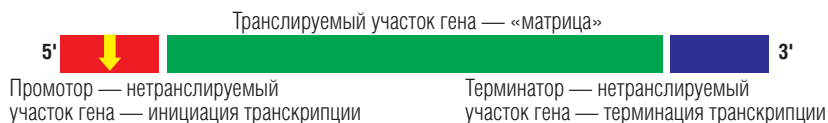


Рис. 21. Полиморфизм гена фибриногена

Как правило, такие полиморфизмы ассоциированы с нарушениями (повышением/снижением) *экспрессии* гена. Как следствие, наблюдается образование функционально и структурно неизмененного продукта, но в большей (при увеличении экспрессии) или меньшей (при снижении экспрессии) концентрации по сравнению с условно «популяционной нормой».

2. Если в части положения нуклеотида в нуклеотидной последовательности гена указаны значения, превышающие десятки тысяч, это может означать, что изменения затронули нетранслируемые участки гена, расположенные за кодирующей областью, и нарушена терминация (завершение) транскрипции (рис. 22).

F2: 20210 G > A

Эффект: повышенная экспрессия гена протромбина

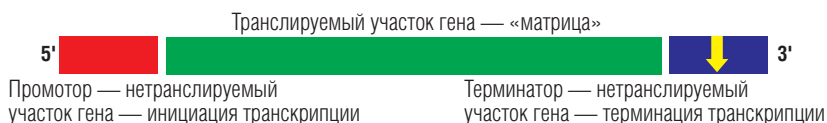


Рис. 22. Полиморфизм гена протромбина

3. В случае обозначения положения нуклеотида в нуклеотидной последовательности гена в диапазоне от единицы до нескольких тысяч пар нуклеотидов можно предполагать, что затронута транслируемая область гена и полиморфизм ассоциирован со структурными и/или функциональными изменениями кодируемого продукта (рис. 21).

F5: 1691 G > A

Эффект: изменение структуры и функции продукта (активированного протеина C)

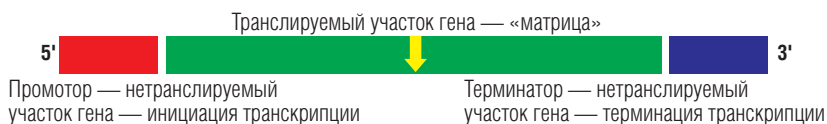


Рис. 23. Полиморфизм гена проакцелерина (коагуляционный фактор V) — лейденская мутация

Диагностика наследственных и мультифакторных заболеваний имеет ряд особенностей. Так, наследственные болезни с менделевским наследованием определяются на основании совокупности следующих методов:

- 1) клинико-генеалогического;
- 2) популяционно-статистического;
- 3) близнецового;

4) специальных методов: цитогенетического, биохимического, молекулярно-генетического и иммунологического;

5) дополнительных (лабораторные, инструментальные) методов исследования – ультразвуковое исследование внутренних органов, рентгенография, магнитно-резонансная томография, электромиография и др.

Объективным ограничением клинко-генеалогического метода является сложность сбора информации о родственниках пациента, так как, во-первых, не все пациенты знают об их болезнях; во-вторых, семейные случаи заболевания нередко скрываются. Кроме того, бывает затруднительно проследить наследование в малочисленных семьях или семьях, в которых невозможно проследить родословную до необходимых трех-четырех поколений. Наиболее частой ошибкой при использовании клинко-генеалогического метода является получение информации только в результате простого опроса родственников. Этого, как правило, недостаточно. Для уточнения диагноза часто приходится проводить перекрестный опрос родственников, полное клиническое, лабораторное или инструментальное обследование членов семьи, а затем вновь возвращаться к генетическому анализу. Иногда только при подобном подходе удается выявить стертые формы наследственной патологии.

Кроме того, важно учитывать, что частной формой соматических мутаций является гонадный мозаицизм, когда в гонадах одного из родителей, не имеющего каких-либо фенотипических отклонений, имеется мутантный клон клеток. Это может приводить к рождению двух и более детей с тем или иным патологическим фенотипом от здоровых родителей или даже в двух браках одного из супругов.

Еще один важный момент, который напрямую влияет на результаты исследования с использованием клинко-генетического метода, наличие «фенокопий», когда для некоторых наследственных и ненаследственных болезней формируется совокупность сходных клинических проявлений. При этом очень важно исключить средовые факторы, например, если патогенный фактор действовал на женщину во время всех беременностей, то у такой женщины могут родиться несколько детей с одинаковыми врожденными пороками. Или одни и те же вредные производственные или внешние факторы могут вызывать сходные заболевания у членов одной семьи.

В связи с этим важную роль приобретают *молекулярно-генетические методы* исследования, которые позволяют идентифицировать специфические генетические факторы заболевания вне зависимости от полноты информации, собранной в рамках клинко-генеалогического подхода, спорных результатов специальных исследований и при наличии стертой клинической картины у самого пациента или его родственников.

Для мультифакторных заболеваний, характеризующихся менделевским наследованием, ключевую роль играют именно **молекулярно-генетические и популяционно-статистические методы** исследования, направленные на выявление статистически и клинически значимых полиморфизмов генов, ассоциированных с риском развития заболевания. При этом комплексная оценка генетического риска

мультифакторного заболевания должна учитывать, что отдельный полиморфизм часто не имеет выраженного самостоятельного фенотипического проявления, а лишь является одним из факторов риска развития болезни.

Поэтому важной характеристикой вклада полиморфного аллеля в развитие мультифакторного заболевания является значение показателя «отношение шансов» (*odds ratio, OR*). Рассчитывается *OR* для групп «случай – контроль» как отношение частоты встречаемости полиморфного аллеля в группе пациентов к частоте встречаемости того же аллеля в здоровой контрольной группе.

При значении $OR = 1$ риск развития заболевания равен популяционному; при $OR > 1$ носительство исследуемого полиморфного аллеля увеличивает риск возникновения заболевания, $OR < 1$ позволяет говорить о снижении риска заболевания (протективном эффекте полиморфизма) по сравнению с контрольной группой.

В целом молекулярно-генетические методы исследований рассматриваются на сегодняшний день как основной подход не столько с точки зрения уточнения или подтверждения диагноза, сколько с позиции прогнозирования рисков развития заболевания. В 2006 г. ВОЗ определила цели генетического тестирования («Medical genetic services in developing countries. The Ethical, Legal and Social Implications of genetic testing and screening»):

- ▶ диагностика наследственных заболеваний (хромосомных или моногенных) у пациентов с соответствующими симптомами;
- ▶ пресимптоматическая генетическая диагностика – прогнозирование развития моногенных заболеваний у пациентов в отсутствие симптомов;
- ▶ определение генетической предрасположенности – вероятностная оценка развития мультифакторных болезней у условно здорового человека;
- ▶ генетическое тестирование потенциальных носителей рецессивных мутаций для определения рисков развития заболевания у потомства;
- ▶ дородовое генетическое тестирование для выявления плода с повышенным риском врожденных аномалий.

В 2008 году Лерой Худ сформулировал концепцию четырех «P» («P4 Medicine: Personalized, Predictive, Preventive, Participatory. A Change of View That Changes Everything»), в которой отражено практическое приложение современных генетических знаний:

- ▶ предсказательная (предиктивная) медицина – диагностика вероятных заболеваний с учетом генетической предрасположенности конкретного человека;
- ▶ профилактическая (превентивная) медицина – лечебно-профилактические мероприятия для лиц с высокой вероятностью развития того или иного заболевания, связанного с наследственной предрасположенностью;
- ▶ персонализированная медицина – индивидуальный подбор профилактических и терапевтических мероприятий с учетом генетических особенностей пациента;
- ▶ партнерская медицина – информированное и активное участие самого пациента в сотрудничестве с врачами при выборе вариантов лечения и образа жизни.

Суть данной концепции складывается из следующих базовых подходов:

- ▶ обнаружение заболевания на более ранней стадии, когда его лечение может быть эффективнее и дешевле;
- ▶ стратификация пациентов по группам для подбора оптимальной терапии;
- ▶ предиктивное снижение побочных эффектов при приеме лекарственных средств путем оценки индивидуальной чувствительности к ним;
- ▶ оптимизация поиска новых биохимических мишеней для последующей разработки лекарственных средств;
- ▶ сокращение времени, затрат на клинические испытания новых методов лечения;
- ▶ акцент на лечебно-профилактические мероприятия.

Распоряжением Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. № 2580-р утверждена Стратегия развития медицинской науки на период до 2025 года, основной целью которой является развитие передовых технологий медицинской науки и внедрение на их основе инновационных продуктов, обеспечивающих сохранение и улучшение здоровья населения. В соответствии с поставленными задачами Приказом Министерства здравоохранения РФ от 30 апреля 2013 г. № 281 определены научные платформы медицинской науки, в том числе научная платформа «Профилактическая среда» для создания единой профилактической среды как комплекса информационных, физических, социальных и экономических факторов, обеспечивающего здоровый образ жизни и профилактику хронических неинфекционных заболеваний (ХНИЗ). Прикладными аспектами данной платформы в том числе являются: создание технологии ранней диагностики ХНИЗ с учетом генетических факторов риска; создание индивидуального генетического паспорта факторов риска ХНИЗ и индивидуального генетического паспорта ХНИЗ человека.

ВАЖНО!

На сегодняшний день особую значимость приобретает *преконцепционная подготовка* – консультирование и обследование будущих родителей до зачатия, включающие поиск и, по возможности, минимизацию поведенческих, биомедицинских и социальных факторов риска, то есть неблагоприятно влияющих на исход беременности как для матери, так и для плода. Данные мероприятия подразумевают обследование состояния здоровья супругов и в случае необходимости лечение и стабилизацию патологии, обладающей возможностью повышать риск осложнений беременности и родов.

