

Agnieszka Kamińska¹, Julia Dąbrowska^{1, 2}

FAŁSZYWIE DODATNIE I FAŁSZYWIE UJEMNE WYNIKI REAKCJI
OPARTYCH NA AMPLIFIKACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH
W DIAGNOSTYCE ZAKAŻEŃ.
PRZYCZYNY I IMPLIKACJE DIAGNOSTYCZNE

¹Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Akademii Medycznej
w Warszawie

Kierownik Zakładu: Marek Radkowski

²Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik Zakładu: Barbara Grytner-Zięcina

W pracy omówiono najczęstsze przyczyny uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych reakcji opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych. Omówiono wszystkie etapy metodyki, począwszy od pobrania materiału aż do procesów wizualizacji produktu reakcji.

Celem pracy jest zwrócenie uwagi lekarzy na konieczność krytycznego podejścia do uzyskanego wyniku amplifikacji kwasów nukleinowych. Podjęto również próbę wskazania możliwości ograniczenia ilości błędów.

Słowa kluczowe: PCR, fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne wyniki PCR, optymalizacja PCR
Key words: PCR, false positive and false negative results of PCR, optimization of PCR

Technikę amplifikacji *in vitro* kwasów nukleinowych wprowadzono zaledwie kilkanaście lat temu, a obecnie powstają w laboratoriach biliony kopii różnych sekwencji. Metodę tę stosuje się do wykrywania obecności dowolnych fragmentów DNA lub RNA o znanej sekwencji. Zastosowana w genetyce roślin, zwierząt i ludzi pozwala na identyfikację osobników obciążonych chorobami uwarunkowanymi genetycznie, a także umożliwia podejmowanie prób leczenia tych schorzeń. W kryminalistyce i sądownictwie coraz częściej wyniki analiz opartych na metodzie amplifikacji kwasów nukleinowych stanowią materiał dowodowy. Techniki te są szeroko rozpowszechnione w diagnostyce wszelkich zakażeń, zarówno jako uzupełnienie dotychczas powszechnie stosowanych metod serologicznych, jak i metoda bezpośrednio identyfikująca źródło zakażenia. Wielokrotnie powtarzane testy pozwalają na ocenę przebiegu odpowiedzi immunologicznej wywołanej danym patogenem oraz ocenę skuteczności stosowanej terapii (1-3).

Podstawowe składowe konieczne do cyklu replikacji kwasu nukleinowego *in vitro* zostały opisane już w 1971 roku. Przedstawiono wówczas ogólne teoretyczne założenia procesu amplifikacji kwasów nukleinowych *in vitro* (1). W 1983 roku zastosowano po raz pierwszy metodę, określaną później jako reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), jednak

dopiero w 1985 roku ukazała się pierwsza publikacja prezentująca praktyczne zastosowanie PCR (4,5). Bazując na tej technice, wprowadzono inne metody amplifikacji kwasów nukleinowych z zastosowaniem Q β replikazy czy ligazy oraz amplifikację sygnałową umożliwiającą oznaczenia ilościowe (6–8).

Jednakże w diagnostyce zakażeń najpowszechniejszą stosowaną metodą jest nadal PCR. Naczelnym celem tej reakcji jest uzyskanie *in vitro* zwielokrotnionej ilości kopii określonego fragmentu DNA takiej, aby możliwa była jego wizualizacja. Do przeprowadzenia reakcji niezbędne są startery (sekwencje oligonucleotydowe komplementarne do końców poszukiwanego DNA), mieszanina trójfosforanów deoksynucleotydów oraz termostabilna polimeraza DNA. Po połączeniu wszystkich elementów z materiałem stanowiącym przedmiot badania (wyekstrahowanym DNA lub DNA powstałym w wyniku odwrotnej transkrypcji RNA-RT-PCR) oraz zapewnieniu odpowiednich, cyklicznie powtarzających się warunków temperaturowych, możliwe jest przeprowadzenie reakcji. Poprzez cykliczne powtarzanie tych etapów uzyskujemy wykładnicze narastanie liczby amplikonów, czyli fragmentów dwuniciowego DNA, ograniczonych co do wielkości przez dobór miejsc przyłączania starterów (2,3,9). Dzięki tak przeprowadzonej procedurze uzyskujemy zarówno wysoką swoistość jak i czułość reakcji łańcuchowej polimerazy, co zapewniło jej tak szybkie upowszechnienie w diagnostyce. Cechy te jednak mogą być nie tylko zaletami metody, ale również jej wadami. Należy więc pamiętać o konieczności krytycznego podejścia do wyników badań uzyskiwanych tą metodą.

