

Современные возможности автоматизации лабораторных исследований, проводимых методом полимеразной цепной реакции

А.В. Карасев, врач клинико-лабораторной диагностики, г. Москва

Диагностика методом ПЦР является наиболее динамично развивающейся областью лабораторной медицины. Ежегодно количество выполняемых исследований этим методом неуклонно растет, причем как в учреждениях здравоохранения так и в коммерческих лабораториях. Это объясняется замещением других методов, уступающих по скорости получения результата или обладающих низкой чувствительностью и специфичностью. Развитие ПЦР-диагностики идет, несмотря на сложность и многоэтапность этого метода. Современный уровень развития технологии позволяет автоматизировать все этапы проведения ПЦР, тем самым уменьшить трудозатраты, увеличить скорость, повысить качество и исключить ошибки. Существует достаточно большое разнообразие поступающих в лабораторию разновидностей клинического материала, поэтому первым этапом ПЦР-диагностики является сортировка образцов в зависимости от способа их обработки. Затем из биологических образцов выделяются нуклеиновые кислоты – ДНК при исследовании бактерий, гене-

тики человека. Выявление вирусных возбудителей требует выделения ДНК и/ или РНК, в зависимости от типа подозреваемой вирусной инфекции. После выделения нуклеиновых кислот следует процесс приготовления реакционной смеси. Смешиваются необходимые реагенты: пара праймеров, нуклеотиды, фермент Taq-полимераза, соль магния, буферный раствор, после чего вносится образец нуклеиновых кислот исследуемого образца. Поскольку все компоненты полимеразной цепной реакции используются в микрообъемах – от 0,5 до 50 мкл, соответственно этому используются микропробирки объемом 100 – 500 мкл, что ставит особые условия точности дозирования.

Далее ПЦР смесь помещается в амплификатор, где собственно и происходит реакция. В зависимости от способа учета продуктов реакции – если не используется формат детекции в реальном времени, – микропробирки переносятся в флуориметр (измерение конечной точки флуоресценции) или передаются на электрофоретическую детекцию.

Автоматизация в лабораторной диагностике

Конец XX и начало XXI века обозначился внедрением во все сферы производства высокоточных образцов робототехники. Рассматривая лабораторную диагностику, нельзя не отметить появление автоматических анализаторов различных направлений – биохимические исследования, подсчет клеточных элементов, высокоточные дозирующие станции, системы распознавания изображе-

ний. С развитием компьютерных технологий лаборатории получили возможность автоматического сбора данных исследований, их хранения и последующей передачи. Такие системы получили название «лабораторные информационные системы». Хранением не только данных исследований, но и всех данных о пациенте занимаются медицинские информационные системы.

Автоматизация исследований методом ПЦР

Поскольку ПЦР в лабораторной медицине имеет ряд отличий от других видов исследований, автоматизация этого метода стала возможной только в последнее десятилетие. Это обусловлено появлением автоматических станций позволяющих дозировать объемы менее 1 мкл, интеграцией с различными устройствами, а также возможностями программного обеспечения позволили проводить все этапы ПЦР, практически полностью исключая ошибки человека. Еще одно важное отличие от других методов клинической диагностики – наличие разнообразных путей обработки биообразцов в лаборатории, что определяется, как было упомянуто выше, их разнообразием, различными методами выделения, многообразием тест-систем с индивидуальными программами амплификации и необходимостью сведе-

ния всех результатов в единый формат. Разнообразны и тест-системы (наборы реагентов), применяемые для обеспечения широкого ассортимента исследований, при этом часто используются наборы различных производителей. К тому же в современной ПЦР-лаборатории, как правило, присутствует несколько вариантов автоматизированных станций, как для этапа выделения нуклеиновых кислот, так и для приготовления ПЦР смеси. До недавнего времени мало кто представлял решение проблемы интеграции в ПЦР-лаборатории всех вышеупомянутых этапов. Основной задачей программного обеспечения КДЛ-Макс как раз является объединение потоков в ПЦР-лаборатории в одном ИТ-решении, или другими словами информатизацией рабочего процесса.

Автоматизация этапа сортировки

Разнообразие биоматериала в зависимости от способа его обработки является определяющим параметром при проведении сортировки образцов. Как правило этот этап требует достаточно больших затрат времени и человеческих ресурсов, поскольку исходные условия сортировки владеет только оператор. Уже сегодня разработан алгоритм, который лежит в основе программного обеспечения КДЛ-Макс, основанный на базе данных о процессировании различных видов биообразцов и тест-систем, применяющихся в лаборатории, а также учитывающий аппаратные ресурсы. Современная лабораторная медицина широко использует штрих-кодирование биологических образцов, а также медицинской документации. Лабораторные информационные системы при необходимости кодируют информацию об образце и позволяют печатать клейкую этикетку для пробирок. Современные наклейки обладают исклю-

чительной стойкостью к истиранию, могут надежно выдерживать отрицательные температуры и даже действия дезинфицирующих растворов. Это необходимо для обеспечения прослеживаемости образцов, исключения человеческого фактора в проведении исследований и самое главное, для «прочтения» информации об образце в автоматических станциях. Уже получают распространение в клинических лабораториях автоматические сортировщики-роботы, которые идентифицируют поступающие образцы и в зависимости от типа исследований формируют соответствующие штативы. Для ПЦР-диагностики важно учитывать информацию о способе выделения нуклеиновых кислот, назначениях на исследования, соответственно подбирать необходимые тест-системы, программу термоциклирования и учета результатов. Все эти функции реализованы в программном обеспечении КДЛ-Макс.

