

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Giamarellou H., Antoniadou A. Antipseudomonal antibiotics. *Med. Clin. N. Am.* 2001; 85: 19–42.
- Evans M.E., Feola D.J., Rapp R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann. Pharmacother.* 1999; 33: 960–7.
- Barnett M., Bushby S.R., Wilkinson S. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br. J. Pharmacol.* 1964; 23: 552–74.
- Schwartz, B.S., Warren, M.R., Barkley, F.A. et al. Microbiological and pharmacological studies of colistin sulphate and sodium colistin methanesulfonate. *Antibiotics Annual.* 1960, 1959–1960; 7: 41–60.
- Li J., Turnidge J., Milne R., Nation R.L. et al. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 781–5.
- Jian Li, Robert W., Milnel R. et al. Simple Method for Assaying Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine Using High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3304–7.
- Jian Li, Kingsley Coulthard, Robert Milne et al. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 987–92.
- He H., Li J.C., Nation R.L., Jacob J., Chen G., Lee H.J. et al. Pharmacokinetics of four different brands of colistimethate and formed colistin in rats. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(10): 2311–7.
- Lee J., Han S., Jeon S., Hong T., Song W., Woo H. et al. Population Pharmacokinetic Analysis of Colistin in Burn Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(5): 2141–6.
- Imberti R., Cusato M., Accetta G., Marinò V., Procaccio F., Del Gaudio A. et al. Pharmacokinetics of Colistin in Cerebrospinal Fluid after Intraventricular Administration of Colistin Methanesulfonate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(8): 4416–21.
- Ly N.S., Yang J., Bulitta J.B., Tsuji B.T. Impact of Two-Component Regulatory Systems PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB on Colistin Pharmacodynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(6): 3453–6.
- Cooper T.W., Pass S.E., Brouse S.D., Hall R.G. Can Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles Be Applied to the Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter*? *Ann Pharmacother.* 2011; 45(2): 229–40.
- Bergen P.J., Li J., Rayner C.R. et al. Colistin methanesulfonate is an inactive pro-drug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1953–8.
- Gobin P., Lemaitre F., Marchand S. et al. Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(5): 1941–8.
- Dotsikas Y., Markopoulou C.K., Koundourellis J.E. et al. Validation of novel LC-MS/MS method for the quantitation of colistin A and B in human plasma. *J. Sep. Sci.* 2011; 34: 37–45.

Поступила 14.04.14

Received 14.04.14

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-078.33

Туполева Т.А., Тихомиров Д.С., Грумбкова Л.О., Игнатова Е.Н., Романова Т.Ю., Филатов Ф.П., Гаранжа Т.А.

КОНТАМИНАЦИЯ ПРИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯХ: ПРОБЛЕМЫ И РЕШЕНИЯ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава РФ, Москва

Целью исследования было определение факторов риска получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов при ПЦР-анализе клинического материала. Источником ложноположительных результатов могут быть образцы с высокой вирусной нагрузкой. Контаминация нуклеиновыми кислотами (НК) может произойти на любом участке ПЦР-исследования. На основании полученных данных мы установили, что наиболее чувствительным этапом является выделение и очистка НК, особенно если она проводится в ручном режиме. Если в одной постановке в подавляющем большинстве образцов детектируется положительный сигнал, это указывает на тотальную контаминацию. Но особую сложность представляют такие случаи, когда загрязненными оказываются лишь несколько образцов. Если в одной постановке присутствуют образец с высокой концентрацией вирусной НК и несколько проб с низкой концентрацией, следует провести их повторный анализ, начиная с этапа выделения НК. Обязательным этапом ПЦР-исследования в режиме реального времени является анализ кривых накопления продуктов амплификации: их формы и расположения на графике. Эти действия позволят исключить выдачу в клинические подразделения ложно отрицательных результатов тестирования. Все сделанные в работе выводы равноценны для ПЦР-тестирования любых НК-мишеней.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция; контаминация; вирус гепатита В; вирус гепатита С.

Для корреспонденции:

Туполева Татьяна Алексеевна, канд. мед. наук, зав. науч.-клин. отд. вирусологической диагностики

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

E-mail: ttupoleva@mail.ru

См продолжение на 39 стр.

