

## ARKUSZ INFORMACYJNY PCR

autorstwa Klausa Stegera i Ulrike Kämmerer

„Jego (uwaga: Kary Mullis) wynalazek jest wysoce oryginalny i znaczący, ponieważ praktycznie dzieli biologię na dwie epoki przed PCR i po PCR” [1, przeł.]

**HISTORIA** - Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) umożliwia szybką i wykładniczą amplifikację milionów do miliardów kopii z niezwykle małej ilości dowolnej sekwencji DNA. Oparty na koncepcji „replikacji naprawy [2]”

Kary Mullis (28 grudnia 1944 - 7 sierpnia 2019) rozszerzył i udoskonalił technikę, stosując powtarzalne cykle temperaturowe. W 1993 roku wraz z Michaeliem Smithem otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Później do procesu włączono termostabilną polimerazę DNA.

„Dzięki PCR, jeśli zrobisz to dobrze, możesz znaleźć prawie wszystko w każdym dymie”.

**ZASADA** - PCR składa się z sekwencji 30-35 cykli amplifikacji DNA, z których każdy obejmuje następujące trzy etapy:

1. Denaturacja (94-98 °C): Rozdzielenie dwuniciowej matrycy DNA na dwa osobne DNA pasma.
2. Przyłączenie (60-65°C): Wiązanie krótkich, jednoniciowych sekwencji startowych DNA (starterów) z dwoma końcami sekwencji DNA, która ma być amplifikowana. Ta specyficzna para starterów definiuje zatem sekwencję docelowego DNA (docelowego).
3. Elongacja (72°C): Wydłużenie dwóch sekwencji starterowych przez enzym polimerazę DNA, która również kopiuje DNA w komórkach. Prowadzi to do całkowitej syntezy docelowego DNA, którego sekwencja jest komplementarna do matrycy DNA.

Produkt DNA każdego cyklu służy jako materiał wyjściowy dla kolejnego cyklu, prowadząc w ten sposób do wykładniczej amplifikacji pożądanego docelowego DNA. Z jej powodu określonej wielkości, końcowy produkt PCR można analizować w żelu agarozowym lub poliakryloamidowym.

W testach PCR na obecność wirusa SARS-CoV-2 w celu wykrycia specyficznych sekwencji SARS-CoV-2 zastosowano tzw. real-time PCR. Wykorzystuje to dodatkową „sondę”, która jest znakowana nieaktywnym barwnikiem fluorescencyjnym i wiąże się pomiędzy flankującą parą starterów. Podczas faz wydłużania „sonda” ulega zniszczeniu przez polimerazę DNA, co powoduje uwolnienie mierzalnego sygnału u fluorescencji.

Próg cyklu (Ct) to liczba cykli, przy których wzrasta ilość produktu PCR. Sprężony sygnał fluorescencji można wykryć powyżej szumu tła. Wartość Ct jest odwrotnie proporcjonalna do pierwotnej ilości docelowego DNA, tj. im niższa wartość Ct, tym więcej docelowego DNA było pierwotnie obecnych w próbce.

Do prawidłowego ilościowego PCR (qPCR) wymagany jest standard zewnętrzny o znanym standardzie. Stężenie DNA potrzebne do porównania wartości Ct próbki (nieznane stężenie DNA) z wartością Ct standardu (znane stężenie DNA).

Do analizy jednoniciowego RNA (jak w przypadku koronawirusów) przed PCR należy dokonać transkrypcji RNA na DNA. Ten typ PCR nazywany jest RT-PCR (RT dla odwrotnej transkrypcji).

Ze względu na wysoką czułość techniki PCR należy unikać wszelkich zanieczyszczeń, ponieważ zanieczyszczający DNA jest amplifikowany równie skutecznie, jak poszukiwany docelowy DNA. W najgorszym przypadku badana próbka może być już skażona docelowym DNA z wcześniej przeprowadzonej reakcji PCR.

UWAGA: Ze względu na wysoką czułość, PCR jest doskonałą techniką wykrywania małych ilości DNA (np. w kryminalistyce). Jednakże wysoka czułość otwiera również drzwi do różnych błędów i oczywistych oszustw, jeśli PCR zostanie zastosowany nieprawidłowo (np. nieswoiste badania zdrowych osób) lub uzyskane wyniki są błędnie interpretowane (np. irracjonalne sumowanie „przypadków” pozytywnych pod względem PCR).

