

Ж.А. Стрибук, Г.И. Вергейчик

Особенности отбора образцов для диагностики папилломавирусной инфекции методом полимеразной цепной реакции

Гомельский государственный медицинский университет

Инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), по-прежнему остаются важной проблемой в гинекологии. Папилломавирусная инфекция (HPV-инфекция) занимает особое место среди ИППП, что связано с канцерогенным потенциалом вируса. Вирусы папилломы человека (HPV-HP) представляют высокий онкогенный риск и являются этиологическим фактором рака шейки матки, от которого ежегодно в мире умирают 270 000 женщин [10].

Традиционно используемый цитологический метод диагностики атипичных клеток в мазке из шейки матки и цервикального канала (PAP-тест) позволяет выявить морфологические маркеры HPV-инфекции лишь в 30–50% случаев. Недостатками этого широко используемого метода диагностики, который на сегодняшний день все еще остается стандартом скрининга рака шейки матки, рекомендуемым ВОЗ, являются широкие пределы чувствительности и специфичности метода, которые составляют 71–99% и 14–97% соответственно [9]. Проблемы цитологического метода исследования обусловлены множеством причин: некачественным забором материала, неправильной транспортировкой и окрашиванием мазков, квалификацией врача-цитопатолога. Цитологический метод исследования имеет ряд недостатков, и это дает основания искать новые пути для более совершенных программ диагностики предраковых заболеваний и рака шейки матки. Целесообразно использовать методы, которые позволяют определять не только субклинические и клинические проявления HPV-инфекции, но и непосредственно ДНК папилломавирусов, что поможет сформировать объективные группы риска по развитию предрака и рака шейки матки. Диспансеризация и лечение данной категории пациенток будут способствовать предупреждению развития злокачественной опухоли шейки матки.

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

Известно, что для получения достоверных лабораторных результатов имеют значение 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 информации значительно меньше. Как правило, большинство ошибок списывается на неудовлетворительное качество тест-систем, потери ДНК на этапе выделения или сбои в работе приборов. Использование же экзогенного внутреннего контроля позволяет контролировать только этапы выделения и амплификации.

Поэтому возникла необходимость определения значения методологии отбора биологических образцов и правил их хранения для получения достоверных результатов диагностики HPV-инфекции методом ПЦР.

За период с 2001 по 2008 г. 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» (Российская Федерация) 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 осуществлялась на приборе «Rotor-Gene-3000». Выделение ДНК производилось несколькими методами: ручным (SDS-метод и сорбцией на силикагеле) и автома-

тическим (при помощи прибора «Robotics» фирмы «Corbett Research»).

На основании проведенного исследования был сделан вывод о том, что существенное значение для достижения достоверных результатов 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 цели исследования, сроки транспортирования и хранения, предполагаемое содержание биологического материала в исследуемом образце.

Все факторы, влияющие на появление ложноотрицательных результатов, можно разделить на несколько групп.

1. Наличие ингибиторов в пробе.

Было отмечено, что образцы с примесью крови в 82,7% случаев проходили как отрицательные 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 отрицательные результаты как по ВКО, так и по искомым маркерам, или сигнал ВКО был ниже валидного уровня. После повторного забора материала без примеси крови и слизи у этих же пациенток результаты были положительными в 90% случаев. На рисунке 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 и крови шейку матки необходимо просушить тампоном. При получении образца желтоватого или розово-красного цвета пробу необходимо взять повторно. Если при заборе биоматериала не удается удалить слизь, то на этапе пробоподготовки следует использовать муколизин.

2. Неверный выбор области забора клинического материала.

Если отбор биоматериала у пациенток с дисплазией или неинвазивной карциномой шейки матки осуществляется не в месте локализации инфекции, образцы дают отрицательный результат по искомой инфекции, несмотря на то что отмечается положительный сигнал ВКО. Это указывает на наличие клеточного материала в образце, но на отсутствие в нем ДНК HPV. При повторных отборах образцов с использованием дополнительной визуализации эпителия шейки матки у этих же пациенток в 95,8% случаев выявляли ДНК HPV.