Tupoleva T.A., Tikhomirov D.S., Grumbkova L.O., Ignatova E.N., Romanova T.Yu., Filatov F.P., Garanja T.A.

THE CONTAMINATION UNDER POLYMERASE CHAIN REACTION STUDIES: PROBLEMS AND SOLUTIONS

The hematologic research center of Minzdrav of Russia, Moscow

The study was carried out to determine risk factors of false positive and false negative results under polymerase chain reaction-analysis of clinical material. The samples with high viral load can be the source of false positive results. The contamination with nucleic acids can occur at any section of polymerase chain reaction analysis. The study data permitted to establish that the most sensitive stage is isolation and purification of nucleic acids especially under manual mode of operation. The detection of positive signal in most samples of one setting indicates total contamination. The cases when only several samples are polluted are special challenge. The presence of sample with high concentration of viral nucleic acid and several samples with low concentration in one setting means necessity of repeated analysis beginning with stage of isolation of nucleic acid. The analysis of curves of accumulation of products of amplification, their forms and positioning on chart is the obligatory stage of polymerase chain reaction study in real time regimen. These actions permit to exclude the readouts of false negative testing results to departments. The study conclusions are equipotent for polymerase chain reaction testing of any nucleic acid targets.

Key words: *polymerase chain reaction; contamination; virus; hepatitis B; hepatitis C.*

Введение. Понятие “контаминация” имеет несколько значений в зависимости от области применения. В медицине оно обозначает момент заражения, т. е. “внедрения в организм инфекта”, в психологии контаминация – это ложное воспроизведение информации, частей, принадлежащих к разным предметам. Для лабораторных работников, занимающихся полимеразной цепной реакцией (ПЦР), контаминация означает попадание в пробу микроорганизмов или ампликонов нуклеиновых кислот – НК (т.е. загрязнение) на преаналитическом или аналитическом этапе и как следствие ложноположительный результат исследования.

Первые публикации, посвященные ПЦР, появились в 1985 г. [7], а уже в 1988 г. Y. Лоу и соавт. [5] сообщили о ложноположительных результатах из-за контаминации ПЦР-смеси для детекции ДНК вируса гепатита В (ВГВ). По данным литературы, с 1990 по 2002 г. ложноположительные результаты, связанные с контаминацией, составили 2% (1,8–2,1%) [4]. Четыре многоцентровых исследования по контролю качества ПЦР-диагностики вирусов гепатита и микобактерий туберкулеза показали, что уровень ложноположительных результатов колеблется от 9 до 57% [3, 6, 8, 9].

В литературе имеются данные о причинах ложноположительных реакций и рекомендации по их устранению. Основное содержание этих рекомендаций – соблюдение правил работы в ПЦР-лабораториях. В настоящее время отсутствуют четкие критерии для оценки ложных результатов ПЦР-исследования.

Рассмотрим участки диагностического процесса, на которых возможно возникновение контаминации. Первым звеном является взятие исследуемого материала. На этом участке контаминация может произойти при использовании нестерильного инструментария, а также при попадании в образцы патогенов от инфицированного медицинского персонала. Качество забора исследуемого материала находится вне поля зрения работников диагностической лаборатории и остается на совести медицинских работников. С момента поступления пробы в лабораторию ответственность ложится на ее сотрудников. Начиная с этого момента можно анализировать качество выполнения всех этапов работы. Дальнейшее ПЦР-исследование проводится в 4 этапа: первичная обработка биологического материала, выделение НК, приготовление реакционных смесей и проведение ПЦР, детекция продуктов амплификации.

На первом этапе происходит регистрация и преаналитическая обработка клинического материала. Если загрязнение произошло на данном этапе, то при повторных исследованиях контаминированных образцов, даже начиная с преаналитического этапа, результаты будут позитивными. В этом случае выявление факта попадания инфекционного агента в соседние пробы представляется практически невозможным. На контаминацию подобного рода может указывать лишь несовпадение результатов лабораторных исследований последующих порций биопроб от больных, находящихся под динамическим наблюдением.

Если контаминация произошла на этапе выделения НК, то при повторном исследовании, начиная с преаналитического этапа, результат будет отрицательным. Подобный вид контаминации особенно актуален при ручном способе выделения НК. При автоматической очистке НК также существует вероятность загрязнения проб, например при сбоях пипетирования в анализаторе.