Молекулярно-генетическое тестирование в рамках прекоцепционной подготовки позволяет заблаговременно получать информацию о генотипах обоих родителей, идентифицировать конкретный генетический маркер, ассоциированный с заболеванием, и заранее сформировать группу риска – выявить семьи, где есть вероятность рождения

больного ребенка. Применение современных репродуктивных технологий в сочетании с преимплантационной диагностикой позволит обеспечить рождение здоровых детей.

Основные критерии для включения заболевания в преконцепционный скрининг:

- ▶ Тип наследования – при рецессивном типе заболевания часто наблюдаются фенотипически здоровые носители. Отсутствие у потенциальных родителей гетерозиготного носительства наиболее распространенных генетических маркеров позволяет свести риск рождения больного ребенка практически к нулю.
- ▶ Частота – заболевание является распространенным в скринируемой популяции.
- ▶ Полная пенетрантность (показатель фенотипического проявления аллеля в популяции; определяется как отношение числа особей, у которых наблюдаются фенотипические проявления наличия аллеля, к общему числу особей, у которых данный аллель присутствует в необходимом для фенотипического проявления количестве копий) – 100%-е фенотипическое проявление наличия данного аллеля в пределах популяции.
- ▶ Тяжесть заболевания.
- ▶ Доступность диагностики – представленные маркеры позволяют осуществлять эффективную, быструю и экономически обоснованную диагностику.

Мероприятия в случае положительного результата скрининга (высокий риск рождения больного ребенка):

- ▶ При выявлении патологического аллеля у одного из партнеров необходимо углубленное исследование данного гена у второго партнера (поиск более редких мутаций, не входящих в скрининг, или полный сиквенс гена).
- ▶ Проведение инвазивной генетической диагностики до 12-й недели беременности (вторичная профилактика).
- ▶ Проведение программы ВРТ с предимплантационной генетической диагностикой эмбриона (первичная профилактика).

В практическую медицину генетическое тестирование с использованием молекулярно-генетических методов и идентификация генов, ассоциированных с риском развития / развитием заболеваний, введены следующими нормативно-методическими документами:

- ▶ Приказ Минздрава РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»;
- ▶ ГОСТ Р 56377-2015 «Клинические рекомендации (протоколы лечения). Профилактика тромбоэмболических синдромов»;
- ▶ Приказ Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» (вместе

с «Положением об организации проведения массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания», «Рекомендациями по забору образцов крови при проведении массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания»);

- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15 ноября 2012 г. № 917н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями»;
- ▶ Приказ Минздрава России от 28.12.2000 № 457 «О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей» (вместе с «Инструкцией по организации проведения пренатального обследования беременных женщин с целью выявления врожденной и наследственной патологии у плода», «Инструкцией по проведению инвазивной диагностики плода и генетического исследования биоптатов клеток», «Инструкцией о проведении верификации диагноза после прерывания беременности по медицинским показаниям или рождения ребенка после проведенной инвазивной диагностики»);
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)"»;
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 декабря 2012 г. № 1273н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при привычном невынашивании беременности»;
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7 ноября 2012 г. № 588н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при гипоксии плода, недостаточном росте плода, других плацентарных нарушениях»;
- ▶ Приказ Минздрава России от 20.12.2012 № 1237н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи детям при гемофилии А, гемофилии В, болезни Виллебранда, редких геморрагических коагулопатиях и тромбоцитопатиях, протромботических состояниях, плановая первичная диагностика»;
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 833н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре (обострение, рецидив)»;
- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. № 1605н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при кистозном фиброзе (муковисцидозе)»;

- ▶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 декабря 2012 г. № 1206н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при кистозном фиброзе»;
- ▶ Приказ Минздрава России от 09.11.2012 № 737н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при классической фенилкетонурии»;
- ▶ Письмо МЗ РФ 27 ноября 2002 г. № 2510/11891-02-32 «Профилактика тромбозмболии легочной артерии в акушерской практике»;
- ▶ Письмо МЗ РФ от 11 апреля 2003 г. № 2510/3797-03-32 «Современные технологии в сохранении и восстановлении репродуктивной функции»;
- ▶ «Национальные медицинские критерии приемлемости методов контрацепции», адаптированный документ «Медицинские критерии приемлемости использования методов контрацепции ВОЗ», 4 изд., 2012;
- ▶ Антитромботическая терапия у больных со стабильными проявлениями атеротромбоза. Клинические рекомендации ВНОК, 2009;
- ▶ Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозмболических осложнений, 2015;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком молочной железы. Общероссийский союз общественных объединений «Ассоциация онкологов России», 2014;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком яичников, маточной трубы или первичным раком брюшины. Общероссийский союз общественных объединений «Ассоциация онкологов России», 2014;
- ▶ Клинические рекомендации РООМ по профилактике РМЖ, дифференциальной диагностике, лечению предопухолевых и доброкачественных заболеваний молочных желез, 2015;
- ▶ Рекомендации по органосохраняющему лечению рака молочной железы, РООМ, 2015;
- ▶ Клинические рекомендации РООМ по скринингу РМЖ, 2015;
- ▶ Рекомендации РООМ по диагностике и лечению наследственного РМЖ, 2014;
- ▶ Рак молочной железы и беременность. Клинические рекомендации РООМ, 2015;
- ▶ Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком ободочной кишки. РООМ, 2015;
- ▶ Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей, 2014;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по ведению детей с эндокринными заболеваниями, 2014;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению анкилозирующего спондилита (болезнь Бехтерева), 2013;

- ▶ Клинические рекомендации для педиатров. Детская ревматология. Ювенильный артрит, 2013;
- ▶ Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С, 2014;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с кистозным фиброзом (муковисцидозом), 2015;
- ▶ Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по ведению детей с эндокринными заболеваниями, 2014.

В целом диагностика наследственных и врожденных заболеваний регламентирована Приказом Минздрава России от 15.11.2012 № 917н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями», ответственными за проведение диагностических мероприятий являются врачи-генетики медико-генетических консультаций (центров).

В случае оценки рисков развития мультифакторных заболеваний основная ответственность ложится на врача-терапевта (врач-терапевт участковый, врач общей практики (семейный врач), врач-педиатр, врач-педиатр участковый) при осуществлении профилактики неинфекционных заболеваний и при проведении мероприятий по формированию здорового образа жизни, что определено Приказом Министерства здравоохранения РФ от 30 сентября 2015 г. № 683н «Об утверждении Порядка организации и осуществления профилактики неинфекционных заболеваний и проведения мероприятий по формированию здорового образа жизни в медицинских организациях».

Отдельным направлением является выявление генетических факторов индивидуальной чувствительности пациента к лекарственным средствам. Данное направление находится в зоне ответственности клинических фармакологов в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 22 ноября 2010 г. № 1022н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи населению по профилю "Клиническая фармакология"».

ВНИМАНИЕ! С 1 января 2018 г. вступил в силу Приказ МЗ РФ от 13 октября 2017 г. № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг», который кардинальным образом изменил статус молекулярно-биологических методов исследования. В соответствии со Списком А (разделы: 26 – микробиологические исследования основных возбудителей инфекционных заболеваний; 27 – генетические исследования), качественные и количественные ПЦР-исследования, генотипирование ряда вирусов и (в меньшей степени) генотипирование человека являются неотъемлемой составляющей лабораторной диагностики.

8.2. Определение ГМИ в пищевых продуктах

Генетически модифицированными источниками (ГМИ) пищи считаются генетически модифицированные растения и животные, а также микроорганизмы.

Данное направление регулируется международными и российскими нормативно-методическими документами.

Международное регулирование:

- ▶ Директива 90/219/ЕЕС от 23.04.1990 «Об ограниченном использовании генетически модифицированных микроорганизмов»;
- ▶ Регламент (ЕС) № 1829/2003 Европейского парламента и Совета ЕС о генетически модифицированных продуктах питания и кормах (в редакциях 2006 г. (№ 1981/2006) и 2008 г. (№ 298/2008));
- ▶ Ст. 6 Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 15.06.2012 № 34 «О принятии технического регламента Таможенного союза "О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания"»;
- ▶ Двустороннее Соглашение между Россией и США о вступлении России в ВТО от 19.11.2006;
- ▶ Решение Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 № 229 «О применении санитарных мер в Таможенном союзе»;
- ▶ Решение Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 881 «О принятии технического регламента Таможенного союза "Пищевая продукция в части ее маркировки"»;
- ▶ Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022\2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки»;
- ▶ Методические рекомендации Европейского отделения ВОЗ «Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Количественный ПЦР-анализ на наличие ГМО».

