

Ж.А. Стрибук, Г.И. Вергейчик

**ОСОБЕННОСТИ ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Учреждение Образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), по-прежнему остаются важной проблемой. Папилломавирусная инфекция (HPV-инфекция) занимает особое место среди ИППП, что связано с канцерогенным потенциалом вирусов. Вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска (HPV-HR) являются этиологическим фактором рака шейки матки, от которого ежегодно в мире умирает 270 000 женщин [10].

Традиционно используемый цитологический метод диагностики атипичных клеток в мазке из шейки матки и цервикального канала (РАР-тест) позволяет выявить морфологические маркёры HPV-инфекции лишь в 30-50% случаев. Недостатком этого широко используемого метода диагностики, который на сегодняшний день всё ещё остаётся рекомендуемым ВОЗ стандартом скрининга рака шейки матки, являются широкие пределы чувствительности и специфичности метода, которые составляют 11 - 99% и 14 - 97% соответственно [9]. Проблемы цитологического метода исследования обусловлены множеством причин: некачественным забором материала, неправильной транспортировкой и окрашиванием мазков, квалификацией врача цитопатолога. Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что цитологический метод исследования имеет ряд недостатков и это даёт основания искать новые пути для более совершенных программ диагностики предраковых заболеваний и рака шейки матки. Целесообразно использовать методы, которые позволяют выявлять не только субклинические и клинические проявления HPV-инфекции, а непосредственно ДНК папилломавирусов, что поможет сформировать объективные группы риска по развитию предрака и рака шейки матки. Диспансеризация и лечение данной категории пациенток будет способствовать предупреждению развития злокачественной опухоли шейки матки.

До 90-х годов прошлого века диагностика HPV-инфекции была проблематичной, так как выделение этих вирусов на культуре клеток в лабораторной практике не применяется, а уровень специфических антител в крови крайне низкий вследствие отсутствия этапа виремии в жизненном цикле папилломавирусов. В течение последнего десятилетия лидирующее место в лабораторной диагностике папилломавирусной инфекции заняла полимеразная цепная реакция (ПЦР) в виду ее высокой чувствительности, специфичности и простоты технической процедуры [8, 11].

Известно, что для получения достоверных лабораторных результатов значение имеют все этапы от забора биоматериала до учета результатов. В большинстве пособий по проведению ПЦР-исследований изложены рекомендации по предотвращению появления ложноположительных реакций. О причинах ложноотрицательных результатов информация значительно скуднее. Как правило, большинство ошибок списывается на неудовлетворительное качество тест-систем, потери ДНК на этапе выделения или сбои в работе приборов. Использование экзогенного внутреннего контроля не всегда предотвращает такие результаты, так как он позволяет контролировать только этапы выделения и амплификации.

Целью исследования явилось определить значение методологии отбора биологических образцов и правил их хранения для получения достоверных результатов диагностики HPV-инфекции методом ПЦР.

Материалы и методы исследования

За период с 2001 по 2008 гг. было проведено 4112 исследований на HPV-инфекцию у женщин с различной патологией шейки матки (хронический цервицит, койлоцитоз многослойного плоского эпителия, дисплазия эпителия шейки матки I-III степени тяжести, рак шейки матки). Возраст пациенток варьировал от 16 до 65 лет. Материалом для исследований служили соскобы эпителия и биоптаты шейки матки. Забор материала производился с использованием цитощетки, урогенитального зонда или конхотома на транспортную среду. Доставка образцов осуществлялась в течение нескольких часов после отбора, что исключало потерю ДНК-материала в образцах.

Для постановки реакции использовались коммерческие ПЦР-тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ с электрофоретическим учетом и Real-Time-PCR. В наборах применялся метод одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) в одной пробирке участков ДНК HPV и участка ДНК β -глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контрольного образца (ВКО). ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце. Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. В случаях, если соскоб эпителия забран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток) сигнал амплификации β -глобинового гена будет заниженным.

Амплификация проводилась на приборе «Rotor-Gene-3000». Выделение ДНК производилось несколькими методами: ручным – SDS-метод и сорбцией на силикагеле, и автоматическим – при помощи прибора «Robotics» фирмы «Corbett Research».