При использовании ПЦР в формате реального времени этапы приготовления реакционных смесей, проведения амплификации и детекции ее продуктов объединяются в один. На этих этапах загрязнения проб редки и связаны в основном с несоблюдением правил работы (например, отсутствие смены перчаток или обработки рабочего места после приготовления реакционных смесей и внесения образцов). В нашей лаборатории более чем за 14 лет работы на этих этапах контаминация ни разу не была выявлена.

Многолетний опыт работы лаборатории, выполняемой в соответствии с методическими рекомендациями, с соблюдением санитарных норм и указаний при работе с ПЦР [1, 2], позволил нам исключить контаминацию на этапах первичной обработки кинического материала, приготовления реакционных смесей, детекции продуктов амплификации. На этапе выделения НК невозможно исключить опасность загрязнения. Тотальную контаминацию распознать просто, так как все образцы в постановке (эксперименте), включая отрицательные контроли, будут положительны (табл. 1). Выявить контаминацию от пробы к пробе, когда загрязнены только несколько образцов, достаточно сложно. Оператору (лаборанту) следует обратить внимание на присутствие проб с высокой и низкой концентрацией мишени. Эти образцы не обязательно могут быть расположены в соседних пробирках.

Цель исследования – определить факторы риска получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов при ПЦР-анализе клинического материала.

Материалы и методы. Были исследованы 586 образцов биоматериалов на наличие НК вирусов гепатита В и С (ВГВ и ВГС): 520 образцов плазмы крови и 8 образцов костного мозга от 389 пациентов; 41 образец полупродуктов и препаратов свертывающих факторов; 17 биоптатов печени ($n = 9$) и селезенки ($n = 8$) от 9 больных.

Для выявления РНК ВГС и ДНК ВГВ использовали коммерческие наборы производства ООО “ИнтерЛабСервис”.

Амплификацию с гибридной флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили с помощью приборов Rotor-Gene-3000 и Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия).

Для подтверждения инфицирования больного ВГВ использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА). Определяли антитела к НВsAg и НВcAg ВГВ с помощью коммерческих наборов производства фирмы ЗАО “Вектор Бест”.

Результаты и обсуждение. В результате первичного тестирования биоматериалов на ДНК ВГВ и/или РНК ВГС нами были получены следующие результаты: 423 пробы не со-

Таблица 1

Протокол количественного исследования на ДНК ВГВ (тотальная контаминация)

№	Образцы	Пороговые циклы		Концентрации		Результат	
		ВКО	ВГВ	ВКО	ВГВ		
	Имя	СТ	СТ	копий	копий	МЕ/мл	статус
1	1249	25,42	32,26	556	2	< 150	Ок
2	1262	25,61	33,83	491	1	< 150	Ок
3	1264	25,39	15,95	567	119 653	2 010 000	Ок
4	1267	25,26		616		отр	Ок
5	1269	26,12	26,16	353	105	2810	Ок
6	1270	27,45	30,38	149	6	362	Сбой ВКО
7	1274	24,47	9,08	1028	13 672 624	126 000 000	Ок
8	1275	25,2	10,68	641	4 534 898	67 200 000	Ок
9	1284	25,24	28,07	624	28	426	Ок
10	1285	25,24	28,42	624	22	335	Ок
11	1294	24,95	24,56	753	315	3980	Ок
12	1297	25,05	19,55	706	9989	134 000	Ок
13	1298	24,91	28,76	773	17	214	Ок
14	ПКО	25,1	26,17	684	104	1440	Ок
15	ОКО	24,69	28,14	891	27		ОКО Сбой!
16	КВ1	19,54	18,22				Калибр
17	КВ2	29,14	27,23				Калибр

Примечание. ВКО – внутренний контрольный образец; ПКО – положительный контрольный образец выделения; ОКО – отрицательный контрольный образец выделения; КВ1 и КВ2 – калибраторы амплификации (25 000 и 50 МЕ/мл соответственно). Здесь и в табл. 4 и 5: отр – отрицательный результат, пол – положительный.