В РФ действуют следующие нормативные акты, касающиеся регулирования в сфере ГМО:

- ▶ Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (№ 86-ФЗ от 05.07.1996);
- ▶ Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (№ 52-ФЗ от 30.03.1999);
- ▶ Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (№ 29-ФЗ от 02.01.2000);
- ▶ Федеральный закон «О защите прав потребителей» (№ 2300-1 от 07.02.1992);
- ▶ Указ Президента РФ от 30 января 2010 г. № 120 «Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации»;
- ▶ Указ Президента РФ от 7 июля 2011 г. № 899 «Об утверждении приоритетных

направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и перечня критических технологий Российской Федерации»;

- ▶ Постановление Правительства РФ от 14 июля 2012 г. № 717 «О Государственной программе развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы»;
- ▶ Распоряжение Правительства РФ от 25 октября 2010 г. № 1873-р «Об утверждении Основ государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года»;
- ▶ Распоряжение Правительства РФ от 3 декабря 2012 г. № 2237-р «Об утверждении Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы»;
- ▶ Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утверждена Правительством Российской Федерации № 1853п-П8 от 24.04.2012;
- ▶ Постановление Правительства Российской Федерации № 839 от 23.09.2013 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы»;
- ▶ Постановление Правительства Российской Федерации № 548 от 16.06.2014 «О внесении изменения в постановление Правительства Российской Федерации от 23 сентября 2013 г. № 839»;
- ▶ Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 23 августа 2017 г. № 435 «О создании межведомственной рабочей группы по взаимодействию Россельхознадзора, Роспотребнадзора и ФТС России при осуществлении ими соответствующих видов государственного контроля (надзора) при ввозе на территорию Российской Федерации сельскохозяйственной продукции растительного происхождения, полученной с применением генно-инженерно-модифицированных организмов или содержащей такие организмы, не прошедшей государственную регистрацию в Российской Федерации, и ее переработке на специальных портовых терминалах Калининградской области без выпуска в свободное обращение на территории Таможенного союза с условием направления готовой продукции на экспорт»;
- ▶ Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 22 января 2016 г. № 22 «Об утверждении Правил осуществления мониторинга ветеринарной безопасности территории Российской Федерации»;
- ▶ МУ 2.3.2.2306-07 «Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения»;
- ▶ МУК 4.2.2304-07 «Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения»;

- ▶ СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» от 14 ноября 2001 г. № 36;
- ▶ МУК 4.2.1903-04 «Продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа»;
- ▶ МУ 2.3.2.1917-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из / или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги»;
- ▶ МУК 4.2.3105-13 «Порядок и методы идентификации и количественного определения в пищевых продуктах ГМО, полученных с использованием новых биотехнологий»;
- ▶ ГОСТ Р 52173-2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения»;
- ▶ ГОСТ Р 52174-2003 «Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа»;
- ▶ ГОСТ Р 53214-2008 (ИСО 24276:2006) «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения»;
- ▶ ГОСТ Р 53244-2008 (ИСО 21570:2005) «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот»;
- ▶ Методические указания МУК 2.3.2.1830-04 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов»;
- ▶ Методические указания 4.2.2305-07 «Определение генетически модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генетически модифицированные аналоги, в пищевых продуктах методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией»;
- ▶ Методические указания МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».

Письмо от 24 января 2006 г. №0100/446-06-32 Министерства здравоохранения и социального развития РФ и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека «Об этикетировании пищевых продуктов, содержащих ГМО» информирует о количественных нормах ГМО, подлежащих этикетированию и обязательному информированию потребителей:

- согласно Директиве Европейского Парламента и Совета (ЕС) от 22.09.2003 № 1829/2003 о генетически модифицированной пище и кормах этикетированию подлежит вся пищевая продукция при содержании компонентов ГМО более 0,9 %;
- в соответствии с заключением ГУ НИИ питания РАМН содержание в пищевых продуктах 0,9 % и менее компонентов, полученных с применением ГМО, является случайной или технически неустранимой примесью и пищевые продукты, содержащие указанное количество компонентов ГМО, не относятся к категории пищевых продуктов, содержащих компоненты, полученные с применением ГМО, и не подлежат этикетированию;
- корма, произведенные без использования ГМО-компонентов, могут содержать незарегистрированных линий 0,5 % и менее, зарегистрированных линий 0,9 % и менее каждого ГМО-компонента;
- корма, произведенные с использованием ГМО-компонентов, могут содержать незарегистрированных линий 0,5 % и менее каждого ГМО-компонента.

С 1 июля 2015 г. вступил в силу (для добровольного применения) национальный стандарт ГОСТ Р ИСО 21571–2014 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот» (идентичен международному стандарту ИСО 21571:2005).

Новый ГОСТ устанавливает общие требования и специфические методы выделения, очистки и количественной оценки дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и распространяется на пищевые продукты, а также может быть применен к другим продуктам, например семенам и кормам.

Стандарт рекомендован к применению совместно с ИСО 21569, ИСО 21570 в части аналитических методов на основе нуклеиновых кислот (в частности качественных аналитических методов, установленных в ИСО 21569, и количественных аналитических методов, установленных в ИСО 21570).

Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31.12.2004 № 13 «Об усилении надзора за пищевыми продуктами, полученными из ГМИ» определены головные центры по количественному определению ГМО в продуктах питания в федеральных округах Российской Федерации, в функции которых входит укомплектование необходимым оборудованием, обучение специалистов методам и проведению исследований по количественному содержанию ГМО в пищевых продуктах на территории соответствующего федерального округа Российской Федерации (рис. 24).

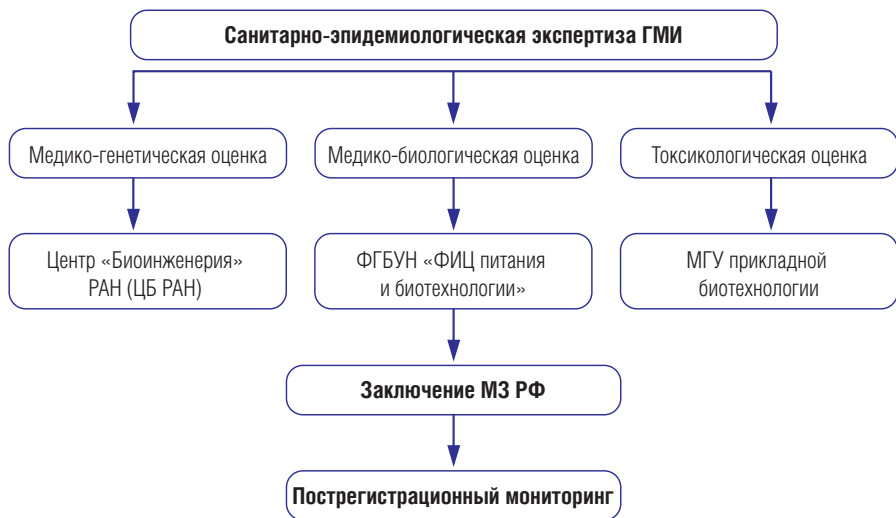


Рис. 24. Структура головных учреждений санитарно-эпидемиологической экспертизы ГМИ

Кроме того, в РФ введен порядок проведения экспертизы продукции из ГМИ (рис. 25).

Согласно сообщению Г. Г. Онищенко на заседании Президиума Российской академии наук «Генно-инженерно-модифицированные организмы: оценка безопасности, обеспечение контроля и глобальные риски» от 27 января 2015 г., в соответствии с действующей в России системой оценки безопасности ГМО растительного происхождения, 21 линия ГМО прошла полный цикл медико-биологических исследований за период с 1999 по 2015 г. (в экспериментах было использовано более 17 000 лабораторных животных, проведено более 160 000 анализов) и разрешена для использования в питании населения Российской Федерации.



Рис. 25. Экспертиза продукции из генетически модифицированных источников

В соответствии с Реестром продукции, прошедшей государственную регистрацию (<http://fp.crc.ru/gosregfr/>), в Российской Федерации разрешено использовать в питании населения следующие линии ГМО:

- ▶ соя (линии):
 - A2704-12 («Авентис КропСайнс», устойчивость к глюфосинату аммония);
 - A5547-127 («Авентис КропСайнс», устойчивость к глюфосинату аммония);
 - CV127 («BASF», устойчивость к гербициду imidazolinone);
 - GTS 40-3-2 («Монсанто», устойчивость к глифосату);
 - MON89788 («Монсанто», устойчивость к глифосату);
- ▶ картофель:
 - сорт Russet Burbank Newleaf («Монсанто», устойчивость к колорадскому жуку, 2000–2007);
 - сорт Superior Newleaf («Монсанто», устойчивость к колорадскому жуку, 2000–2008);
 - «Елизавета+ 2904/1 kgs», «Луговской+ 1210 атк» (Центр «Биоинженерия» РАН, Россия; Сгу-токсины и метаболизм антибиотиков неомицин и канамицин);

- ▶ кукуруза:
 - линия 3272 («Сингента»);
 - линия Vt11 («Сингента Сидс», устойчивость к зерновому точильщику и глюфосинату аммония);
 - линия GA 21 («Монсанто», устойчивость к глифосату);
 - линия MIR 162 («Сингента»);
 - линия MIR 604 («Сингента»);
 - линия MON 810 («Монсанто», устойчивость к стеблевому мотыльку);
 - линия MON 863 («Монсанто», устойчивость к диабротике);
 - линия MON 88017 («Монсанто»);
 - линия NK-603 («Монсанто», устойчивость к глифосату);
 - линия T-25 («Авентис КропСайнс», устойчивость к глюфосинату аммония);
- ▶ рис:
 - линия LL 62 («Баер КропСайнс», устойчивость к глюфосинату аммония);
- ▶ сахарная свекла:
 - линия H7-1 («Монсанто», устойчивость к глифосату);
 - линия 77 («Сингента Сидс» и «Монсанто», устойчивость к глифосату, 2001–2006).

Перечень генетических линий, зарегистрированных в Россельхознадзоре с 2003 г. (внесены в Государственный реестр кормов, полученных из ГМО):

- линия 40-3-2 (RR соя, устойчивая к глифосату), свидетельство о государственной регистрации № КГМ-А1-1.3/0001, 2003 г. (фирма Monsanto Co, США);
- линия A2704-12 (соя, устойчивая к глюфосинату аммония), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-2.7/0067, 2007 г. (фирма Bayer CropScience GmbH, Германия);
- линия A5547-127 (соя, устойчивая к глюфосинату аммония), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-2.7/0068, 2007 г. (фирма Bayer CropScience GmbH, Германия);
- линия MON 89788 (соя, устойчивая к глифосату), свидетельство о государственной регистрации № КГМ-А1-1.0/0133, 2010 г. (фирма Monsanto Co, США).