Папилломавирусная инфекция может поражать эпителий шейки матки диффузно или очагово. При диффузной форме отмечается тотальное поражение эпителия влажной 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 ис-

пользовать приемы дополнительной визуализации с помощью расширенной кольпоскопии. При обработке эпителия шейки матки 3–5%-ной уксусной кислотой удается 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 еще содержащий гликоген эпителий и на вершинах которых видны обра-

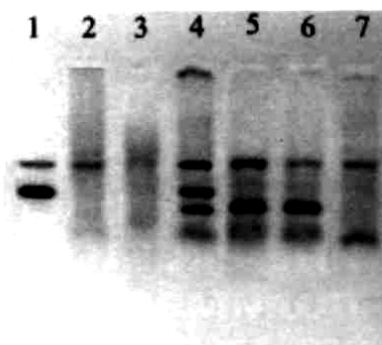
зованные сосудами точки красного цвета [1]. Для того чтобы добиться достоверных результатов, клеточный материал для ПЦР необходимо брать из этих патологических участков.

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 образец эпителия 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 ложноотрицательный 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.

В случае правильного забора при рассмотрении пробирки в условиях естественного или искусственного освещения мате-



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 и 5 повторно отбирались с использованием описанных рекомендаций по забору материала для ПЦР-исследований

риала образец имеет вид мутноватой жидкости с хлопьевидным осадком. 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 больше 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 материала нельзя, так как во всех образцах сигнал ВКО был четким. Степень чистоты и количество выделенной ДНК контролировались спектрофотометрически на приборе «Nanodrop».

Жизненный цикл папилломавирусов заключается в том, что они инфицируют клетки незрелого эпителия, но репликация вирусных частиц происходит в дифференцированных клетках поверхностных слоев многослойного плоского эпителия, там же происходит накопление вирусов в цитоплазме клеток койлоцитов. 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 его 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 сохранения первичной концентрации вирусных нуклеиновых кислот необходимо снизить активность нуклеаз. Этого можно достичь путем добавления в пробирку с образцом протеиназ или снижением температуры, например поместить образцы в термос с хладагентами. Существуют коммерческие транспортные среды с бактериостатиками.

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

Отобранные образцы следует в течение рабочего дня до-

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

Если нет возможности быстро доставить материал, при использовании специальных транспортных сред его можно хранить не более 20 суток при температуре от 2 до 8 °С и в течение года – при температуре не выше –16 °С. Допускается однократное замораживание–оттаивание материала. Дальнейшая транспортировка должна осуществляться при температуре хранения образцов. Многократное замораживание–оттаивание недопустимо, так как при этом нуклеиновые кислоты из разрушенных клеток 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 маркеры вирус-ассоциированного канцерогенеза и позволит прогнозировать развитие рака у здоровых вирусоносителей, а также разработать профилактические программы для этой категории пациенток.

Таким образом, 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 ис-

пользовать методы снижения активности бактериальных нуклеаз.

5. Доставку материала в лабораторию целесообразно осуществлять в течение рабочего дня после отбора или законсервировать образцы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багшиш М. Кольпоскопия. Атлас-справочник / пер. с англ. – М.: Практика, 2008.
2. Брин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: в 3 т. – Т. 1 / под ред. Р. Сонера. – М.: Мир, 1993.
3. Дорохов Д.Б., Клоке Э. // Генетика. – 1997. – Т. 33. – С. 443–450.
4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999.
5. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. – Минск: Юнипол, 2007.
6. Прозоров А.А. Трансформация у бактерий. – М.: Наука, 1998.
7. Федоров Н.А., Суханов Ю.С., Асади Мобархан А.Х. и др. Полимеразная цепная реакция: методическое пособие для начинающих. – М., 1996.
8. Vaier H.M., Manos M.M. Diagnostic Molecular Microbiology. – Washington DC, 1993.
9. Fahey M.T., Inwing L., Macaskill P. // Amer. 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. // IARC Sci. Publ. – 1992. – Vol. 119. – P. 271–281.