держали ДНК ВГВ и 432 не содержали РНК ВГС. В 61 образце от 33 больных была выявлена ДНК ВГВ. В 78 пробах от 70 больных обнаружена РНК ВГС. Для всех положительных образцов, кроме биоптатов печени и селезенки, были измерены концентрации вирусных НК. Биопсийный материал не был включен в это исследование, поскольку, согласно инструкции к тест-наборам, концентрация нормализуется на 1 мл образца. Все образцы с низкой концентрацией ДНК ВГВ тестировали на анти-НВс и анти-НВс.

Согласно рекомендациям Минздрава РФ (2013), концентрация ДНК ВГВ менее или равная 104 МЕ/мл считается низкой. В исследованных нами биоматериалах концентрация ДНК ВГВ варьировала от 150 МЕ/мл до более чем 108 МЕ/мл (т. е. весь линейный диапазон использованного теста). Преобладало количество образцов с низкой вирусной нагрузкой,

оно составило 64,8% от общего числа позитивных проб, с высокой вирусной нагрузкой было 35,2% образцов (табл. 2).

Пробы с высокой вирусной нагрузкой ВГВ распределились следующим образом: большинство образцов (13%) содержало от 105 до 106 МЕ/мл ДНК ВГВ, в 7% образцов этот параметр был более 108 МЕ/мл.

Все образцы с концентрацией ДНК ВГВ более 103 МЕ/мл подтвердились при повторном исследовании. Образцы с концентрацией ДНК ВГВ менее 103 МЕ/мл (7 образцов: 1 – 400 МЕ/мл, 1 – 250 МЕ/мл, 5 – менее 150 МЕ/мл), напротив, при повторном исследовании оказались негативны. В пробах этих пациентов отсутствовали серологические маркеры ВГВ-инфекции. Таким образом, первичный результат ПЦР-исследования на ДНК ВГВ у данных больных был расценен как ложно положительный. Был выдан отрицательный ответ

Таблица 2

Распределение вирусной нагрузки ВГВ в крови у больных

Концентрация ДНК ВГВ, МЕ/мл	Количество образцов	
	абс.	%
Менее 150	15	27,8
1,5·10 ² –10 ³	10	18,5
10 ³ –10 ⁴	10	18,5
10 ⁴ –10 ⁵	4	7,4
10 ⁵ –10 ⁶	7	13,0
10 ⁶ –10 ⁷	2	3,7
10 ⁷ –10 ⁸	2	3,7
Более 10 ⁸	4	7,4
Всего ...	54	100

Таблица 3

Распределение вирусной нагрузки ВГС в крови больных

Концентрация РНК ВГС, МЕ/мл	Количество образцов	
	абс.	%
Менее 300	4	5,1
3·10 ² –10 ³	0	0
10 ³ –10 ⁴	2	2,6
10 ⁴ –10 ⁵	11	14,1
10 ⁵ –10 ⁶	23	29,5
10 ⁶ –10 ⁷	31	39,7
10 ⁷ –10 ⁸	6	7,7
Более 10 ⁸	1	1,3
Всего ...	78	100

Таблица 4

Протокол количественного исследования на ДНК ВГВ

№	Образцы	Пороговые циклы		Концентрации		Результат	
		ВКО	ВГВ	ВКО	ВГВ	МЕ/мл	статус
		Имя	СТ	СТ	копий		
1	1766	21,16		2282		отр	Ok
2	1773	21,19	32,26	2234	1	Менее 150	Ok
3	1785	21,26		2126		отр	Ok
4	1665	21,11	23,97	2364	227	911	Ok
5	1758	20,39		3930		отр	Ok
6	ПКО	21,11		2364	404	1590	ПКО Ok
7	ОКО	21,24		2156			ОКО Ok
8	KB1	17,77	17,22				Калибр
9	KB2	26,57	26,14				Калибр
10	K(-)						K- Ok

Примечание. K(-) – отрицательный контроль амплификации.

с рекомендацией провести контрольное повторное исследование через 1 мес.

Согласно рекомендациям Минздрава (2013), для ВГС установлены низкие и высокие значения вирусной нагрузки: низкой считают концентрацию РНК ВГС до 105 МЕ/мл, высокой – с 105 МЕ/мл и выше. Диапазон концентраций РНК ВГС в исследованных нами биоматериалах от менее 300 МЕ/мл до более чем 108 МЕ/мл (также весь линейный диапазон использованного теста). Около одной пятой (21,8%) образцов имели низкую вирусную нагрузку ВГС, остальные (78,2%) – высокую. В 17 пробах концентрация РНК ВГС была менее 105 МЕ/мл (табл. 3). Образцы, содержащие РНК ВГС от 106 до 107 МЕ/мл, составили 39,7% от общего количества положительных проб.