Линии генетически модифицированной кукурузы, зарегистрированные в Россельхознадзоре:

- линия MON863 (кукуруза, устойчивая к диабротике), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-3.3/0015, 2003 г. (фирма Monsanto Co, США);
- линия MON810 (кукуруза, устойчивая к стеблевому мотыльку), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-3.3/0014, 2003 г. (фирма Monsanto Co, США);
- линия NK603 (кукуруза, устойчивая к глифосату), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-3.3/0013, 2003 г. (фирма Monsanto Co, США);
- линия GA21 (кукуруза, устойчивая к глифосату), свидетельство о государствен-

- венной регистрации КГМ-А1-2.7/0069, 2003 г. (фирма Monsanto Co, фирма Syngenta Crop Protection AG, Швейцария);
- линия T25 (кукуруза, устойчивая к действию гербицида глюфосинат аммония), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-1.6/0048, 2003 г. (фирма Bayer CropScience GmbH, Германия);
 - линия Bt11 (кукуруза, устойчивая к глюфосинату аммония и стеблевому мотыльку), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-1.6/0049, 2003 г. (фирма Syngenta Crop Protection AG, Швейцария);
 - линия MON88017 (кукуруза, устойчивая к диабротике и глифосату), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-2.8/0095, 2008 г. (фирма Monsanto Co, США);
 - линия MIR604 (кукуруза, устойчивая к диабротике), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-1.8/0082, 2008 г. (фирма Syngenta Crop Protection AG, Швейцария);
 - линия 3272 (кукуруза, синтезирующая фермент альфа-амилазу), свидетельство о государственной регистрации № КГМ-А1-3.0/140, 2008 г. (фирма Syngenta Crop Protection AG, Швейцария);
 - линия MIR162 (устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям), свидетельство о государственной регистрации КГМ-А1-2.8/0151, 2012 г. (фирма Syngenta Crop Protection AG, Швейцария).

Лаборатории, которые уполномочены Россельхознадзором провести в рамках государственного ветеринарного надзора лабораторные исследования импортных кормов и кормовых добавок для животных, ввозимых на территорию Российской Федерации, на наличие ГМО (согласно письму Россельхознадзора от 23 апреля 2012 г.), должны использовать следующую систему оценки безопасности кормов и кормовых добавок, полученных из ГМО (рис. 26).

Согласно сообщению Г. Г. Онищенко «Генно-инженерно-модифицированные организмы: оценка безопасности, обеспечение контроля и глобальные риски» от 27 января 2015 г., следует принять во внимание, что в настоящее время существует определенный риск потери контроля за ГМО растительного происхождения, связанный с появлением на мировом продовольственном рынке ГМО 2-го поколения, которые не содержат регуляторные последовательности (промотор 35S и терминатор NOS), на их выявлении основана стратегия контроля за ГМО, применяемая в Российской Федерации.

Для обнаружения и идентификации таких ГМО необходима, во-первых, информация о последовательности нуклеотидов, характерной для конкретного трансформационного события (такая информация не всегда находится в открытом доступе в сети Интернет), во-вторых – наличие стандартного образца конкретной линии ГМ растения (стандартные образцы состава и свойств производят только The Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Европейский Союз и The American Oil Chemists' Society (AOCS, США), для многих линий ГМО стандартные образцы не созданы).

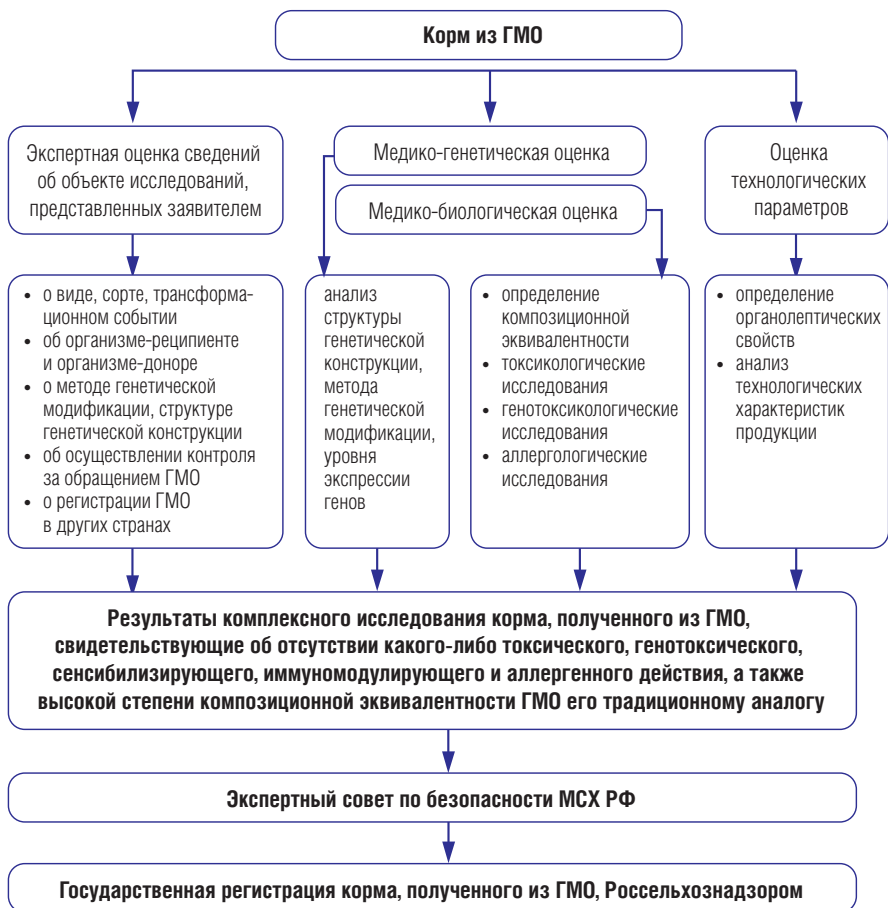


Рис. 26. Система оценки безопасности кормов и кормовых добавок, полученных из ГМО

В целом порядок легализации новых ГМО определен Приказом Министерства сельского хозяйства РФ от 26 июля 2017 г. № 366 «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору по предоставлению государственной услуги по государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства кормов и кормовых добавок для животных, генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения, а также кормов и кормовых добавок для животных, полученных с применением генно-инженерно-модифицированных организмов или содержащих такие организмы», после чего зарегистрированные ГМО попадают в сводный государственный Реестр (Приказ Минздрава России от 05.07.2016 № 476н «Об утвер-

ждении Порядка ведения сводного государственного реестра генно-инженерно-модифицированных организмов, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, и Порядка внесения информации в сводный государственный реестр генно-инженерно-модифицированных организмов, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы»).

8.3. ПЦР в ветеринарии и растениеводстве

Основные нормативно-методические акты, регламентирующие деятельность в области ветеринарии и растениеводства, сформированы Министерством сельского хозяйства РФ. В первую очередь это касается создания и определения функционала *Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору* (Россельхознадзор).

В соответствии с Постановлением Правительства РФ от 30 июня 2004 г. № 327 (с изменениями на 30 января 2017 г.) «Об утверждении Положения о Федеральной службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору» и Приказом Россельхознадзора от 14 сентября 2016 г. № 663 «О регламенте Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору», данная служба является федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим функции по контролю и надзору в сфере ветеринарии, обращения лекарственных средств для ветеринарного применения, карантина и защиты растений, безопасного обращения с пестицидами и агрохимикатами, обеспечения плодородия почв, обеспечения качества и безопасности зерна, крупы, комбикормов и компонентов для их производства, побочных продуктов переработки зерна, земельных отношений (в части, касающейся земель сельскохозяйственного назначения), функции по защите населения от болезней, общих для человека и животных. Служба осуществляет государственный надзор в области семеноводства в отношении семян сельскохозяйственных растений.

Кроме того, Положениями статьи 7 Федерального закона от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ (ред. от 3 июля 2016 г.) «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» установлено, что контроль за ввозом на территорию Российской Федерации генно-инженерно-модифицированных организмов и семян в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации осуществляется уполномоченным Правительством Российской Федерации федеральным органом исполнительной власти. Постановлением Правительства Российской Федерации от 30 января 2017 г. № 103 «О внесении изменения в Положение о Федеральной службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору» *Россельхознадзор наделен полномочиями по осуществлению контроля за ввозом на территорию Российской Федерации генно-инженерно-модифицированных организмов и семян в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации.*

В связи с этим деятельность Россельхознадзора регламентируется нормативными актами Таможенного союза и федеральными законами, среди них:

- ▶ Решение Комиссии Таможенного союза от 18 июня 2010 г. № 317;
- ▶ Технический регламент Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880 (ТР ТС 021/2011);
- ▶ Технический регламент Таможенного союза «О безопасности зерна» 015/2011, утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 874, (ТР ТС 015/2011);
- ▶ Решение Комиссии Таможенного союза от 23 сентября 2011 г. № 810 «Об изъятии в применении ветеринарных мер в отношении товаров, включенных в Единый перечень товаров, подлежащих ветеринарному контролю (надзору)»;
- ▶ Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (с изменениями и дополнениями от 3 июля 2016 г.);
- ▶ Федеральный закон от 17 декабря 1997 г. № 149-ФЗ «О семеноводстве» (с изменениями на 3 июля 2016 года);
- ▶ Федеральный закон от 3 июля 2016 г. № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности»;
- ▶ Закон Российской Федерации от 7 февраля 1992 г. № 2300-1 «О защите прав потребителей»;
- ▶ Федеральный закон от 10.01.2002 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

Основные нормативно-правовые документы в области регулирования деятельности Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору включают (<http://www.rsn-msk.ru/Dokumenty/> и <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/class/20/65>):

- ▶ **международное законодательство:**
 - карантин растений;
 - надзор за качеством и безопасностью зерна и продуктов его переработки.
- ▶ **федеральное законодательство:**
 - ветнадзор;
 - карантин растений;
 - надзор за качеством и безопасностью зерна и продуктов его переработки;
 - надзор за безопасным обращением с пестицидами и агрохимикатами;
 - семенной контроль;
 - земельный надзор.
- ▶ **законодательство субъектов Российской Федерации:**
 - земельный надзор.
- ▶ **нормативные акты Россельхознадзора:**

- ветнадзор;
- карантин растений;
- надзор за качеством и безопасностью зерна и продуктов его переработки;
- надзор за безопасным обращением с пестицидами и агрохимикатами;
- семенной контроль;
- земельный надзор.