Przedmiotem niniejszej pracy jest analiza czynników wpływających na uzyskiwanie wyników fałszywych metodami amplifikacji kwasów nukleinowych.

POBIERANIE, PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

Jednym z etapów, który może wpłynąć na ostateczny wynik PCR jest przygotowanie materiału biologicznego do badania. Pomimo tego, że coraz lepiej znamy sposoby izolacji kwasów nukleinowych różnych drobnoustrojów z materiału klinicznego, to nadal właściwe opracowanie i przygotowanie materiału nastęrcza trudności i wątpliwości. Idealna metoda przygotowania próbki opiera się na równowadze między celem badania, rodzajem materiału klinicznego, czułością metody i liczbą testów wykonywanych w danej próbce (2,10).

Już na etapie pobierania materiału biologicznego może dochodzić do zanieczyszczenia próbek biologicznych, chociażby przez używanie zabrudzonego sprzętu medycznego, np. rękawiczek. Należy pamiętać, że w przypadku diagnostycznych testów molekularnych opartych na amplifikacji, nawet pojedyncza kopia materiału genetycznego może zostać wykryta. Niemniej zasadą powinno być badanie największej możliwej objętości próbki w celu zwiększenia szansy zdiagnozowania zakażenia. Objętość próbki dla typowego testu diagnostycznego wynosi 100 μ l lub mniej, co zmusza niekiedy do wyboru pomiędzy złożonymi etapami zagęszczania badanego materiału (np. wytrącanie etanolem, wirowanie itp.) a obniżoną czułością metody. Jeżeli więc nie wykrywa się szukanego materiału genetycznego w próbce o objętości np. 50 μ l pobranej z 400 ml krwi, to można wnioskować, że nie ma tam więcej niż 20 tys. mikroorganizmów. Można też amplifikować sekwencje szukanego DNA z prób o dużej objętości, ale wtedy mogłoby dojść do zwiększenia częstości niespecyficznego przyłączania się starterów do DNA i obniżenia zarówno czułości jak i swoistości metody (np. płwocina ropna może zawierać aż 14 mg DNA/ml). Sytuacja diagno-

styczna komplikuje się, gdy uzyskujemy rozbieżne wyniki z różnych ośrodków. Może to wynikać ze stosowania testów o różnej czułości, np. w jednym laboratorium wykrywa się pojedynczą kopię szukanego DNA, a w innym nie mniej niż 20–50 kopii w tej samej jednostce objętości (6,9).

Procedury przygotowania próbek materiału klinicznego mogą również wpływać na uzyskiwane rezultaty. Znane są składowe materiały biologicznego hamujące systemy detekcji, chociażby przez wpływ na reakcje enzymatyczne. Jeśli spodziewana ilość sekwencji docelowej w badanym materiale jest wystarczająco duża, to rozcieńczenie badanej próby likwiduje efekt inhibitorowy. Jednocześnie pozwala to na zachowanie stężenia kwasu nukleinowego, przy którym prawdopodobieństwo niepobrania do reakcji ani jednej kopii jest niskie (tzn. przynajmniej 20 kopii w całym materiale). W przeciwieństwie do tego, zniszczenie kwasu nukleinowego na drodze enzymatycznej lub chemicznej zmniejsza liczbę kopii docelowych poddających się amplifikacji. Jak dotąd stosunkowo niewiele wiadomo o substancjach zawartych w płynach biologicznych, które hamują enzymy używane w reakcji amplifikacji. Hem i produkty jego metabolizmu (w stężeniu 0,8 μM) to znane inhibitory polimeraz DNA. Jednym ze znanych inhibitorów polimeraz są także kwaśne wielocukry, które są składnikami glikoprotein obecnych w płwocinie. Jednakże zarówno w płwocinie jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym mogą znajdować się jeszcze inne inhibitory polimeraz DNA, które nie zostały dotychczas scharakteryzowane.