Два образца с низкой концентрацией РНК ВГС (менее 300 МЕ/мл) при повторном исследовании не подтвердились, кроме того, в этих пробах не выявлены антитела к ВГС. Решение вопроса о корректности первичного положительного результата исследования затруднено. Получение ложноотрицательного результата возможно по нескольким причинам. В образце, полученном от пациента с низким уровнем репликации ВГС, концентрация РНК может быть ниже детектируемого уровня из-за хранения материала при температуре 4°C в течение нескольких дней и/или из-за его замораживания/оттаивания. С другой стороны, нельзя исключить контаминацию образца в первой постановке. В таких случаях мы рекомендуем повторное исследование новой порции крови.

Важным вопросом при интерпретации результатов в ПЦР-исследованиях является возможность получения ложноотрицательных результатов за счет очень высоких концентраций НК. Например, в случае с образцом № 1758 (табл. 4) был получен отрицательный результат.

На графике накопления продуктов амплификации над пороговой линией присутствует нехарактерная кривая (см. рисунок).

При повторном выделении и разведении образца в 100 раз получен положительный сигнал уже на первом цикле амплификации. Проба № 1758 с очень высокой концентрацией ДНК ВГВ в представленном опыте явилась источником контаминации других образцов (табл. 5). Из 30 исследуемых проб ДНК ВГВ выявлялась в 10. При повторном выделении ДНК и амплификации положительный сигнал получен в двух образцах, восемь первоначально положительных образцов оказались отрицательными.

Необходимо обратить внимание на то, что данная поста-

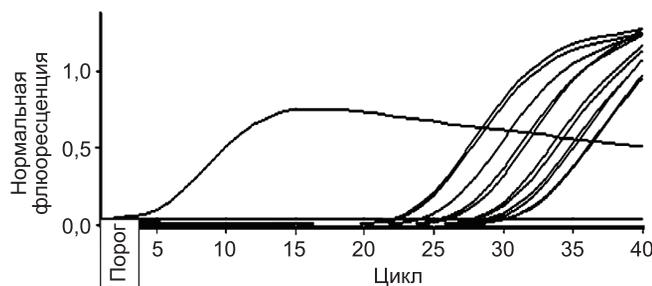


График нарастания флуоресценции при амплификации после сглаживания по каналу JOE/Yellow – образцы, содержащие специфическую мишень ДНК ВГВ (ложноотрицательный результат).

Таблица 5

Протокол качественного исследования на ДНК ВГВ

№	Образцы	Пороговые циклы		Результат	
		ВКО	ВГВ	статус	
		Имя	СТ		
1	1737	20,74		отр	Ok
2	1772	20,58		отр	Ok
3	1773	20,64	29,82	пол	Ok
4	1781	20,74		отр	Ok
5	1784	20,65		отр	Ok
6	1777	20,75		отр	Ok
7	1778	21,03		отр	Ok
8	ПКО В1	19,79	22,04	OK	Ok
9	1740	20,85		отр	Ok
10	1741	20,78		отр	Ok
11	1742	21,42	29,8	пол	Ok
12	1743	20,92		отр	Ok
13	1744	20,97		отр	Ok
14	1745	21,12	27,73	пол	Ok
15	1746	20,84	29,18	пол	Ok
16	1747	20,92	29,7	пол	Ok
19	1748	20,93		отр	Ok
20	1749	21,08		отр	Ok
21	1750	21,29	28,57	пол	Ok
22	1751	21,23		отр	Ok
23	1563	21,41	27,59	пол	Ok
24	1567	21,06		отр	Ok
25	1811	21,78		отр	Ok
26	1754	21,08		отр	Ok
27	1755	21,2		отр	Ok
28	1756	21,06		отр	Ok
29	1758	21,07	1,05	пол	Ok
30	1766	21,11	23,78	пол	Ok
31	1785	20,86	25,36	пол	Ok
32	ПКО В2	20,63	21,82	OK	Ok
33	KB1	27,78	25,85	OK	Ok

Примечание. ПКО В1 и ПКО В2 – положительные контрольные образцы выделения.