► **нормативные акты региональных управлений.**

8.3.1. ПЦР в области фитосанитарного контроля

Федеральный закон от 21 июля 2014 г. № 206-ФЗ «О карантине растений» определяет меры и порядок действий по обеспечению охраны растений и территории Российской Федерации от проникновения на нее и распространения по ней карантинных объектов, по предотвращению ущерба от распространения карантинных объектов.

Карантинный объект – вредный организм, отсутствующий или ограниченно распространенный на территории Российской Федерации и внесенный в *единый перечень карантинных объектов*.

Единый перечень карантинных объектов утвержден Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 158 «Об утверждении единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза» и на сегодняшний день включает 182 объекта: насекомые и клещи, нематоды, грибы, бактерии и фитоплазмы, вирусы и виоиды, растения (<https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71523912/>).

Согласно Постановлению Правительства РФ от 16 февраля 2017 года № 201 «Об утверждении перечня лабораторных исследований в области карантина растений», в базовый перечень лабораторных методов включены: бактериологическое, вирусологическое, гельминтологическое и энтомологическое исследования в зависимости от вида подкарантинной продукции. Но поскольку РФ вступила в ВТО, то необходимо руководствоваться и Соглашением ВТО по применению санитарных и фитосанитарных мер.

В связи с этим в практику Службы фитосанитарного надзора РФ внедрены Международные стандарты по фитосанитарным мерам (МСФМ), которые подготавливаются Секретариатом Международной конвенции по карантину и защите растений в качестве части всемирной программы политики и технической помощи Организации по продовольствию и сельскому хозяйству ООН в отношении карантина растений.

На сегодняшний день перечень МСФМ включает:

- МСФМ № 1 «Фитосанитарные принципы карантина и защиты растений и применение фитосанитарных мер в международной торговле»;
- МСФМ № 2 «Структура анализа фитосанитарного риска»;
- МСФМ № 3 «Руководство по экспорту, перевозке, импорту и выпуску агентов биологической борьбы и других полезных организмов»;
- МСФМ № 4 «Требования по установлению свободных зон»;

- МСФМ № 5 «Глоссарий фитосанитарных терминов»;
- МСФМ № 6 «Руководство по надзору»;
- МСФМ № 7 «Система сертификации на экспорт»;
- МСФМ № 8 «Определение статуса вредного организма в зоне»;
- МСФМ № 9 «Руководство по программам ликвидации вредных организмов»;
- МСФМ № 10 «Требования по установлению свободных мест и участков производства»;
- МСФМ № 12 «Руководство по фитосанитарным сертификатам»;
- МСФМ № 15 «Руководство по регулированию древесных упаковочных материалов в международной торговле»;
- МСФМ № 16 «Регулируемые некарантинные вредные организмы: концепция и применение»;
- МСФМ № 17 «Оповещение о вредных организмах»;
- МСФМ № 18 «Руководство по использованию облучения в качестве фитосанитарной меры»;
- МСФМ № 19 «Руководство по перечням регулируемых вредных организмов»;
- МСФМ № 20 «Руководство по фитосанитарной системе регламентации импорта»;
- МСФМ № 22 «Требования по установлению зон с низкой численностью вредных организмов»;
- МСФМ № 23 «Руководство по досмотру»;
- МСФМ № 24 «Руководство по установлению и признанию эквивалентности фитосанитарных мер»;
- МСФМ № 25 «Транзитные грузы»;
- МСФМ № 26 «Установление зон, свободных от плодовых мух»;
- МСФМ № 27 «Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов»;
- МСФМ № 29 «Признание свободных зон и зон с низкой численностью вредных организмов».

В 2013 году на 8-й сессии Комиссии по фитосанитарным мерам был принят русский текст Международного стандарта **МСФМ 27. 2006. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов** (ISPM 27). Настоящий стандарт предоставляет руководство по структуре и содержанию Международной конвенции по карантину и защите растений (МККЗР) в отношении диагностических протоколов для регулируемых вредных организмов. Эти протоколы описывают процедуры и методы официальной диагностики регулируемых вредных организмов, которые имеют значение для международной торговли, и определяют минимальные требования для надежной диагностики регулируемых вредных организмов. Протоколы МСФМ обязательны к исполнению учреждениями Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору.

В соответствии с МСФМ 27 для генетической идентификации вредного организма

(карантинного объекта) должен быть использован метод ПЦР. На сегодняшний день сформированы 24 диагностические протокола (табл. 10).

Таблица 10. Диагностические протоколы МСФМ 27

| Номер диагностического протокола (ISPM) | Название диагностического протокола (DP) | Наличие принятого текста на русском языке | Дата публикации версии |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|
| ISPM 27 | Diagnostic protocols for regulated pests (Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов) | ✓ | 14.01.2016 |
| ISPM 27 Annex 01 (2010) | DP 01: Thrips palmi Karny | ✓ | 14.01.2016 |
| ISPM 27 Annex 02 (2012) | DP 02: Plum pox virus | ✓ | 14.01.2016 |
| ISPM 27 Annex 03 (2012) | DP 03: Trogoderma granarium Everts | ✓ | 14.01.2016 |
| ISPM 27 Annex 04 (2014) | DP 04: Tilletia Indica Mitra | ✓ | 14.01.2016 |
| ISPM 27 Annex 05 (2014) | DP 05: Phyllosticta citricarpa (McAlpine) Aa on fruit | ✓ | 02.06.2016 |
| ISPM 27 Annex 06 (2014) | DP 06: Xanthomonas citri subsp. citri | ✓ | 02.06.2016 |
| ISPM 27 Annex 07 (2016) | DP 07: Potato spindle tuber viroid | ✓ | 22.05.2017 |
| ISPM 27 Annex 08 (2015) | DP 08: Ditylenchus dipsaci and Ditylenchus destructor | ✓ | 28.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 09 (2015) | DP 09: Genus Anastrepha Schiner | ✓ | 28.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 10 (2016) | DP 10: Bursaphelenchus xylophilus | ✓ | 18.04.2016 |
| ISPM 27 Annex 11 (2016) | DP 11: Xiphinema americanum sensu lato | ✓ | 24.05.2016 |
| ISPM 27 Annex 12 (2016) | DP 12: Phytoplasmas | ✓ | 18.04.2016 |
| ISPM 27 Annex 13 (2016) | DP 13: Erwinia amylovora | ✓ | 01.11.2016 |
| ISPM 27 Annex 14 (2016) | DP 14: Xanthomonas fragariae | ✓ | 23.01.2017 |
| ISPM 27 Annex 15 (2016) | DP 15: Citrus tristeza virus | ✓ | 30.01.2017 |
| ISPM 27 Annex 16 (2016) | DP 16: Genus Liriomyza | ✓ | 30.01.2017 |
| ISPM 27 Annex 17 (2016) | DP 17: Aphelenchoides besseyi, A. fragariae and A. ritzemabosi | – | 01.11.2016 |
| ISPM 27 Annex 18 (2017) | DP 18: Anguina spp. | – | 03.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 19 (2017) | DP 19: Sorghum halepense | – | 03.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 20 (2017) | DP 20: Dendroctonus ponderosae | – | 04.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 21 (2017) | DP 21: Candidatus Liberibacter solanacearum | – | 03.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 22 (2017) | DP 22: Fusarium circinatum | – | 12.04.2017 |
| ISPM 27 Annex 23 (2017) | DP 23: Phytophthora ramorum | – | 06.10.2017 |
| ISPM 27 Annex 24 (2017) | DP 24: Tomato spotted wilt virus, Impatiens necrotic spot virus and Watermelon silver mottle virus | – | 16.10.2017 |

Кроме того, специалисты ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» и «ФГБУН Институт биорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» сформировали следующие Методические рекомендации и Методические указания (<http://www.agrodiagnostica.ru/docsandinstructions/direction/>):

- ▶ для специалистов-фитопатологов и агрономов, занимающихся выращиванием овощей в условиях закрытого грунта:
 - «Диагностика основных фитопатогенов огурца и томата при выращивании в закрытом грунте методом полимеразной цепной реакции в формате FLASH с использованием диагностических наборов производства ООО "АгроДиагностика"»;
 - «Диагностика основных патогенов картофеля методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО "АгроДиагностика"»;
- ▶ для специалистов лабораторий, аккредитованных национальным органом по аккредитации на право проведения лабораторных исследований в области карантина растений в соответствии с законодательством Российской Федерации – «Диагностика ряда карантинных фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО "АгроДиагностика"»;
- ▶ для специалистов-фитопатологов, агрономов и специалистов, занимающихся выращиванием зерновых культур, хранением зерна и мониторингом зерна и продуктов его переработки на наличие микотоксинов и их продуцентов – «Диагностика токсигенных возбудителей фузариоза зерна методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов с использованием наборов производства ООО "АгроДиагностика"».

Данные рекомендации могут быть использованы учреждениями, не относящимися к Службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору, но в случае обнаружения карантинного объекта информирование надзорного органа обязательно с последующим проведением подтверждающего анализа в соответствии с Международными стандартами по фитосанитарным мерам. Рекомендации могут быть использованы и самими надзорными органами с учетом обязательного подтверждающего тестирования по МСФМ.