Результаты исследования и обсуждения

Достоверные результаты – главная задача любых лабораторных тестов. На основании проведенного исследования было сделано заключение о том, что существенное значение для достижения этих целей имеет правильный забор материала. Использование различных методов контроля качества дает возможность определить оптимальную методику отбора образцов и их хранения [4].

При отборе биологических проб следует учитывать следующее: цели исследования, сроки транспортирования и хранения, предполагаемое содержание биологического материала в исследуемом образце.

Все факторы, влияющие на появление ложнонегативных результатов, можно разделить на несколько групп:

1. Наличие ингибиторов в пробе.

Было отмечено, что образцы с примесью крови в 82,7% проходили как негативные или имели заниженный сигнал ВКО. Использование в тест-системах эндогенного внутреннего контроля позволяет судить о количественном содержании клеток в образце и эффективности этапа выделения. В 4,5% случаев исследуемые образцы содержали избыточное количество слизи. В 79,3% такие пробы давали негатив как по ВКО, так и по искомым маркерам или сигнал ВКО был ниже валидного уровня. Хотя после повторного забора материала без примеси крови и слизи у этих же пациенток, результаты были положительными в 90% случаев. На рисунке 1 представлена фореграмма образца удовлетворительного качества и образца, содержащего слизь и гемоглобин.

При заборе материала из шейки матки для выявления ДНК папилломавирусов необходимо аккуратно соскоблить эксфолиативный клеточный материал и поверхностный эпителий из влажной порции шейки матки, области зоны трансформации (ЗТ) и/или цервикального канала, если соединение многослойного плоского и призматического эпителия смещено в цервикальный канал. При излишках слизи, воспалительного экссудата, крови шейку матки необходимо просушить тампоном. При получении образца желтоватого или розово-красного цвета, пробу необходимо взять повторно. Если при заборе биоматериала не удаётся удалить слизь, то на этапе пробоподготовки необходимо использовать муколизин.

2. Неверный выбор области забора клинического материала.

Когда отбор биоматериала у пациенток с дисплазией или неинвазивной карциномой шейки матки осуществляется не в месте локализации инфекции, образцы дают отрицательный результат по искомой инфекции, хотя отмечается положительный сигнал ВКО, что указывает на наличие клеточного материала в образце, но отсутствие в

нём ДНК HPV. При повторных отборах образцов с использованием дополнительной визуализации эпителия шейки матки у этих же пациенток в 95,8% случаев выявляли ДНК папилломавирусов.

Папилломавирусная инфекция может поражать эпителий шейки матки диффузно или очагово. При диффузной форме отмечается тотальное поражение эпителия влагалищной части шейки матки HPV-инфекцией, в этом случае забор материала трудностей не представляет. При очаговой форме HPV-инфекции концентрация вируса обычно наблюдается в нескольких микроскопических очагах, в которые можно не попасть, если не использовать приёмы дополнительной визуализации с помощью расширенной кольпоскопии. При обработке эпителия шейки матки 3-5% уксусной кислотой удаётся выявить очаги вирусного поражения в виде участков ацетобелого эпителия, нежной мозаики, или симптома «манной крупы» - белые точки соответствуют верхушкам вытянутых сосочков стромы, которые перфорируют неоднородный, но ещё содержащий гликоген эпителий, на вершинах каждого сосочка видны образованные сосудами точки красного цвета [1]. Для того чтобы добиться достоверных результатов клеточный материал для ПЦР необходимо брать из этих патологических участков.

В случае смещения зоны трансформации в цервикальный канал после электроэксцизии шейки матки или при возрастной эпидермизации цервикального канала (клетки ЗТ – частая локализация папилломавирусной инфекции, так как вирусы тропны к молодому незрелому эпителию, локализирующемуся в этой зоне) имеет смысл представить в образец эпителий из цервикального канала.

3. Количество искомой ДНК в образце.