Wykazano, że związki używane do przechowywania materiału biologicznego i oczyszczania kwasów nukleinowych tj. heparyna, EDTA, SDS, chlorowodorek guanidyny mogą hamować reakcję amplifikacji i być przyczyną uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników reakcji (2,10,11).

Warunki przechowywania surowicy, osocza czy innego materiału biologicznego poważnie wpływają na skuteczność wykrywania poszukiwanego RNA i DNA. Optymalna dla przechowywania próbek jest temperatura -80°C . Wahanie temperatury, a przede wszystkim kilkakrotne rozmrażanie i zamrażanie materiału powodują spadek stężenia kwasu nukleinowego, szczególnie RNA w badanej próbce i mogą prowadzić do uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników reakcji (10).

Z innym problemem spotykamy się w procedurach takich jak gotowanie, liza alkaliczna lub suszenie, które prowadzą do powstania jednoniciowego DNA. Zdenaturyzowane matryce chętnie służą jako niespecyficzne substraty do przyłączania się starterów w trakcie ustalania warunków reakcji, przez co obniża się swoistość danego układu. Patogeny, które w swoim cyklu życiowym tworzą zarówno nić DNA jak i RNA np. HIV, stwarzają dodatkowe trudności w procedurach wykrywania wyłącznie wirusowego RNA. Reakcja łańcuchowa polimerazy, poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-PCR), może prowadzić do wykrycia prowirusowego RNA – zamiast DNA, powstałego na drodze odwrotnej transkrypcji z poszukiwanego RNA (11–14).

Trudne jest również rozróżnianie materiału genetycznego mikroorganizmów żyjących, zdolnych do replikacji, od fragmentów DNA, pozostałych po przebytej infekcji. Większość metod amplifikacji, których celem są stabilne kwasy nukleinowe wykrywa DNA mikroorganizmów martwych. Jest to korzystne, gdy spodziewamy się utraty żywotności w trakcie transportu lub przechowywania. Utrudnia to jednoznaczne określenie, czy zakażenie jest czynne, czy też mamy do czynienia z zakażeniem przebyłym. Rozwiązaniem tego problemu może być poszukiwanie produktów pośrednich replikacji mikroorganizmu (13,15).

OPTIMALIZACJA METODY AMPLIFIKACJI KWAŚÓW NUKLEINOWYCH

Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na uzyskiwane wyniki jest ustawienie warunków badania PCR. Znajomość sekwencji charakterystycznej dla danego patogenu (signature sequence) jest punktem wyjścia dla zaprojektowania całej reakcji amplifikacji. Istnieją bazy danych, zwane Gen-BANK w Los Alamos czy EMBL (Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej) w Heidelbergu, zawierające informacje dotyczące sekwencji poznanych dotychczas genów. Korzystanie z nich, pozwala na wybór odpowiednich sekwencji do amplifikacji (8).

Pojęcie sekwencji charakterystycznej zostało wprowadzone przez genetyka bakterii Carla Woesa, który udowodnił istnienie unikalnych sekwencji materiału genetycznego w różnych organizmach. Decyzja o wyborze charakterystycznej sekwencji wyjściowej (target), która stanowi matrycę do namnażania kwasu nukleinowego jest najważniejsza dla całego cyklu. Jakikolwiek zmiany w tej sekwencji, np. mutacje punktowe wpływają bezpośrednio na reakcję amplifikacji. Najmniejsza, nawet pojedyncza zmiana nukleotydu w sekwencji, szczególnie w okolicy 3' pozycji przyłączającego się startera użytego do reakcji, może być przyczyną fałszywie ujemnych wyników. Związane jest to wymaganiami polimeraz DNA i może uniemożliwić inicjację syntezy z powodu braku aktywności 3' – 5' egzozymazy ze stałymi parami nukleotydów startera i matrycy DNA.