ВНИМАНИЕ! Требования к организации лабораторий, осуществляющих фитосанитарный надзор, в целом и ПЦР-лабораторий в частности определены в следующих документах:

- Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2016 № 41 «Об утверждении Порядка лабораторного обеспечения карантинных фитосанитарных мер»;
- Приказ Минсельхоза РФ от 23 июня 2008 г. № 271 «Об утверждении Типовых требований к оборудованию и техническому оснащению зданий, помещений и сооружений, необходимых для организации карантинного фитосанитарного контроля, осуществляемого в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации»;
- «Общее положение о карантинной фитосанитарной экспертизе», 2009 (Россельхознадзор);
- ISO 17025: 2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
- Стандарт ЕОКЗР РМ 7/84 (1) «Базовые требования к управлению качеством в лабораториях по диагностике вредных организмов растений»;
- Стандарт ЕОКЗР РМ 7/76 (1) «Применение диагностических протоколов ЕОКЗР»;
- Стандарт ЕОКЗР РМ 7/77 (1) «Документирование и составление отчетов по диагностике»;
- Стандарт ЕОКЗР РМ 3/64 (1) «Намеренный ввоз организмов, являющихся вредными организмами растений или потенциально вредными организмами растений».

8.3.2. ПЦР в ветеринарии

В соответствии с Законом РФ от 14 мая 1993 г. № 4979-1 «О ветеринарии» основными задачами ветеринарии в Российской Федерации являются: реализация мероприятий по предупреждению и ликвидации заразных и иных болезней животных, включая сельскохозяйственных, домашних, зоопарковых и других животных, пушных зверей, птиц, рыб и пчел, и осуществление региональных планов ветеринарного обслуживания животноводства.

Надзорные функции исполняет Служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (http://www.rsn-msk.ru/Dokumenty/Federalnoe_zakonodatelstvo_vetnadzor/ и <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/class/3>).

В соответствии с Решением Комиссии Таможенного союза от 18 июня 2010 г. № 317 «О применении ветеринарно-санитарных мер в Евразийском экономическом союзе» (с изменениями на 30 мая 2017 года), Решением Совета Евразийской эконо-

мической комиссии от 9 октября 2014 г. № 94 «О Положении о едином порядке проведения совместных проверок объектов и отбора проб товаров (продукции), подлежащих ветеринарному контролю (надзору)» и Приказом Минсельхоза РФ от 10 сентября 2008 года № 425 «Об утверждении правил организации государственного ветеринарного надзора за ввозом кормов» (с изменениями на 5 мая 2010 г.) сформирован *Единый перечень товаров*, подлежащих ветеринарному контролю (надзору), а также *перечень ветеринарных требований* к каждому подконтрольному товару (животные и продукция животного происхождения, включенные в Единый перечень товаров).

Кроме того, Служба осуществляет внутренний ветеринарный надзор, который направлен на профилактику заразных и массовых незаразных болезней животных и обеспечение безопасности продуктов животноводства в ветеринарном отношении путем предупреждения, обнаружения и пресечения нарушений ветеринарного законодательства Российской Федерации. На сегодняшний день в соответствии с Приказом Минсельхоза России от 09.03.2011 № 62 (ред. от 15.02.2017) «Об утверждении Перечня заразных и иных болезней животных» Перечень включает 107 заболеваний, по 75 из которых может быть установлен карантин (Приказ от 19 декабря 2011 г. № 476 «Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)»), при этом часть этих заболеваний относится к категории «Заразные болезни, общие для человека и животных».

В отношении последних сформированы требования к комплексу профилактических, противозооэпидемических и противозoonических мероприятий, которые подлежат реализации силами санитарно-эпидемиологического сектора службы Роспотребнадзора и ветеринарной службы Россельхознадзора (СП 3.1.084-96, ВП 13.3.4.1100-96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Общие положения»). Основные заболевания данной группы:

- ▶ геморрагическая лихорадка с почечным синдромом,
- ▶ клещевой энцефалит,
- ▶ туляремия,
- ▶ бешенство,
- ▶ коксиеллез (лихорадка Ку),
- ▶ иерсиниозы,
- ▶ орнитоз,
- ▶ лептоспироз,
- ▶ сибирская язва,
- ▶ листериоз,
- ▶ кампилобактериоз,
- ▶ сальмонеллез,
- ▶ бруцеллез.

Таким образом, формируются два основных нормативно-правовых поля: международное законодательство в области ветеринарии с учетом участия России в ВТО и ветеринарное законодательство Российской Федерации.

С точки зрения гармонизации ветеринарно-санитарных норм на международном уровне ежегодно публикуются Кодексы здоровья наземных животных и водных животных Всемирной организации здоровья животных (МЭБ – Международное эпизоотическое бюро) (http://web.oie.int/RR-Europe/eng/Code/2016_CODE_TERRESTRE_RUSSE_VOL1.pdf.)

Соглашением о применении санитарных и фитосанитарных мер (Соглашение СФС) Всемирной торговой организации (ВТО) на МЭБ официально возложены обязанности по разработке международных референтных стандартов и рекомендаций в области здоровья животных и антропозоонозов. Согласно Соглашению СФС, члены ВТО обязаны адаптировать национальные требования к импорту к соответствующим рекомендациям, содержащимся в стандартах МЭБ. Если же соответствующих рекомендаций не существует или страна устанавливает более строгие требования, она должна обосновать их посредством научной оценки рисков при импорте. Таким образом, Наземный кодекс является одной из составляющих свода регламентирующих правил международной торговли ВТО.

В Наземном кодексе установлены стандарты в целях улучшения здоровья и благополучия животных и ветеринарного здоровья населения в мире, обеспечения ветеринарно-санитарной безопасности международной торговли наземными животными (млекопитающими, рептилиями, птицами и пчелами) и животноводческой продукцией. Данные стандарты приняты к исполнению Службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору.

Наземный кодекс (изд. 24, 2015) определяет перечень рекомендованных и альтернативных тестов для диагностики списочных болезней МЭБ (табл. 11).

Таблица 11. Рекомендованные и альтернативные тесты для диагностики списочных болезней МЭБ

| Глава Кодекса | Глава Руководства | Болезнь | Рекомендуемые тесты | Альтернативные тесты |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| СПИСОЧНЫЕ БОЛЕЗНИ МЭБ | | | | |
| Болезни животных разных видов | | | | |
| 8.2. | 2.1.2. | Болезнь Ауески | ELISA, VIN | – |
| 8.3. | 2.1.3. | Блютанг | Agent id., ELISA, PCR, VN | AGID |
| 8.8. | 2.1.5. | Ящур | ELISA, VN | CF |
| 8.9. | 2.1.6. | Гидроперикардит | – | ELISA, IFA |
| | 2.1.9. | Лептоспироз | – | MAT |
| 8.11. | 2.1.10. | Миаз <i>Cochliomyia hominivorax</i> и Миаз <i>Chrysomya bezziana</i> | – | Agent id. |

| Глава Кодекса | Глава Руководства | Болезнь | Рекомендуемые тесты | Альтернативные тесты |
|-----------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 8.12. | 2.1.11. | Паратуберкулез | – | DTH, ELISA |
| 8.13. | 2.1.13. | Бешенство | ELISA, VN | – |
| 8.14. | 2.1.14. | Лихорадка долины Рифт | VN | ELISA, VN |
| 8.15. | 2.1.15. | Чума КРС | – | VN |
| 8.16. | 2.1.16. | Трихинеллез | Agent id. | ELISA |
| 8.17. | 2.1.18. | Туляремия | – | Agent id. |
| | 2.1.19. | Везикулярный стоматит | CF, ELISA, VN | – |
| Bovidae | | | | |
| 11.1. | 2.4.1. | Анаплазмоз КРС | – | CF, Agg card |
| 11.2. | 2.4.2. | Бабезиоз КРС | PCR | ELISA, CF, IFA |
| | 2.4.3. | Бруцеллез КРС | BBAT, CF, ELISA, FPA | – |
| 11.3. | 2.4.5. | Кампилобактериоз КРС | Agent id. | – |
| 11.5. | 2.4.7. | Туберкулез КРС | туберкулинизация | тест гамма интерферона |
| 11.7. | 2.4.9. | Инфекционная плевропневмония КРС | CF, ELISA | – |
| 11.8. | 2.4.11. | Энзоотический лейкоз КРС | AGID, ELISA | PCR |
| 11.9. | 2.4.12. | Геморрагическая септицемия | – | Agent id. |
| 11.10. | 2.4.13. | Инфекционный ринотрахеит / инфекционный пустулезный вульвовагинит КРС | Agent id. (только семя), VN, ELISA, PCR | – |
| 11.11. | 2.4.14. | Заразный узелковый дерматит | – | VN |
| 11.12. | 2.4.16. | Тейлериоз | Agent id., IFA | – |
| 11.13. | 2.4.17. | Трихомоноз | Agent id. | мукоагглютинация |
| Caprinae | | | | |
| | 2.7.2. | Бруцеллез овец и коз (не вызываемый <i>Brucella ovis</i>) | BBAT, CF, ELISA, FPA | опыт на Brucellin |
| 14.1. | 2.7.3. | Артрит / энцефалит коз | AGID, ELISA | – |
| 14.5. | 2.7.4. | Висна-Меди | AGID, ELISA | – |
| 14.3. | 2.7.6. | Инфекционная плевропневмония коз | – | – |
| 14.4. | 2.7.7. | Энзоотический аборт овец | – | CF |
| 14.6. | 2.7.9. | Эпидидимит (<i>Brucella ovis</i>) | CF | ELISA |
| 14.7. | 2.7.11. | Чума мелких жвачных | VN | ELISA |
| 14.9. | 2.7.14. | Оспа овец и коз | – | VN |
| Equidae | | | | |
| 12.1. | 2.5.1. | Чума лошадей | CF, ELISA | Agent id. (PC в режиме реального времени), VN |
| 12.2. | 2.5.2. | Инфекционный метрит лошадей | Agent id. | – |
| 12.3. | 2.5.3. | Случная болезнь | CF | IFA, ELISA |
| 12.4. | 2.5.5. | Западный и восточный инфекционный энцефаломиелит | – | HI, CF, PRN |
| 12.5. | 2.5.6. | Инфекционная анемия лошадей | AGID | ELISA |
| 12.6. | 2.5.7. | Грипп лошадей | – | HI |