При исследовании необходимо учитывать возможность низкого содержания биологического материала в образцах. В этом случае даже небольшая потеря нуклеиновых кислот может дать ложнонегативный результат. Если в исследуемом образце предполагаемое количество искомой ДНК очень низкое, то при выделении необходимо использовать дополнительные методы концентрирования [5]. Порог чувствительности большинства ПЦР-тест-систем лежит в пределах 10 - 100 гз/мкл. В используемых наборах валидными считаются образцы, содержащие не менее 1000 клеток. Обычно в реакционную смесь вносят 1-10 мкл выделенного образца. Количество исходного материала при выделении, как правило, составляет 100 мкл. Средняя эффективность выделения - 50%. Значит, для обнаружения ДНК-мишени необходимо, чтобы в 1 мл образца содержалось минимум 20 000 копий ДНК искомого агента. Количество вирионов HPV соответствует количеству геномных эквивалентов.

При правильном заборе материала образец имеет вид мутноватой жидкости с хлопьевидным осадком при рассмотрении пробирки в условиях естественного или искусственного освещения. Целесообразно проводить визуальную оценку пробы как доктором, выполняющим забор биоматериала, так и врачом-лаборантом, готовящим образцы для постановки ПЦР.

4. Выбор вида биоматериала.

Материалом для ПЦР-исследований могут служить любые биологические ткани и жидкости. Но при отборе следует учитывать цели исследований. Так, для изучения жизнедеятельности клеток организма биоптаты тканей являются оптимальным материалом. Из них выделяется большое количество ДНК хорошего качества. Но такой материал менее пригоден для диагностики папилломавирусной инфекции, чем соскоб.

Нами были проведены параллельные исследования 50 биоптатов и соскобов из шейки матки у одних и тех же пациенток. Общее количество выделенной тотальной ДНК было выше в образцах биоптатов шейки матки, чем в соскобах. Но сигналы ДНК-мишеней при работе с биоптатами были занижены или отсутствовали при наличии таковых в образцах соскобов этих же пациенток. Объяснить этот факт некачественным выделением нельзя. Во всех образцах сигнал ВКО был четким. Степень чистоты и количество выделенной ДНК контролировалось спектрофотометрически на приборе «Nanodrop» [3].

Жизненный цикл папилломавирусов заключается в том, что они инфицируют клетки незрелого эпителия, но репликация вирусных частиц происходит в дифференцированных клетках поверхностных слоёв многослойного плоского эпителия, там же происходит накопление вирусов в цитоплазме клеток койлоцитов. Соответственно, в материале, полученном при биопсии, который представлен глубокими слоями эпителия и стромой шейки матки, вирусной ДНК меньше, чем в поверхностных слоях эпителия, представленных в образцах, содержащих соскобы. Биопсия шейки матки это инвазивная манипуляция, которая может сопровождаться неприятными ощущениями, болью, кровотечением. Представленный в биоптате тканевый материал содержит недостаточное количество ДНК папилломавирусов, а также требует дополнительного механического воздействия на образец, чтобы разрушить клетки и получить свободную вирусную ДНК, в случае соскобов достаточно заморозить-оттаять образец для разрушения мембраны клеток и получения необходимого количества материала для ПЦР.

5. Состав образца.

Немаловажное значение имеет состав образца. При исследовании на наличие вирусов следует помнить, что содержание бактерий в образце резко снижает сохранность

вирусных нуклеиновых кислот, так как бактерии являются главным источником нуклеаз [6].

Для сохранности первичной концентрации вирусных нуклеиновых кислот необходимо снизить активность нуклеаз. Этого можно достичь путем добавления в пробирку с образцом протеиназы или более простым методом – снижением температуры, например, поместить образцы в термос с хладогенами. Существуют коммерческие транспортные среды с бактериостатиками.

Кроме качества образца для объективных результатов ПЦР имеет значение правильная транспортировка образцов и используемые методы выделения вирусной ДНК.

Отобранные образцы следует в течение рабочего дня доставить в лабораторию. Транспортировка, особенно в теплое время года, должна осуществляться по «холодовой цепи». Следует помнить, что увеличение температуры на 10°C, увеличивает скорость ферментативной реакции в 2-3 раза [2]. Температурный оптимум большинства ферментов находится в пределах 20-40°C. Таким образом, в течение нескольких часов исходная концентрация нуклеиновой кислоты в образце может снизиться в несколько раз из-за действия нуклеаз. А если учесть еще и потери ДНК при выделении (в среднем 20-60%), то конечная концентрация ДНК-мишени может быть ниже порога чувствительности тест-системы. И как итог – ложноотрицательный результат.