Również proces amplifikacji DNA z użyciem DNA ligazy jest wrażliwy na zmiany sekwencji znajdujące się blisko punktu przyłączenia ligazy. Prawidłowy wybór sekwencji wyjściowej zapewnia więc odpowiednią swoistość i czułość metody nawet wtedy, gdy obecne są potencjalne negatywne elementy (plazmid czy transpozom). Jeśli są one związane z wirulencją, mogą być doskonałym parametrem opisującym patogenność, np. metoda wykrywania egzotoksyn produkowanych przez *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* czy *Escherichia coli*. Czułość i wiarygodność metody jest potwierdzana wykrywaniem obecności molekuł sekwencji „target” danego patogenu, jednakże obecność wielu kopii sekwencji wyjściowej po reakcji amplifikacji nie jest bezpośrednim potwierdzeniem wysokiej czułości metody (7,16,17).

W diagnostyce zakażeń należy mieć na uwadze ogromną zmienność antygenową mikroorganizmów, nie zawsze uwzględnianą w rutynowej diagnostyce. Identyfikacja nowych, zmutowanych sekwencji kwasów nukleinowych odbywa się z pewnym opóźnieniem i nie zawsze informacje te są dostępne w bazach danych. Konieczne jest zatem ciągłe poszukiwanie, izolacja i identyfikacja nowych sekwencji charakterystycznych mikroorganizmów. Na ich podstawie projektuje się startery, niezbędne do przeprowadzenia procesu amplifikacji. Na podstawie znanej sekwencji patogenu projektować można wiele starterów. Jednak stosowanie różnych starterów dla tych samych patogenów najczęściej nie daje porównywalnych wyników. Może to być związane z częstością występowania danej sekwencji komplementarnej do startera lub z różnym progiem czułości reakcji amplifikacji dla różnych starterów. Prowadzić to może do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych. Amplifikacja podobnych sekwencji przez związanie starterów z pseudogenami i fragmentami o dużej homologii, może stanowić przyczynę uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich (11,16).

Kolejnym źródłem niespecyficznych reakcji jest zanieczyszczenie odczynników używanych w procesie amplifikacji, stąd konieczność włączania do analizy kilku kontroli negatywnych. Stosowanie wody jako próby badanej, bądź prób pochodzących od osób niezaka-

zonych, może pozwolić na wykrycie krzyżowej kontaminacji próbek. Krzyżowa kontaminacja jest przyczyną sporadycznie pojawiających się wyników fałszywie dodatnich w pojedynczych próbkach badanej serii. Weryfikację uzyskanych wyników uzyskać można powtarzając badanie lub stosując testy potwierdzające (10).

Naturalne polimorfizmy sekwencji charakterystycznej, która jest celem amplifikacji, można wykazać drogą sekwencjonowania. Sekwencja polimorficzna występująca wokół sekwencji charakterystycznej może zawierać hiperzmienne pojedyncze lub powtórzone fragmenty. Te polimorficzne *loci* w konstytutywnym genie mogą być źródłem systematycznych zanieczyszczeń, a dotyczy to przede wszystkim mikrobiologicznych patogenów i wirusów. Chcąc wyeliminować źródło wyników fałszywie dodatnich, należy porównać stopień zmienności produktów PCR zamplifikowanego *loci* z oryginalną próbką albo przez klonowanie zamplifikowanego DNA i sekwencjonowanie regionu lub bezpośrednio przez użycie oczyszczonego DNA jako matrycy do reakcji sekwencjonowania. Sekwencjonowanie takiego regionu pozwala na potwierdzenie istnienia zmiennych regionów. Porównanie zrekombinowanych klonów pozwala jednocześnie na wykrycie egzogennych zanieczyszczeń (10,18,19).

