

ПРОБЛЕМА ДНК(РНК)-КОНТАМИНАЦИИ В ЛАБОРАТОРИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДИАГНОСТИКИ COVID-19 МЕТОДОМ ПЦР

А.С. Волынкина, Рязанова А.Г., Русанова Д.В., А.Н. Куличенко

Введение

COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019) – острая респираторная инфекция, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV), ассоциированная с высоким уровнем летальности среди лиц старшей возрастной группы и с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой, эндокринной систем, хроническими респираторными и онкологическими заболеваниями. Первые случаи COVID-19 зарегистрированы в г. Ухань провинции Хубэй Китайской Народной Республики в декабре 2019 г. в дальнейшем инфекция в короткий срок распространилась по всему миру и приобрела характер пандемии [1-2]. По состоянию на 06 декабря 2020 г. в мире зарегистрировано более 67,2 млн. случаев новой коронавирусной инфекции, в России – более 2,4 млн. случаев.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 относится к роду *Betacoronavirus*, подроду *Sarbecovirus*. Геном вируса представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности, включает один линейный сегмент размером около 30000 нуклеотидных оснований, кодирующий гены четырех структурных белков (S, E, M и N) и две протяженные открытые рамки считывания (ORF1a и ORF1b), кодирующие гены шестнадцати неструктурных белков, включая РНК-зависимую РНК полимеразу [3-6].

Коронавирус SARS-CoV-2 генетически близок к коронавирусам SARS-CoV и MERS-CoV (возбудителями SARS и MERS), процент сходства нуклеотидной последовательности составляет 79 и 50 % соответственно [5-7]. В связи со способностью к широкому распространению среди населения и возможностью вызывать заболевание человека различной степени тяжести, коронавирус SARS-CoV-2 предварительно отнесен ко II группе патогенности, в соответствии с классификацией биологических агентов, вызывающих болезни человека, принятой в Российской Федерации.

Лабораторная диагностика – важная составляющая часть комплекса мероприятий, направленных на борьбу с распространением COVID-19. Массовое тестирование населения на наличие РНК нового коронавируса SARS-CoV-2 необходимо для своевременного выявления больных новой коронавирусной инфекцией среди людей с симптомами ОРВИ и пневмонии, обследования контактных, активного выявления бессимптомных носителей вируса. Получение достоверных результатов лабораторных исследований на COVID-19 в короткие сроки имеет существенное значение для повышения эффективности мероприятий, направленных на предупреждение распространения инфекции.

Диагностика COVID-19, основанная на детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале человека методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР или ОТ-ПЦР), получила наиболее широкое распространение.

ОТ-ПЦР – высокочувствительный тест, широко применяющийся для лабораторной диагностики вирусных инфекций, является «золотым стандартом» для специфической лабораторной диагностики COVID-19 [8-12]. В то же время, при проведении

исследований клинического материала методом ПЦР на наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2 в начале пандемии COVID-19, лабораторная служба в России и зарубежных странах столкнулась с проблемами точности диагностики, получением ложноотрицательных, ложноположительных и сомнительных результатов [13-14].

Ошибочные результаты ПЦР могут быть связаны с неправильным отбором клинических образцов, нарушениями температурного режима при хранении и передаче образцов в лабораторию. Качество выделенного препарата РНК также влияет на точность результата ПЦР. Так, деградация образцов РНК, а также наличие ингибиторов ОТ-ПЦР в реакционной смеси могут привести к ложноотрицательным результатам [15-16]. Перекрестное загрязнение образцов (контаминация) в процессе отбора, при проведении выделения РНК, внесения проб в реакционную смесь для ПЦР – основная причина ложноположительных результатов. В соответствии с данными, представленными в зарубежных публикациях, доля ложноположительных результатов при проведении исследований клинического материала методом ПЦР на наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2 составляет 0,8-4,0 % [17-20].

Последствия ошибок лабораторной диагностики всегда значительны, однако, в период пандемии COVID-19 при массовых обследованиях их негативное влияние на эффективность работы систем здравоохранения и эпидемиологического надзора существенно усиливается. Ложноотрицательные результаты являются фактором способствующим несвоевременной изоляции носителей вируса и введения ограничительных мер.

Негативное влияние ложноположительных результатов заключается в получении некорректных (завышенных) данных об уровне заболеваемости COVID-19, безосновательной изоляции или госпитализации неинфицированных лиц, что увеличивает нагрузку на медицинский персонал и лабораторную службу [21-22].

