# Jeden z technických problémů diagnostiky pomocí polymerázové řetězové reakce.

D.Hulínská,J.Votýpka
Státní zdravotní ústav Praha,

**Přesná metoda nesnáší improvizaci.**

Nadšení z netušených možností polymerázové řetězové reakce(PCR) již prožila většina mikrobiologů. Především těch, kteří mají co do činění s druhy těžce kultivovatelnými a rozpoznatelnými při použití klasických mikrobiologických metod. Komerční sety zbaví mikrobiology řady problémů , zklamání z neúspěchu a dávají jistotu reprodukovatelných a srovnatelných výsledků . Když se mikrobiolog spolehne na již vyzkoušené soupravy musí bezpodmínečně dodržet všechny požadavky firemního postupu.Při stále lákavější nabídce výrobců a dodavatelů se občas stane , že ke změnám podmínek reakce dojde nejčastěji tam, kde to laboratorní pracovník považuje za „bezvýznamné".Jako příklad bych uvedl záměny plastikových amplifikačních zkumavek o objemu 0,2 ml používané v termálních cyklerech.Experimentátor považuje tyto výrobky od různých výrobců za zaměnitelné a některé jejich tvarové a materiálové variace, spíše za konkurenční odlišnost než funkční záležitost.Přitom použití různých druhů těchto nádobek může zásadním způsobem ovlivnit výsledek.Dosažené výsledky podle druhu zvolené zkumavky může považovat za inhibici,dokonce i za kontaminaci podle toho jaký výsledek očekával, na jaký výsledek byl před změnou zkumavek zvyklý.Ten kdo si neumí vysvětlit své výsledky pak může propadnout malomyslnosti,případně zavrhnout i metody PCR diagnostiky vůbec ,případně prožít nezáviděníhodný vědecký život mezi nevysvětlitelnými výsledky.

**PCR jako tanec mezi inhibicí a kontaminací.**

Vysoká citlivost PCR je výhodou i nebezpečím. Výhodou je,že dobře pomáhá při identifikaci hledaného, nebezpečná je citlivost reakce ke kontaminaci a vzniku falešně pozitivních výsledků. Kritickými místy , kde může vznikat kontaminace jsou : příprava DNA ze vzorků, příprava mixu a manipulace s amplifikátem obsahujícím velké množství syntetizovaných kopií DNA. Oddělené prostory pro přípravu DNA,mixu i pro práci s amplifikátem,sterilizace pipet, špiček, a vyzařování prostoru jsou již běžně používaná ochranná opatření ve všech laboratořích. Navíc ke snížení možné kontaminace přispívá používání komerčních mixů a jejich variant pro přímou prevenci před kontaminací plynoucí z produktů PCR (PCR carry-over prevention).
Při velkém počtu reakcí,které má možnost naše laboratoř hodnotit a při desetileté zkušenosti s nejrůznějšími materiály od různých výrobců dospěli, jsme k zajímavému dílčímu zjištění v oblasti,které se většinou přílišná pozornost nevěnuje – PCR zkumavkám.

**Vliv mikrozkumavek a jejich uzávěrů.**

Méně často je studován vliv používaných zkumavek a typ jejich uzávěrů na možnou