„Do chwili obecnej nie ma testów diagnostycznych wykrywających obecność zakaźnych wirusów wiarygodnie udowodnić.” [4, przetłumaczone]

Uważa się, że test PCR jest pozytywnym „przypadkiem” osoby zakażonej, może na porównać, ale to NIE PRAWDA. Oto FAKTY

Przygotowanie próbki do PCR wymaga całkowitego rozbitcia struktur biologicznych w celu oddzielenia kwasów nukleinowych od białek, lipidów i resztek komórkowych. Wszystkie protokoły obejmują traktowanie próbek mieszaniną wysoko toksycznych substancji chemicznych [5], co nieuchronnie niszczy zarówno organizmy.

Niezależnie od zastosowanego protokołu, PCR może stosować jedynie do badania obecności sekwencji docelowej(ych) wybranej(ych) przez specyficzną parę starterów, która jednak reprezentuje jedynie ułamek całego genomu wirusa. Dlatego też, nawet prawidłowo przeprowadzona, PCR w żadnym wypadku nie może wykazać obecności w badanej próbce odtwarzalnego, zakaźnego wirusa z nienaruszonym genomem.

„Pozytywny” wynik testu PCR NIE oznacza, że w badanej próbce znajduje się odtwarzalny, zakaźny wirus. Należy przez to rozumieć jedynie wskaźnik molekularny, który potwierdza lub unieważnia wstępne podejrzenia, ale który zawsze wymaga dalszej diagnostyki różnicowej przez lekarza, biorąc pod uwagę objawy pacjenta

- jak w przypadku KAŻDEGO innego badania laboratoryjnego!

Należy pamiętać, że objawy infekcji dróg oddechowych są wywoływane przez wiele różnych wirusów, a także bakterie, grzyby i pierwotniaki, pojedynczo lub w połączeniu, może być spowodowane. Ogólnie rzecz biorąc, diagnostyka różnicowa opiera się na objawach klinicznych pacjenta, a badania laboratoryjne, takie jak wzrost zakaźnej bakterii w posiewie, dostarczają lekarzowi dodatkowych informacji. Badanie podtypów wirusów ma charakter czysto naukowy, ale nie ma znaczenia w rutynowej praktyce klinicznej, ponieważ terapie antywirusowe mają zwykle jedynie charakter objawowy, tj. są niezależne od podtypów wirusa lub kombinacji różnych wirusów. Różni się to wyraźnie od leczenia chorób wywołanych przez bakterie (np. antybiotyki), grzyby (np. leki przeciwgrzybicze) lub pierwotniaki (np. antybiotyki).

Testy wielokrotne służące do wykrywania szerokiego zakresu patogenów są zatem niezbędne do rozróżnienia różnych infekcji płuc, które objawiają się podobnymi objawami klinicznymi lub do określenia aktualnie krążących patogenów do celów nadzoru [6]. Dzięki dużej czułości PCR możliwe jest wykrycie sekwencji RNA/DNA niedostatecznie reprezentowanego patogenu w złożonej mieszaninie patogenów, tak jak miało to miejsce w przypadku dwóch z pierwszych pięciu przypadków COVID-19

pacjentów miało to miejsce [7]. Ponadto możliwe jest całkowite pominięcie patogenu, jeśli próbka do wykrycia tego patogenu nie jest uwzględniona w teście.

Wreszcie istnieje ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych, zarówno z powodu możliwości opierania się na błędach technicznych i klinicznych. Pozytywny wynik testu PCR nie oznacza automatycznie, że badana osoba jest nosicielem nienaruszonego wirusa i może go przenosić. Rozbieżność ta uwidacznia się w przypadku tzw. osób bezobjawowych, czyli osób, które uzyskały pozytywny wynik testu PCR, ale są zdrowe i których wyniki badania wykazują wysoką wartość Ct, a co za tym idzie niskie początkowe stężenie docelowego DNA w badanym DNA. próbka ma. Zdecydowana większość tych osób nie będzie nosicielem nienaruszonych patogenów ani nie będzie zakaźna. Wykryta niewielka ilość wirusowego kwasu nukleinowego jest pozostałością po już pokonanej infekcji lub, co bardziej prawdopodobne, fałszywie dodatnim wynikiem testu spowodowanym nieprawidłowym testem. Obróbka próbki lub zanieczyszczenie.