Если нет возможности быстрой доставки, при использовании специальных транспортных сред хранить материал можно не более 20 суток при температуре от 2 до 8°C и в течение года при температуре не выше минус 16°C. Допускается однократное замораживание–оттаивание материала. Дальнейшая транспортировка должна осуществляться при температуре хранения образцов. Многократное замораживание–оттаивание недопустимо, так как при этом из разрушенных клеток нуклеиновые кислоты становятся более доступными для действия нуклеаз, которые начинают активизироваться при повышении температуры.

Учитывая широкое распространение генитальной HPV-инфекции и рост заболеваемости раком шейки матки среди женщин молодого репродуктивного возраста, даже в странах, использующих популяционный скрининг рака шейки матки методом PAP-теста, ПЦР – диагностика HPV-HPV на сегодняшний день рассматривается как дополнение или альтернатива традиционному скринингу. Кроме того, метод позволяет контролировать элиминацию HPV-инфекции, после лечения неспецифическими иммуностимуляторами или электроэксцизии шейки матки по поводу дисплазии, неинвазивной или микроинвазивной карциномы шейки матки. Метод ПЦР является необходимым для оценки молекулярно-генетических особенностей HPV-инфекции на

различных этапах научных исследований, что в дальнейшем может выявить новые маркёры вирус-ассоциированного канцерогенеза и позволит прогнозировать развитие рака у здоровых вирусоносителей, а также сформировать профилактические программы для этой категории пациенток.

Выводы

Для получения результатов с высокой степенью достоверности при отборе материала следует придерживаться следующих рекомендаций:

1. В качестве биоматериала наиболее приемлемыми для диагностики HPV-инфекции являются образцы соскобов эпителия шейки матки.
2. Материал следует забирать в месте локализации вирусной инфекции в эпителии шейки матки, при необходимости используя дополнительную визуализацию посредством расширенной кольпоскопии.
3. Образцы не должны содержать примесей крови и слизи. Визуально они представляют собой слегка мутноватую жидкость с хлопьевидным осадком, что указывает на наличие клеточного материала в пробе.
4. Следует помнить о высокой вероятности содержания в образце наряду с вирусами бактерий, присутствие которых резко уменьшает сохранность вирусных нуклеиновых кислот и использовать методы снижения активности бактериальных нуклеаз.
5. Доставку материала в лабораторию целесообразно осуществлять в течение рабочего дня после отбора или образцы необходимо законсервировать.

Литература.

1. Баггиш М. Кольпоскопия. Атлас-справочник. Пер. с англ. – М., «Практика», 2008. – 340 с.
2. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: в 3 т. Т1: Пер с англ. / Под ред. Р.Сопера. - М.: Мир, 1993. - 368с.
3. Дорохов Д.Б., Клоке Э. // Генетика. - 1997.- Т.33. - С. 443-450.
4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ./Под ред. С.Херрингтона, Дж. Макги.-М.: Мир, 1999. - 558с.
5. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа.- Мн.: Юнипол, 2007. - 176с.
6. Прозоров А.А. «Трансформация у бактерий», М.: Наука, 1998. - 256с.
7. Федоров Н.А., Суханов Ю.С., Асади Мобархан А.Х., Артемьев М.И. «Полимеразная цепная реакция», Методическое пособие для начинающих/ Принципы и практические рекомендации для ее постановки с целью детекции микроорганизмов. М.- 1996. - 33с.
8. Bauer H.M., Manos M.M.. PCR detection of genital human papillomavirus // Diagnostic Molecular Microbiology / D.H.Persing (Ed.) – Washington DC, 1993. - 489 p.
9. Fahey M.T., Irwing L., Macaskill P. // Am. J. Epidemiol. – 1995. – Vol. 141, N. 17. – P. 680-689.
10. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0. IARC Press, 2004.
11. Meijer C.J., van den Brule A.J., Shijders P.J.F. et al. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implication for cervical cancer screening // IARC Sci. Publ. – 1992. – Vol. 119. - P. 271–281.