W ograniczeniu zanieczyszczania próbek pomaga również redukcja liczby kopii pozytywnych, znajdujących się na plazmidach używanych jako kontrole dodatnie. Zwiększenie czułości i swoistości reakcji można osiągnąć przeprowadzając drugą reakcję PCR z innym zestawem starterów, czyli nested PCR.

Swoistość reakcji zwiększa również zastosowanie modyfikacji w wykonaniu PCR zwanej „hot-start” – próby badane mieszają się z mieszaniną reakcyjną dopiero po podgrzaniu. Stosuje się ją zwłaszcza przy wykonywaniu nested PCR, w którym to podgrzewamy mieszaninę reakcyjną z rozcieńczonym produktem pierwszej reakcji PCR. Należy jednak pamiętać, że nie zawsze w ten sposób można uniknąć wyników fałszywie dodatnich i wtedy konieczne jest powtarzanie badań (19).

STANDARYZACJA PRACY W LABORATORIUM BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Innym źródłem zanieczyszczeń może być obecność DNA patogenu w powietrzu czy na rękawiczkach. Jeżeli jednak poziom zanieczyszczeń prób jest na tyle niski, że osiągnięte stężenie w próbce jest poniżej progu czułości metody, można poddawać reakcji amplifikacji mieszaninę prób negatywnych dla potwierdzenia wiarygodności wyników (10).

Jednak większość wyników fałszywie dodatnich wynikających z zanieczyszczenia obserwowana jest w laboratoriach, które nie spełniają restrykcyjnych warunków wymaganych podczas przeprowadzania reakcji amplifikacji.

W Polsce nie wprowadzono jeszcze przepisów regulujących pracę w laboratoriach biologii molekularnej, ale analizy wyników tego rodzaju badań potwierdzają konieczność ich sformalizowania. Z pewnością zoptymalizowałyby to pracę wielu laboratoriów i możliwe byłoby porównywanie wyników uzyskiwanych z różnych miejsc.

Dla uniknięcia błędów konieczne jest również rozdzielenie miejsc oraz sprzętu używanego do wykonywania izolacji DNA czy RNA, od miejsca samej reakcji amplifikacji i dalszej analizy produktów reakcji (10,11,20,21).

Analiza tych samych próbek innymi dostępnymi metodami Southern-Blot, hybrydyzacją *in situ* oraz wykrywanie białek, mimo znacznie niższego progu czułości pozwala na weryfikację części wyników fałszywych (11,18).

Praktyka pokazuje jednak, że najprostszą i najtańszą metodą redukcji ilości wyników fałszywych jest stosowanie przerw czasowych między kolejnymi reakcjami amplifikacji (10).

Jak wynika z powyższego rozważania, na każdym etapie amplifikacji kwasów nukleinowych, począwszy od pobierania i przechowywania próbek materiału biologicznego, a skończywszy na procesie wizualizacji produktu, mogą powstawać błędy prowadzące do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich jak i fałszywie ujemnych. Dotyczy to szczególnie diagnostyki zakażeń i z tego względu w praktyce klinicznej często nie można opierać się na pojedynczym wyniku badania PCR, jako ostatecznie potwierdzającym istnienie zakażenia. W krytycznej analizie otrzymanego wyniku konieczne jest uwzględnienie całego obrazu klinicznego w tym i wyników innych badań.

Wreszcie, gdy wynik badania metodą PCR stanowi jedyne potwierdzenie zakażenia, a istnieją uzasadnione wątpliwości co do jego wiarygodności, badanie należy powtórzyć w tym samym materiale lub ewentualnie w innym materiale biologicznym. Pozwala to na uniknięcie niewłaściwych decyzji terapeutycznych, a także niepotrzebnego stresu dla pacjenta niewłaściwie poinformowanego co do stanu jego zdrowia. Dotyczy to szczególnie zakażeń przewlekłych, których rozwój prowadzi do niekorzystnych następstw, np. zakażeń wirusami hepatotropowymi HCV, HBV czy wirusem HIV (11,22).