Контаминация нуклеиновыми кислотами (НК) – одна из проблем, возникающая при выполнении ПЦР-исследований, приводящая к ложноположительным результатам тестирования, связанная с высокой чувствительностью метода и особенностями методики постановки анализа. Проведение массового обследования населения на COVID-19 в период пандемии способствовало резкому увеличению нагрузки на лаборатории, выполняющие ПЦР. Поступление и накопление в лаборатории большого количества образцов клинического материала, увеличение объемов медицинских отходов, в т.ч. содержащих продукты амплификации – основные причины, повышающие риск возникновения контаминации.

Цель работы – анализ причин возникновения контаминации в лабораториях, выполняющих исследования клинического материала на наличие РНК нового коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в период пандемии COVID-19.

Основными источниками контаминации, приводящей к возникновению ложноположительных результатов, являются продукты ПЦР (ДНК-ампликоны), исследуемые пробы, содержащие целевую РНК (нативный материал, выделенная РНК/кДНК), а также положительные контрольные образцы, представляющие собой препараты рекомбинантной ДНК/РНК со встроенным участком гена-мишени, детектируемого диагностической ПЦР-тест-системой.

Выделяют перекрестную контаминацию – механический занос целевой НК из одной пробирки в другую в процессе пробоподготовки, выделения НК, внесения пробы в

реакционную смесь, и тотальную контаминацию – загрязнение поверхностей и воздуха лаборатории ампликонами.

Причины возникновения контаминации в лаборатории при проведении лабораторной диагностики COVID-19 методом ПЦР

Выполнение большого объема диагностических исследований на основе ПЦР, что имеет место при массовом обследовании населения на COVID-19, характеризуются повышенным риском контаминации на всех этапах анализа.

Преаналитическая стадия лабораторного исследования является основным источником ошибок в лаборатории, в т.ч. при проведении ПЦР [15]. На стадии отбора материала причиной контаминации может являться нарушение техники отбора проб (в т.ч. использование нестерильных медицинских инструментов, загрязненных перчаток), приводящее к механическому заносу нативного материала, содержащего РНК вируса SARS-CoV-2, в другие пробы. Исследование смывов с поверхностей и проб воздуха в помещениях «красной зоны» инфекционных стационаров, осуществляющих лечение больных с COVID-19 в Китае, показало наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2 в образцах, отобранных в 56,7 % помещений [23-25].

На этапах первичной подготовки и обеззараживания образцов, выделения РНК, внесения проб РНК/кДНК и контрольных образцов в реакционную смесь для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР перекрестная контаминация возникает вследствие несоблюдения техники выполнения лабораторных манипуляций (ошибки пипетирования, касание одноразовым наконечником внутренних поверхностей пробирок, отсутствие смены перчаток при выполнении работ на разных этапах ПЦР и др.) [26];

Тотальная контаминация возникает при загрязнении рабочих зон лаборатории, оборудования и одежды сотрудников ампликонами, следами геномной РНК, попадающими в воздух лабораторных помещений, на лабораторную мебель и оборудование из пробирок и планшетов с продуктами ПЦР, с рук операторов и распространяющимися по всем рабочим зонам лаборатории. Наиболее частым источником тотальной контаминации являются случайно открывшиеся пробирки с продуктами ПЦР [26]. Другой причиной тотальной контаминации может являться процесс инактивации ампликонов путем автоклавирования (в случае нарушения целостности пакетов для автоклавирования) [27].

В зарубежных публикациях описана контаминация реактивов целевыми геномными последовательностями вируса SARS-CoV-2 в процессе производства диагностических наборов. Ряд лабораторий, выполняющих исследования на наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2, в странах Европы и США сообщили о контаминации изготовленных на заказ партиях праймеров и зондов геномными последовательностями нового коронавируса, что привело к ложноположительным результатам ПЦР. Специфическая флуоресценция отмечалась при проведении амплификации реакционных смесей без внесения матрицы и с внесением отрицательного контрольного образца. Степень загрязнения реакционных смесей в лабораториях существенно различалась, зарегистрированные значения порогового цикла (Ct) составляли от 23 до 39. Анализ потенциальных источников контаминации исключил возможность попадания целевой НК в реакционную смесь вследствие ошибок при проведении манипуляций в лаборатории. Контаминация реакционных смесей для проведения исследований методом ПЦР на

наличие РНК вируса SARS-CoV-2 привела к задержке получения результатов тестирования клинического материала на 2-14 дней [28].