новка включала образцы ДНК из двух независимых выделений НК: первое – 7 образцов (порядковые номера в таблице 1–7) плюс положительный контрольный образец (ПКО), второе – 22 образца с ПКО (номера 9–32). В каждом из независимых выделений НК были выявлены повторно позитивные образцы. В пробе № 1773 из первого выделения концентрация ДНК ВГВ оказалась в диапазоне низких значений (менее 150 МЕ/мл), а в пробе № 1758 из второго выделения вирусная нагрузка оказалась высокой – более 108 МЕ/мл. Эти данные подтверждают наши наблюдения, что наиболее опасным этапом для получения ложноположительного результата (контаминации) при использовании метода ПЦР является этап выделения НК.

В заключение отметим несколько ключевых моментов, влияющих на достоверность результатов ПЦР-исследования. Для исключения ложноположительных результатов образцы с низкой вирусной нагрузкой должны быть повторно исследованы начиная с этапа выделения НК. Результат повторного ПЦР-анализа мы считаем достоверным. Если по результатам эксперимента один из образцов в постановке содержит высокую концентрацию вирусной НК, для всех остальных положительных образцов оправданно проведение повторного исследования. Выполнение этих рекомендаций позволит существенно снизить вероятность выдачи ложноположительных результатов анализа в клинические подразделения.

Для снижения вероятности выдачи в клинические подразделения ложноотрицательных результатов анализа сотрудниками ПЦР-лаборатории следует обращать внимание на кривые накопления продуктов амплификации: на их форму и расположение на графике накопления флюоресцентного сигнала.

В проведенном исследовании мы анализировали контаминацию НК на примере ВГВ и ВГС, но все сделанные в работе выводы равноценны для ПЦР-тестирования любых НК-мишеней. Аналогичные закономерности отмечались нами также при исследовании ДНК цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр, вируса герпеса человека типа 6 и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения. Утверждено заместителем председателя Госкомсанэпиднадзора Г.Г. Онищенко 22 июня 1995 г. N06-19/52-17, Москва.
2. Методические указания МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III–IV групп патогенности». Утверждено Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко, 04.03.2004 г., Москва.
3. Bogard M., Buffet-Janvresse C., Cantaloube J.F., Biagini P., Duverlie G., Castelain S. et al. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 3298–300.
4. Borst A., Box A.T.A., Fluit A.C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23: 289–99.
5. Lo Y.M., Mehal W.Z., Fleming K.A. False-positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet.* 1988; 2: 679.
6. Noordhoek G.T., Embden J.D. van, Kolk A.H. Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 2522–5.
7. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230: 1350–4.
8. Quint W.G., Heijntink R.A., Schirm J., Gerlich W.H., Niesters H.G. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 225–8.
9. Zaaier H.L., Cuypers H.T., Reesink H.W., Winkel I.N., Gerken G., Lelie P.N. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet.* 1993; 341: 722–4.

REFERENCES

1. *Methodological recommendations on work in diagnostic laboratories using polymerase chain reaction. Key provisions.* Approved by the Deputy Chairman of the State Commission for GG Onishchenko, June 22, 1995. N06-19/52-17, Moscow. (in Russian)
2. *Methodological recommendations MR 1.3.1888-04 "PCR implementation for biohazardous infectious material if it falls within WHO Risk Groups 3 or 4 Guideline".* Approved by the chief sanitary doctor of Russia G.G. Onishchenko, 04.03.2004, Moscow. (in Russian)
3. Bogard M., Buffet-Janvresse C., Cantaloube J.F., Biagini P., Duverlie G., Castelain S. et al. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 3298–300.
4. Borst A., Box A.T.A., Fluit A.C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23: 289–99.
5. Lo Y.M., Mehal W.Z., Fleming K.A. False-positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet.* 1988; 2: 679.
6. Noordhoek G.T., Embden J.D. van, Kolk A.H. Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 2522–5.
7. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230: 1350–4.
8. Quint W.G., Heijntink R.A., Schirm J., Gerlich W.H., Niesters H.G. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 225–8.
9. Zaaier H.L., Cuypers H.T., Reesink H.W., Winkel I.N., Gerken G., Lelie P.N. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet.* 1993; 341: 722–4.

Поступила 29.04.14
Received 29.04.14