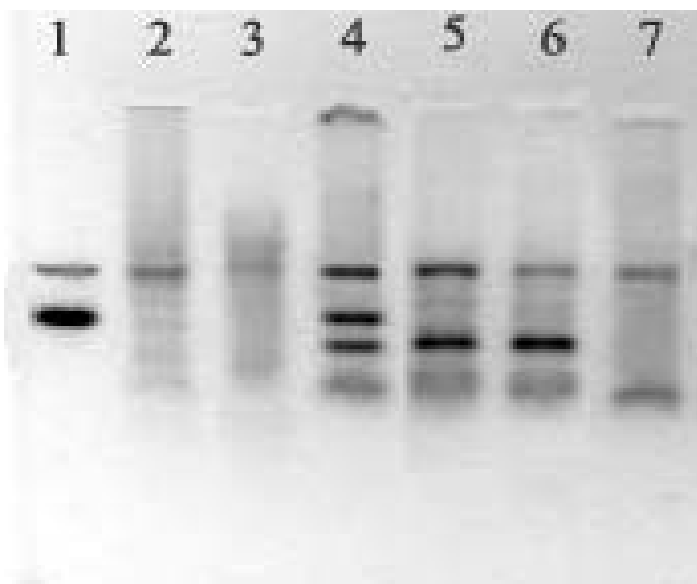


Рис. 1 Результаты электрофореза ПЦР-анализа соскобов эпителия шейки матки, исследованных на HPV-инфекцию.

- 1- Положительный контрольный образец.
- 2- Пациент №1. Образец с большим количеством примеси крови. Сигнал ВКО слабый.
- 3- Пациент №2. Образец с большим количеством примеси слизи. Сигнал ВКО не регистрируется.
- 4- Пациент №1. Повторный забор. Четкий сигнал ВКО и ДНК HPV двух типов.
- 5- Пациент №2. Повторный забор. Четкий сигнал ВКО и ДНК HPV одного типа.
- 6- Положительный образец.
- 7- Отрицательный контрольный образец.

Образцы № 4, 5 повторно отбирались с использованием описанных рекомендаций по забору материала для ПЦР-исследований.

Ж.А. Стрибук, Г.И. Вергейчик

**ОСОБЕННОСТИ ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Учреждение Образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Цель исследования: определить значение методологии отбора биологических образцов и правил их хранения для получения достоверных результатов диагностики HPV-инфекции методом ПЦР.

Методология: проспективное исследование.

Учреждение: Учреждение Образования «Гомельский государственный медицинский университет».

Материалы исследования: определение ДНК HPV в 4112 образцах от пациенток с различной патологией шейки матки (хроническим цервицитом, койлоцитозом многослойного плоского эпителия, эпителиальными дисплазиями I-III степени тяжести, раком шейки матки) в возрасте от 16 до 65 лет.

Методы исследования: ПЦР-диагностика, простая и расширенная кольпоскопия, морфологические методы исследования материала.

Результаты исследования: проведенное исследование продемонстрировало большое значение в получении достоверных результатов ПЦР-диагностики правильного отбора образцов и их хранения. Целый ряд причин, связанных с тактикой забора биоматериала для выявления HPV-инфекции методом ПЦП, может привести к получению ложноотрицательного результата. К ним относятся: состав образца, наличие ингибиторов в пробе, неверный выбор места забора клинического материала, количество искомой ДНК в образце, выбор вида биоматериала.

Заключение: на основании полученных данных можно сделать вывод, что в качестве биоматериала наиболее приемлемыми для диагностики HPV-инфекции являются соскобы эпителия шейки матки. Образцы не должны содержать примесей крови и слизи. Визуально они представляют собой слегка мутноватую жидкость с хлопьевидным осадком, что указывает на наличие клеток в образце. Материал следует забирать в месте локализации вирусной инфекции в эпителии шейки матки, при необходимости используя дополнительную визуализацию посредством расширенной кольпоскопии. Доставку материала в лабораторию целесообразно осуществлять в течение рабочего дня после отбора или образцы необходимо законсервировать.