Twierdzi się, że technika PCR to „nowy złoty standard” w wykrywaniu zakażeń, ale to NIE PRAWDA. Oto FAKTY

Złoty standardem w określaniu zakażenia wirusowego jest odtwarzalność konkretnego wirusa w odpowiedniej hodowli komórkowej [4]. Ponieważ postępowanie z wirusami zakaźnymi wymaga zachowania szczególnych środków bezpieczeństwa, badania takie mogą być wykonywane wyłącznie w specjalistycznych laboratoriach i dlatego nie można ich stosować w rutynowej diagnostyce.

W rutynowej diagnostyce można jednak alternatywnie wykonać PCR, aby zapewnić lekarzowi pomoc w podjęciu decyzji dotyczącej najlepszego możliwego dalszego leczenia pacjenta. Należy podkreślić, że wynik testu PCR nie należy rozumieć jako prostej odpowiedzi tak/nie, ale raczej wymaga określenia tzw. wartości odcięcia Ct. Musi to zostać wcześniej określone przez specjalne laboratorium (porównując wyniki PCR z wynikami hodowli komórkowej), a następnie skorygowane przez laboratorium przeprowadzające test PCR (porównując wyniki PCR z wynikami wzorców zewnętrznych, które zawierają inaktywowane wirusy w znanych stężeniach).

O ile w klinice wymagana jest duża czułość w celu potwierdzenia lub wykluczenia podejrzenia zakażenia u pacjentów objawowych, o tyle w kontekście epidemii ważniejszą rolę odgrywa swoistość [8], aby uniknąć wysyłania osób zdrowych z fałszywie dodatnimi wynikami testów niepotrzebnie poddawać się kwarantannie.

Wysoka czułość wiąże się z poważnym wąskim gardłem w wydajności PCR. Nawet przy 100% specyficzności, tj. jeśli nie ma wyników fałszywie dodatnich, oznacza to jedynie, że nie amplifikuje się żadnych sekwencji innych niż wybrane sekwencje docelowe. Jednakże w przypadku rutynowego stosowania (tj. poza certyfikowanymi laboratoriami specjalistycznymi) zanieczyszczenie i błędy w obsłudze nieuchronnie doprowadzają do fałszywie dodatnich wyników testu.

Jak zauważyć wcześniej, bezwzględne oznaczenie ilościowe wirusii w danej próbce wymaga przeprowadzenia qPCR przy użyciu serii rozcieńczeń znanymi ilościami inaktywowanego wirusa. Wartość Ct nieznanego próbki można następnie porównać z wartościami Ct z serii rozcieńczeń, aby oszacować ilość zawartych w niej cząstek wirusa. Sam dodatni sygnał PCR nie pozwala na wyciągnięcie jakichkolwiek wniosków na temat możliwego zakażenia wirusowego, chyba że dostępna jest wartość Ct, która specyficznie wiąże się z wynikiem z określoną krzywą standardową [9].

Ponieważ odwrotna transkrypcja, warunki starterów i struktury drugorzędowe w miejscach wiązania starterów są procesami stochastycznymi, wartość Ct może różnić się w zależności od różnych metod PCR i różnych laboratoriów. Porównanie z genami referencyjnymi w znanych stężeniach jest zatem obowiązkowe w celu zmierzenia względnej oceny ilościowej pomiędzy różnymi laboratoriami.

Możliwa aktywność replikacyjna wirusa u badanego osobnika za pomocą testu RT-PCR opartego na wykrywaniu subgenomowego RNA (sgRNA), który powstaje wyłącznie podczas replikacji wirusa w zakażonych komórkach. Ponieważ jednak sgRNA można wykryć kilka dni i tygodni po zakażeniu, brak sgRNA wskazuje na brak replikacji wirusa, ale obecność sgRNA niekoniecznie wskazuje na zakażenie [10].

Twierdzi się, że e masowe badanie PCR jest odpowiednią metodą monitorowania  
Rozprzestrzenianie się wirusów a zdrowie populacji, ale to NIE PRAWDA  
Oto FAKTY

Ponieważ PCR nie jest w stanie wykryć ani przewidzieć, czy dana osoba uzyskała a wynik pozytywny  
Jeśli dana osoba jest nosicielem nienaruszonych wirusów lub może je przenosić, testów laboratoryjnych  
opartych na PCR nie należy nigdy stosować do monitorowania zdrowej populacji wyłącznie w celu  
wykrycia określonej sekwencji kwasu nukleinowego dowolnego patogenu.