Для обеспечения высокого уровня диагностической точности, настоятельно рекомендуется предварительно тестировать каждую партию диагностических наборов для ПЦР с использованием отрицательных контрольных образцов с целью исключения контаминации реакционных смесей [28].

Признаки контаминации в лаборатории при проведении диагностики COVID-19 методом ПЦР:

Анализ накопленного опыта по проведению диагностики COVID-19 методом ПЦР с использованием различных диагностических тест-систем (в т.ч.: Вектор-ПЦРrv-2019-nCov-RG (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), АмплиТест SARS-CoV-2 (ФГБУ «ЦСП» Минздрава России), АмплиСенс CoV-Bat-FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), COVID-19 Amp (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)) позволил выявить основные признаки контаминации в лаборатории, выполняющей ПЦР, и предложить тактику проведения дополнительных исследований для верификации полученных результатов при подозрении на контаминацию.

Основные признаки контаминации в лаборатории, выполняющей исследования методом ПЦР, и необходимые действия при возникновении ситуации:

1. Выявление положительного сигнала в отрицательном контрольном образце этапа выделения – свидетельствует о загрязнении исследуемых образцов целевой РНК или положительным нативным материалом, или положительным контрольным образцом на этапах первичной пробоподготовки, обеззараживания образцов или выделения РНК. Необходимо повторное исследование всех положительных образцов, начиная с этапа выделения РНК;

2. Выявление положительного сигнала в отрицательном контрольном образце этапа амплификации – свидетельствует о загрязнении реакционной смеси на этапе ее приготовления или внесения образцов в реакционную смесь для ПЦР. Необходимо повторное исследование всех положительных образцов, начиная с этапа постановки ПЦР;

3. Существенное увеличение (в 1,5-2 раза и более) доли положительных образцов, по сравнению с ожидаемой в обследуемой группе (регионе), в особенности числа проб с низкой нагрузкой целевой НК со значениями $C_t > 30$ – может свидетельствовать о кросс-контаминации на любом из этапов анализа. Необходимо выборочное повторное исследование положительных образцов, начиная с этапа выделения РНК, в т.ч. с использованием альтернативных ПЦР тест-систем (с праймерами на другие РНК-мишени) [2, 3];

4. Получение положительного результата для 90-100 % образцов, включая отрицательные контроли этапов выделения и амплификации, свидетельствует о загрязнении реакционной смеси для ПЦР целевой НК. Необходимо проведение повторного тестирования проб, начиная с этапа постановки ПЦР. Повторное получение положительного результата для всех исследуемых и контрольных образцов является признаком тотальной контаминации в лаборатории. Необходимо проведение полномасштабных деконтаминационных мероприятий [3]. В случае загрязнения рабочих зон лаборатории ампликонами, при отсутствии возможности остановить проведение

лабораторных исследований, необходимо тестировать образцы с помощью альтернативных ПЦР тест-систем.

5. Получение положительного результата при исследовании контрольных смывов, выполняемых в соответствии с действующими нормативными документами для контроля контаминации в лаборатории, выполняющей диагностические исследования методом ПЦР, – требует проведения дополнительных мероприятий по ликвидации контаминации.

Необходимо отметить, что в случае контаминации образцов нативным материалом на этапе первичной пробоподготовки образцов, повторное тестирование проб, в т.ч. с использованием альтернативных наборов реагентов, также покажет положительный результат. Предположить возникновение перекрестной контаминации образцов на этапе пробоподготовки можно в случае получения отрицательного ответа при исследовании образцов клинического материала от больного после повторного забора материала.

Мероприятия, направленные на недопущение возникновения контаминации в лаборатории и мероприятия по ликвидации последствий контаминации описаны в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Мероприятия, препятствующие возникновению контаминации в лаборатории, выполняющей ПЦР, в т.ч. при проведении диагностики COVID-19 включают:

- выделение отдельных рабочих зон для различных этапов анализа в лаборатории, в особенности, выделение отдельного помещения для проведения амплификации, автоклавирование продуктов амплификации в отдельной зоне;

- соблюдение поточности движения исследуемого материала и медицинских отходов, в т.ч. пробирок с ампликонами;

- обязательную постановку отрицательных контролей на этапах выделения и амплификации;

- строгое соблюдение порядка внутрилабораторного контроля качества (исследование смывов с лабораторных поверхностей и оборудования с целью контроля контаминации, выборочное повторное тестирование образцов).