| Глава Кодекса | Глава Руководства | Болезнь | Рекомендуемые тесты | Альтернативные тесты |
|------------------|-------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|
| 12.7. | 2.5.8. | Пироплазмоз лошадей | ELISA, IFA | CF |
| 12.8. | 2.5.9. | Ринопневмония лошадей | – | VN |
| 12.9. | 2.5.10. | Вирусный артериит лошадей | Agent id. (только семя), VN | – |
| 12.10. | 2.5.11. | Сap | CF | – |
| 12.11. | 2.5.13. | Венесуэльский энцефалит лошадей | – | HI, CF, PRN |
| Suidae | | | | |
| 15.1. | 2.8.1. | Африканская чума свиней | ELISA | IFA |
| 15.2. | 2.8.3. | Классическая чума свиней | ELISA, FAVN, NPLA | – |
| | 2.8.5. | Бруцеллез свиней | BBAT, CF, ELISA, FPA | – |
| | 2.8.9. | Везикулярная болезнь свиней | VN | ELISA |
| 15.3. | 2.8.11. | Трансмиссивный гастроэнтерит | – | ELISA, VN |
| Aves | | | | |
| 10.2. | 2.3.2. | Инфекционный бронхит птиц | – | ELISA, HI, VN |
| 10.3. | 2.3.3. | Инфекционный ларинготрахеит птиц | – | AGID, ELISA, VN |
| 10.4. | 2.3.4. | Грипп птиц | выделение вируса с помощью теста на патогенность | AGID, HI |
| 10.5. | 2.3.5. | Микоплазмоз (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>) | – | Agg, HI |
| 10.7. | 2.3.11. | Пуллороз птиц | – | Agent id., Agg. |
| 10.8. | 2.3.12. | Инфекционный бурсит | – | AGID, ELISA |
| | 2.3.13. | Болезнь Марека | – | AGID |
| 10.9. | 2.3.14. | Болезнь Ньюкасла | выделение вируса | HI |
| Leporidae | | | | |
| 13.1. | 2.6.1. | Миксоматоз | – | AGID, CF, IFA |
| 13.2. | 2.6.2. | Геморрагическая болезнь кроликов | – | ELISA, HI |

Сокращения

Agent id – идентификация патогенного возбудителя

Agg. – реакция агглютинации

VN – реакция вируснейтрализации

ELISA – иммуноабсорбционный ферментный анализ

AGID – иммунодиффузия в агаровом геле

FAVN – реакция нейтрализации вируса флуоресцентными антителами

FPA – метод флуоресцентной поляризации

NPLA – анализ связанной пероксидазы

BBAT – тест с забуференным антигеном Brucella

DTH – гиперчувствительность замедленного типа

PRN – нейтрализация возбудителя вируса чумы

IFA – непрямая иммунофлуоресценция антител

CF – реакция связывания комплемента

HI – ингибирование гемагглютинации

MAT – реакция микроагглютинации

PCR – полимеразная цепная реакция

«—» – рекомендуемый тест отсутствует

Внутреннее регулирование лабораторной ветдиagnostики основано на Санитарных и Ветеринарных правилах, Методических рекомендациях и указаниях по конкретным заболеваниям или группам инфекционных заболеваний. В перечень методов идентификации возбудителя часто входит ПЦР-анализ (например, при диагностике лейкоза КРС, лабораторной диагностике гриппа А птиц, выявлении Шмалленберг-вируса и т. д.).

В связи с этим актуальным становится вопрос о правилах организации ПЦР-лаборатории ветеринарной службы. На сегодняшний день специальных рекомендаций по данному вопросу не сформировано, статус действующих документов имеют:

- ▶ Приказ Минсельхоза России от 5 ноября 2008 г. № 490 «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований в области ветеринарии»;
- ▶ РД-АПК 1.10.07.03-14 Методические рекомендации по технологическому проектированию ветеринарных объектов для городских поселений и других муниципальных образований;
- ▶ НТП-АПК 1.10.07.002-02 Министерства сельского хозяйства РФ «Нормы технологического проектирования ветеринарных объектов для городов и иных населенных пунктов», 2002.

Исходя из универсальности метода ПЦР, могут быть рекомендованы правила организации ПЦР-лабораторий (с точки зрения зонирования и движения биоматериала), определенные в МУ1.3.2569-09.1.3, но с учетом рекомендаций по проектированию ветеринарных объектов.

8.4. ПЦР в судебно-медицинской экспертизе

Базовыми технологиями геномного идентификационного анализа, применяемыми в судебно-медицинской экспертной практике, являются:

- ▶ анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ДНК;
- ▶ анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК.

Особенностью ПДРФ-анализа является использование специфических эндонуклеаз – *рестриктаз*. Анализ проводится в несколько этапов:

- 1) выделение ДНК из образца;
- 2) амплификация выделенной ДНК;
- 3) рестрикция ДНК;
- 4) анализ фрагментов ДНК методом гель-электрофореза.

Рестриктазы – группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот. Обладают *эндонуклеазной* активностью, то есть расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнает определенный участок ДНК длиной от четырех пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его.

Рестриктазы расщепляют ДНК на специфических участках, обычно в *палиндромных последовательностях* (последовательность ДНК, состоящая из смежных инвертированных повторов, одинаково считывающихся и в левом направлении одной цепи, и в правом направлении другой цепи. Например, первая цепь: 5'-GAATTC-3', комплементарная цепь: 3'CTTAAG-5'). Когда одно из оснований в такой последовательности изменяется в результате мутации, этот участок перестает расщепляться рестриктазами. В то же время мутации могут приводить к образованию новых участков, чувствительных к рестриктазе. В результате соответствующие фрагменты ДНК, полученной от двух *генетически неидентичных* индивидов, часто образуют рестрикционные фрагменты различной длины. Это явление носит название *полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК*.

Основополагающим нормативно-правовым документом в области производства судебно-медицинской экспертизы является Приказ Минздравсоцразвития России от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинской экспертизы в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации», который регламентирует порядок производства генетической экспертизы методом ПЦР и организацию ПЦР-лаборатории.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Молекулярно-биологические методы выявления вирусов герпеса в стандартах оказания медицинской помощи

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>Герпесвирусы</i> | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1557н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при воспалении вульвы и влагалища» | Отделяемое из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Отделяемое из цервикального канала на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.010 A26.20.011 |
| | | Влагалищное отделяемое на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | A26.20.013 |
| | | Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.014 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1511н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией)» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. № 1585н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при дифтерии средней степени тяжести (распространенная и комбинированная формы)» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1436н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при дифтерии легкой степени тяжести (локализованной)» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1536н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при вирусном энцефалите, ммелите» | Спинномозговая жидкость на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Спинномозговая жидкость на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Спинномозговая жидкость на вирус Эпштейна-Барр (virus Epstein-Barr) Спинномозговая жидкость на вирус ветрянки (Varicella Zoster) | A26.23.008 A26.23.009 A26.23.010 A26.23.011 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1512н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1416н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при цитомегаловирусной болезни тяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Слюна на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Моча на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 A26.07.007 A26.28.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1373н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при цитомегаловирусной болезни средней степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Слюна на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Моча на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 A26.07.007 A26.28.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1664н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при других циститах» | Влагалищное отделяемое на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.013 A26.20.014 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1502н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при воспалительных заболеваниях половых органов» | Отделяемое из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Отделяемое из цервикального канала на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.010 A26.20.011 |
| | Приказ Минздрава России от 24 декабря 2012 № 1361н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при стрептококковой септицемии» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 декабря 2012 г. № 1130н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при коклюше тяжелой степени тяжести»</p> <p>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 декабря 2012 г. № 1128н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при хронических вирусных гепатитах (в дневном стационаре)»</p> <p>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 878н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при вирусной инфекции неуточненной локализации легкой степени тяжести»</p> <p>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 876н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при хронических герпесвирусных инфекциях»</p> | <p>Слюна на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr Virus)</p> <p>Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr Virus)</p> <p>Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Слюна на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Отделяемое конъюнктивы на вирус простого герпеса (Herpes simplex virus)</p> <p>Моча на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> <p>Отделяемое конъюнктивы на вирус простого герпеса (Herpes simplex virus)</p> <p>Соскоб с роговицы на вирус простого герпеса (Herpes simplex virus)</p> <p>Отделяемое конъюнктивы на вирус ветрянки (Varicella Zoster)</p> <p>Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus)</p> | <p>A26.07.007</p> <p>A26.05.017</p> <p>A26.05.011</p> <p>A26.05.017</p> <p>A26.07.007</p> <p>A26.26.012</p> <p>A26.28.009</p> <p>A26.05.017</p> <p>A26.26.012</p> <p>A26.26.015</p> <p>A26.26.016</p> <p>A26.05.017</p> |
| | <p>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 875н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при вирусном конъюнктивите средней степени тяжести»</p> <p>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 779н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при серозном менингите средней степени тяжести»</p> | | |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1450н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при острых респираторных заболеваниях тяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1684н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при фимозе, баланопостите, баланите, язве и лейкоплакии полового члена и других воспалительных заболеваниях полового члена» | Отделяемое из уретры на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | A26.21.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1664н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при других циститах» | Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.014 |
| | Отделяемое из уретры на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | Отделяемое из уретры на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | A26.21.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1423н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи детям при сальпингите и оофорите» | Отделяемое из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Отделяемое из цервикального канала на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.010 A26.20.011 |
| | Влагалищное отделяемое на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | Влагалищное отделяемое на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | A26.20.013 |
| | Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.014 |
| | Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | Влагалищное отделяемое на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.20.014 |
| | Приказ Минздравоохранения РФ от 10.04.2006 № 265 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с женским бесплодием маточного происхождения и с женским бесплодием, связанным с отсутствием овуляции» | Отделяемое из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | A26.20.010 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1521н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при многоплодной беременности» | Отделяемое из цервикального канала на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Отделяемое из цервикального канала на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Влагалищное отделяемое на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) | A26.20.010 A26.20.011 A26.20.013 |
| | Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 13 марта 2006 г. №148 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным при бактериальном сепсисе новорожденного» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Минздравсоцразвития РФ от 13.03.2006 № 146 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с врожденной пневмонией» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 803н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при менингеальной форме клещевого вирусного энцефалита тяжелой степени тяжести» | Спинномозговая жидкость на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Спинномозговая жидкость на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.23.008 A26.23.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 802н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при инфекционном мононуклеозе тяжелой степени тяжести» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Спинномозговая жидкость на вирус простого герпеса 1, 2 (Herpes simplex virus 1, 2) Спинномозговая жидкость на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Спинномозговая жидкость на вирус Эпштейна-Барр (virus Epstein-Barr) | A26.05.017 A26.05.011 A26.23.008 A26.23.009 A26.23.010 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 801н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при инфекционном мононуклеозе средней степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Слюна на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Моча на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 A26.07.007 A26.28.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 года № 796н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при инфекционном мононуклеозе легкой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Моча на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 A26.28.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 786н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите В» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) Моча на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 A26.28.009 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 769н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при краснухе тяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 764н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при инфекции, вызванной вирусом простого герпеса, средней степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 747н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите А тяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|
| | Приказ Минздрава России от 09.11.2012 № 733н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С средней степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7 ноября 2012 г. № 685н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при хроническом вирусном гепатите С» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Минздрава России от 09.11.2012 № 826н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при остром вирусном гепатите С легкой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Минздрава России от 07.11.2012 № 682н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите В среднетяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Минздрава России от 07.11.2012 № 681н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите В легкой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | Приказ Минздрава России от 07.11.2012 № 680н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите А среднетяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| | | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |
| Приказ Минздрава России от 07.11.2012 № 678н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром вирусном гепатите С тяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 | |