Każdy test laboratoryjny, nawet jeśli ma zarówno wysoką swoistość, jak i wysoką czułość, prowadzi do  
wyników fałszywie dodatnich, które przy niskiej częstości występowania (liczba faktycznie zakażonych  
osób) mogą nawet przekroczyć liczbę wyników prawdziwie dodatnich, ponieważ ma to miejsce w  
przypadku masowych badań zdrowych osób [11].

Zdrowe osoby, które uzyskały pozytywny wynik testu, zazwyczaj mają niskie początkowe stężenie  
docelowego DNA, co jest powiązane z wysokimi wartościami Ct. Nawet jeśli wynik testu jest prawidłowy,  
osoby te nie są zakażone, ale dają fałszywie dodatni wynik kliniczny, na który składają się albo osoby  
wyzdrowiałe, które nadal są nosicielami pozostałości wirusa, albo osoby uodpornione, które nie są  
zakażone ze względu na niski poziom wirusii [12].

Prawie nie zwraca się uwagi na fakt, że duża przepustowość (np. z powodu niespecyficznych testów masowych)  
stosowanie zawsze tego samego podejścia PCR w laboratoriach badawczych prowadzi do gwałtownego  
wzrostu ryzyka błędów w obsłudze i powstawania dużych ilości aerozoli [13]. Te ostatnie mogą  
zanieczyścić kolejne podejścia PCR, a tym samym prowadzić do wzrostu liczby fałszywie dodatnich  
wyników testów. Rzeczywiście zgłoszono to w przypadku testów na obecność wirusa Covid-19.

Jedynym sposobem na zmniejszenie liczby wyników fałszywie dodatnich do niemal zera jest wykonanie  
sekwencjonowania Sangera [14], które również jest zalecane przez WHO [15].

Jednak nawet w tym przypadku nieuniknione zanieczyszczenie nie może całkowicie wykluczyć fałszywie  
dodatnich wyników testu.

Twierdzi się, że nowe warianty wirusa są na ogół kojarzone ze zwiększoną zakaźnością  
Można się spodziewać śmiertelności, ale to NIE PRAWDA Oto FAKTY

Nowe podtypy wirusów charakteryzują się niewielkimi zmianami w sekwencji kwasów nukleinowych, które  
NIE są automatycznie powiązane ze zwiększoną zakaźnością. Co więcej, zwiększona zakaźność NIE  
musi koniecznie wiązać się ze zwiększoną śmiertelnością.  
Wręcz przeciwnie, ewolucyjnie skuteczne wirusy stają się bardziej zaraźliwe, ale mniej niebezpieczne z  
każdą dodatkową mutacją.

Możliwe jest, że nowe podtypy wirusów NIE są nowością dla naszego układu odpornościowego,  
ponieważ poprzednie kontakty z wirusami z tej samej rodziny mogły już prowadzić do odporności  
krzyżowej. Faktycznie wykazano to w przypadku SARS-CoV-2 w zakonserwowanych próbkach krwi dawców  
przed epidemią COVID-19 [16,17,18].

Literatura [1] <https://www.nytimes.com/1998/09/15/science/scientist-at-work-kary-mullis-after-the-eureka-a-nobelists-drops-out.html>, [2] [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90469-4), [3] <https://www.facebook.com/nico.davinci.56/videos/1749227998568399/>, [4] <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>, [5] <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>, [6] <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665>, [7] <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722>, [8] <https://doi.org/10.1007/s10441-020-09393-w>, [11] <https://doi.org/10.1006/j.tbi.2000.1211>, [12] <https://doi.org/10.1136/bmj.m362>, [13] <https://doi.org/10.1136/bmj.m362>, [14] <https://publichealthpolicyjournal.com/volume/v4-2019-2024/>, [15] <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-dla-ivd-users-2020-05>, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>, [18] <https://doi.org/10.1126/science.abh1823>. Więcej szczegółów na temat techniki PCR: <https://doi.org/10.56098/jivd.v3i1.71>, [16] <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>, [17] <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>