Автоматизация выделения нуклеиновых кислот

Принципиально существует 2 вида выделения нуклеиновых кислот, которые автоматизированы в настоящее время. Это сорбция на специальных колонках и технология, основанная на применении магнетизированной силики – носителя, позволяющего специфически связывать нуклеиновые кислоты и осаждать их под действием магнита, во время того, как пробы очищаются от свободно плавающих побочных веществ. Примером первой технологии является система QIAcube, производства компании QIAGEN, где загружаются одновременно до 12 образцов и проходят постепенно этапы ферментативного лизиса, сорбции и очистки. Автоматы с магнитной сорбцией получили большее распространение и примером

является система MagPurix, производства компании Zinexts, рассчитанная также на 12 одновременно обрабатываемых образцов. Общепринятым форматом проведения ПЦР исследований является планшет с 96 лунками. Поэтому весьма разнообразны автоматы работающие с таким количеством загружаемых проб. Основными примерами является станции Xiril Neon-100, QIASymphony. Возможность считывания штрих-кодов и полноценная интеграция с лабораторными информационными системами позволяют использовать такие станции в крупных лабораториях, а также в особых условиях исследований – при работе в службе крови, центрах СПИД, при исследовании особо опасных инфекций.

Автоматизация приготовления смеси ПЦР

Этап приготовления реакционной смеси требует наибольшего внимания от персонала – важна не только точность дозирования каждого компонента, но и исключение ошибки, если используется множество образцов и тест-систем. Поэтому в отличие от предыдущих вышеупомянутых этапов, согласно действующей нормативной базе, приготовление смеси ПЦР в лабораторной диагностике может осуществлять только врач. Существуют системы поддержки, когда на экран выводится рабочее задание. Одной из первых таких систем было решение от французского института Пастера. 96-луночный планшет ставится на экран компьютерного монитора, и подсветкой определенной зоны оператору сообщается куда вносить необходимый реагент. Другим примером подобной системы являются штативы со светодиодной подсветкой, совмещенные со звуковым сопровождением – в наушники оператора диктуются необходимые действия, а подсвечиваемые лунки подсказывают область внесения реагентов. Эти системы обладают рядом недостатков – невозможность работы с раз-

личными форматами ПЦР-пробирок и некоторым замедлением работы персонала. Этим недостатком лишена система КДЛ-Макс, имеющая в своем составе защищенный малогабаритный планшетный компьютер выводящий на экран рабочее задание, штатив для проб ДНК, подсвечивающий нужный образец и множество штативов формата 96-лунок или роторного типа на 72 лунки одновременно подсвечивает нужные лунки для внесения, также автоматизированы подсказки по внесению компонентов реакционной смеси (наименование реагента, объем дозирования). Отдельного внимания заслуживают автоматические дозирующие станции, которые готовят реакционную смесь и вносят образцы без участия человека. Основными примерами является версия станции Xiril Neon-100, рассчитанная одновременно приготавливать до 384 лунок ПЦР. Каждая операция дозирования проходит под барометрическим контролем – прецизионный датчик следит за моментом соприкосновения с жидкостью, ее забора и внесения, записывая все действия в электронный журнал и ис-

правляя возможные ошибки дозирования. Другими примерами, получившими распространение в лабораторной диагностике являются станции QIAgility (QIAGEN), MicroLab STAR (Hamilton). Закрытый корпус, возможность считывания штрих-кодов, а значит

полноценной интеграции в лабораторную службу, исключительная точность дозирования, контроль дозирования делают такие станции незаменимыми при большом числе выполняемых исследований методом ПЦР.

Автоматизация амплификации и получения результатов

Почти все современные амплификаторы с детекцией в реальном времени не интегрированы в лабораторную информационную систему, поскольку для каждой тест-системы требуется введение температурных и временных параметров, к тому же пока не разработано единого формата экспорта первичных данных для амплификаторов. Примером, решающим перечисленные задачи, является российская программа FRT-Manager, которая помимо управления наиболее распространенными типами амплификаторов может импортировать первичные данные кривых амплификации и проводить математическую обработку – убирать возможные помехи, осуществлять проверку постановки с учетом данных по положительным и отрицательным контрольным образцам. Встроенная база данных всех тест-систем Амплисенс, позволяет проводить первичный анализ данных по образцам, что существенно облегчает работу врача на этапе написания заключений. Модуль управления складом позволяет прогнозировать расход реагентов, а значит заблаговременный заказ, к тому же отслежи-

вание серий реагентов предотвращает использование последних с истекшей датой годности. Совместное использование программ КДЛ-Макс и FRT-Manager делают процесс ПЦР-диагностики доступным для любых лабораторий, при этом обеспечивая отсутствие ошибок и управление всем рабочим процессом от поступления образцов в лабораторию до выдачи результата.

Таким образом, на сегодняшний день решения автоматизации процесса лабораторной диагностики методом полимеразной цепной реакции созданы для каждого этапа – сортировки, выделения нуклеиновых кислот, приготовления реакционной смеси, амплификации и обработки полученных данных. При этом существует выбор между системой поддержки оператора при использовании ручного труда, или установкой линейки автоматических дозирующих станций в зависимости от потребностей каждой лаборатории.