| Возбудитель | Стандарты оказания медицинской помощи | Рекомендованный биоматериал | Код медицинской услуги |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1754н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи детям при лимфобластной неходжажинской лимфоме (группа высокого риска)» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Минздрава России от 29.12.2012 № 1753н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи детям при лимфобластной неходжажинской лимфоме (группа среднего риска)» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2012 г. № 1738н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи детям при лимфобластной неходжажинской лимфоме (группа стандартного риска)» | Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.017 |
| | Приказ Минздрава России от 09.11.2012 № 822н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при анкилозирующем спондилите, псориатическом артрите, других спондилоартритах (поддерживающая терапия в дневном стационаре)» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7 ноября 2012 г. № 657н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при острой респираторной вирусной инфекции тяжелой степени тяжести» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) Кровь на цитомегаловирус (Cytomegalovirus) | A26.05.011 A26.05.017 |
| | Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1505н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при остром тонзиллите» | Кровь на вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) | A26.05.011 |

ПУТЬ К УСПЕХУ



1993

Выпуск первого прибора «Терцик» – родоначальника серии оборудования для ПЦР-анализа, абсолютно оригинальная отечественная разработка, не имеющая аналогов в мире. «Терцик» стал самым массовым прибором – произведено около 5000 шт.



2001

FLASH: в новый век – с новой технологией! Появление «Джина», прорыв ПЦР-диагностики из науки в практическую медицину.



2007

Начало эры ПЦР в реальном времени, разработка и производство первого российского прибора для количественных исследований.



2008

Выпуск «Фемофлора®» – самой ожидаемой новинки в диагностике заболеваний репродуктивного тракта женщин.



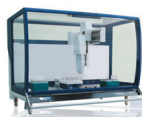
2009

Запуск в г. Протвино собственного завода компании по выпуску оборудования для ПЦР-диагностики. Выход компании на международные рынки.



2010

Инновационные разработки компании в области генетики активного долголетия: профилактика болезней вместо лечения заболеваний.



2012

Автоматизация – главный тренд современной медицины. Выпуск первых российских автоматизированных комплексов для проведения ПЦР-анализа.



GMP-стандарт для выпуска IVD-продукции – торжественное открытие производственной площадки в «Технопарке Слава».

Победитель
национальной
медицинской премии
«Призвание 2014»



Технология «Фемофлор®»



Выпуск наборов «Андрофлор®» для обследования мужчин, новые возможности для решения репродуктивных проблем.

Победитель
Prix Galien Russia
2016 в номинации
«Лучший российский продукт»



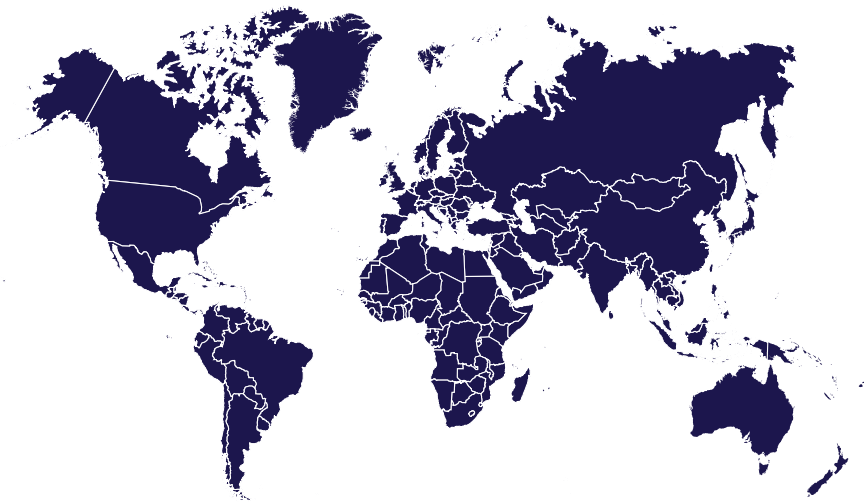
«Фемофлор®» + «ИммуноКвантэкс»



В плане – выведение на рынок целого спектра высокотехнологичных новинок для ПЦР-диагностики.

ГЕОГРАФИЯ

Мы работаем в 46 стран мира и более чем 300 городах России.



- Австралия
- Азербайджан
- Армения
- Алжир
- Белоруссия
- Болгария
- Бразилия
- Венгрия
- Великобритания
- Вьетнам
- Германия
- Греция
- Грузия
- Египет
- Иран
- Индия
- Испания
- Индонезия
- Италия
- Казахстан
- Киргизия
- Китай
- Корея
- Латвия
- Ливан
- Македония
- Малайзия
- Марокко
- Молдова
- Монголия
- Нигерия
- ОАЭ
- Пакистан
- Палестина
- Приднестровье
- Россия
- Румыния
- Сербия
- Сирия
- Таджикистан
- Тайланд
- Турция
- Узбекистан
- Украина
- Уругвай
- Франция

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день метод ПЦР имеет огромное научное и прикладное значение: с его помощью были реализованы масштабные исследования в области медицины и биологии, был совершен прорыв в диагностике широкого спектра инфекционных и генетических заболеваний, онкопатологий.

Накопленная информация позволила сформировать принципиально новый персонализированный подход к комплексному обследованию пациента и определить альтернативные варианты терапии с учетом особенностей его генотипа и популяционной принадлежности.

Итак, с момента возникновения идеи многократного увеличения числа копий искомой молекулы ДНК прошло сравнительно немного времени, тем не менее технология ПЦР совершила гигантский рывок и стала неотъемлемой частью рутинной лабораторной практики, продолжая при этом совершенствоваться и развиваться.



Составитель: ведущий специалист ООО «ДНК-Технология»
к. б. н. Зорина Виктория Владимировна.

Коллектив Компании «ДНК-Технология» благодарит вас за сотрудничество и желает приятной работы!

Группа компаний «ДНК-Технология» с 1993 года осуществляет разработку, производство и внедрение высокотехнологичного оборудования и реагентов для проведения исследований методом полимеразной цепной реакции.

Коллектив компании объединяет ведущих специалистов в области молекулярной биологии, иммуногенетики, медицины, термодинамики, оптики, электроники, программирования, что обуславливает высокий научно-технический потенциал компании, обеспечивает высокие стандарты качества и контроля производства на всех его стадиях.

Производственная база компании «ДНК-Технологии» отвечает всем современным требованиям, предъявляемым к компаниям, которые осуществляют деятельность по производству медицинской техники. Об этом свидетельствуют: лицензия, выданная Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития; сертификат, удостоверяющий, что система менеджмента качества применительно к производству изделий медицинской техники и реагентов для лабораторной диагностики соответствует требованиям ГОСТ ISO 9001 – 2001 (9001:2000), и сертификаты менеджмента качества (ISO 13485:2016 и 9001:2015).



ВЕРСИЯ 083-4.



КОНТАКТЫ ОФИСА:

ООО «ДНК-Технология». Адрес: г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125Ж, корп. 6.
Тел./факс: +7 (495) 640-17-71. www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru

СЛУЖБА КЛИЕНТСКОЙ ПОДДЕРЖКИ:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный), hotline@dna-technology.ru