- соблюдение техники пипетирования, использование одноразового стерильного пластикового расходного материала (наконечников для дозаторов, микропробирок), наконечников с фильтром на этапах работы с нативным материалом, РНК, кДНК, перчаток и отдельных комплектов защитной одежды в каждой рабочей зоне, обработка рук, правильное пипетирование жидкостей).

Мероприятия по ликвидации контаминации в лаборатории:

- расходный материал, реактивы, защитную одежду в контаминированной зоне утилизируют;

- проводят обработку рабочих и лабораторных поверхностей с использованием дез.средств (0,2 % ДП-2Т) или реактивов для разрушения ДНК (DNA-exitusplus (AppliChem) и аналогичные) с экспозицией 30 мин, по окончании которой остатки дезинфектанта тщательно удаляют смоченной в воде ветошью;

- проводят обеззараживание рабочих и лабораторных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 45 мин;
- вышеуказанные манипуляции по обработке повторяют дважды;
- исследуют смывы с лабораторных поверхностей и оборудования с целью контроля контаминации.

При соблюдении всех требований, указанных в МУ 1.3.2569-09, вероятность возникновения ДНК контаминации в лаборатории минимальна. Порядок проведения деконтаминационных мероприятий, описанный в МУ, позволяет в короткие сроки ликвидировать контаминацию.

Повышенный риск контаминации в лабораториях, выполняющих большое количество анализов на COVID-19, обуславливает необходимость постоянного контроля выполнения требований МУ1.3.2569-09.

Причины возникновения ложноположительных результатов ПЦР, не связанные с контаминацией

Ложноположительные результаты исследования при проведении ПЦР могут быть связаны не только с контаминацией проб (реактивов) и возникать вследствие образования неспецифических продуктов ПЦР или неспецифической флуоресценции реакционной смеси.

Вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР повышается на поздних циклах термоциклирования. Их появление может быть связано с завышенной концентрацией праймеров, возникающей вследствие неправильного приготовления смеси для ПЦР, ошибками в программировании прибора для проведения ПЦР в реальном времени. При учете результатов ПЦР для дифференциации положительного сигнала и образовании неспецифического продукта реакции необходимо оценивать форму кривой флуоресценции (кривая должна быть S-образная, со значением флуоресценции в стадии плато, сопоставимым со значением максимального уровня флуоресценции положительного контрольного образца).

Эффект неспецифической флуоресценции реакционной смеси связан с ошибками приготовления реакционной смеси (неправильное соотношения компонентов, приводящее к изменению концентрации праймеров) либо неправильным хранением ПЦР смеси до внесения проб (длительное хранение при комнатной температуре), приводящим к деградации зондов. Эффект неспецифической флуоресценции отличается от признаков контаминации одинаковым уровнем флуоресценции всех проб, что редко наблюдается при контаминации, т.к. маловероятно, что во все пробирки попадет одинаковое количество специфических ампликонов [27]. Для решения проблемы неспецифической флуоресценции необходимо соблюдать температурные условия хранения тест-систем, размораживать реактивы и готовить реакционную смесь непосредственно перед постановкой ПЦР.

Заключение

Проблема контаминации в лабораториях, выполняющих ПЦР, при диагностике COVID-19 обострилась в связи с необходимостью проведения большого объема исследований. Негативные последствия контаминации нуклеиновыми кислотами заключаются в получении ложноположительных ответов, необходимости останавливать

проведение лабораторных исследований на время проведения и контроля деконтаминационных мероприятий.

Для минимизации риска возникновения контаминации в условиях массового скрининга на COVID-19 следует строго соблюдать поточность движения исследуемого материала и медицинских отходов, в особенности пробирок, содержащих продукты ПЦР. Важную роль в предотвращении контаминации играет организация внутрिलाбораторного контроля качества, включающего обязательную постановку отрицательных контролей выделения и амплификации, проведение плановых контрольных исследований для выявления контаминации и строгий контроль выполнения таких мероприятий.

Для снижения вероятности появления ложноположительных результатов целесообразно проводить выборочное подтверждающее тестирование положительных проб с использованием альтернативных ПЦР тест-систем для выявления РНК SARS-CoV-2.

Действующие МУ 1.3.2569—09 подробно описывают требования к организации лабораторий, занимающихся молекулярно-генетическими и диагностическими исследованиями на основе ПЦР, а также требования к проведению работ с НК, направленные на предотвращение контаминации и ликвидацию ее последствий.