A Kamińska, J Dąbrowska

THE FALSE POSITIVE AND FALSE NEGATIVE RESULTS OF REACTIONS BASED UPON AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS IN DIAGNOSTICS OF INFECTIONS. REASONS AND IMPLICATIONS.

SUMMARY

The paper discusses the most frequent causes of false positive and false negative results of reactions based on amplification of nucleic acids. All stages of the method are described beginning with sample collection up to the finishing of visualization of amplification product. The main aim objective of the publication is to draw doctors' attention to the necessity to interpret the result with criticism. We attempted also to demonstrate how to avoid false results.

PIŚMIENNICTWO

1. Kleppe K, Ostsuka E, Kleppe R, Molineux R, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971; 56:341–361.
2. Kur J, Samet A, Juszczak J, Gładysz A. PCR – nowa era w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej i badaniach epidemiologicznych (część I i II). *Przegl Epidemiol* 1966;50:219–237.
3. Chippaux A, Deubel V. Application of the polymerase chain reaction (PCR) to diagnosis in virology *Bull Soc Pathol Exot* 1991;84(5 Pt 5):704–11.
4. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim A. Enzymatic amplification of – globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle – cell anemia. *Science*, 1985;230:1350–1354.
5. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991;26:301–334.
6. Persing DH, Landry ML. In vitro amplification techniques for the detection of nucleic acids: new tools for diagnostic laboratory. *Yale J. Biol. Med.* 1989;62:159–171.

7. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermo stable ligase. *Proc Natl Acad Sci* 88:189–193.
8. Compton J. Nucleic acid sequence – based amplification. *Nature (London)* 1991;350:91–92.
9. Erlich HA (ed.) In: *PCR Technology – Principles and Applications for DNA Amplification*. Stoc-ton Press 1989.
10. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237–238.
11. Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 1997 Mar; 46(3):188–94.
12. Menschikowski M, Vogel M, Eckey R, Dinnebier G, Jaross W. In situ reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction to identify intracellular nucleic acids without the necessity of DNase pretreatment and hybridisation. *Anal Cell Pathol* 2001;22(3):151–8.
13. Schottstedt V, Tuma W, Bunger G, Lefevre H PCR for HBV, HCV and HIV-1 experiences and first results from a routine screening programme in a large blood transfusion service. *Biologicals* 1998 Jun; 26(2):101–4.
14. Aslanzadeh J, Padilla BB, Shanley JD. Evaluation of PCR and nested PCR for laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *Mol Cell Probes* 1996 Jun; 10(3):173–
15. Fomsgaard A, Kirkby N, Jensen IP, Vestergaard BF. Routine diagnosis of herpes simplex virus (HSV) encephalitis by an internal DNA controlled HSV PCR and an IgG-capture assay for intrathecal synthesis of HSV antibodies. *Clin Diagn Virol* 1998 Jan; 9(1):45–56.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487–491.
17. Sanches-Pescador R, Stempien MS, Urden MS. Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM – 1B – lactamase – mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria *J Clin Microbiol* 1988;26:1934–1938.
18. Lizardi PM, Guerra CE, Lomeli H, Tussie-Luna I, Kramer FR. Exponential amplification of recombinant- RNA hybridization probes. *Biol Technology* 1988;6:1197–1202.
19. Martel F, Grundemann D, Schomig E. A simple method for elimination of false positive results in RT-PCR. *J Biochem Mol Biol* 2002 Mar 31;35(2):248–50.
20. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997 Sep; 26(3 Suppl 1):43S–47S.
21. Schirm J, van Loon AM, Valentine-Thon E, Klapper PE, Reid J, Cleator GM. External quality assessment program for qualitative and quantitative detection of hepatitis C virus in diagnostic virology. *J Clin Microbiol* 2002 Aug; 40 (8):2973–80.
22. Greer S, Alexander GJ. Viral serology and detection. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995 Dec; 9(4):689–721.

Otrzymano: 2.04.2003 r.

Adres autorów:

Agnieszka Kamińska
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
ul. Pawińskiego 7, Warszawa 02-004
tel. (22) 572 07 09