

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

5 ноября 2010 г.

**МЕТОДИКА ОТБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук., доц. Вергейчик Г.И., Стрибук Ж.А.,
д-р. мед. наук. Еремин В.Ф.

Гомель 2010

Цель: снизить уровень ложно-негативных результатов при определении ДНК вирусов папилломы человека высокого и низкого онкогенного риска методом ПЦР путем организации правильного отбора биологического материала у мужчин и женщин, его хранения и транспортировки.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ:

1. Типовая ПЦР-лаборатория — для проведения полимеразной цепной реакции.

1.1. Реактивы:

- тест-системы для определения ДНК вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска с использованием эндогенного внутреннего контроля (β -актин, β -глобин).

- тест-системы для определения ДНК вирусов папилломы человека низкого онкогенного риска.

2. Латексные перчатки.

3. Гинекологические зеркала.

4. Одноразовые цитощетки или одноразовые ложки Фолькмана.

5. Пробирки типа «эппендорф» с транспортной средой, состоящей из физиологического раствора и биостатиков.

6. Анатомический пинцет.

7. Марлевые шарики.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:

1. Женщины с фоновой, предраковой патологией, раком шейки матки, вульвы, влагалища.

2. Женщины, планирующие беременность.

3. Мужчины с генитальными, перианальными папилломами.

4. Мужчины — партнеры женщин, инфицированных папилломавирусами.

5. Клинически здоровые мужчины и женщины, желающие провести исследование.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

При отборе биологического материала у женщин

1. Шейка матки обнажается в зеркалах, ватным или марлевым тампоном удаляют слизь, поверхность шейки матки осушают.

2. Одноразовой ложкой Фолькмана осуществляют соскоб поверхностных слоев эпителия всей влагалищной порции шейки матки, обязательно из зоны соединения многослойного плоского и призматического эпителия в пробирку типа «эппендорф» с транспортной средой, состоящей из физиологического раствора и биостатиков.

3. При эпидермизации цервикального канала (смещении зоны соединения МПЭ и ПЭ в цервикальный канал) дополнительно можно сделать отбор материала из цервикального канала.

4. При отборе материала из зоны папилломатоза вульвы, влагалища и перианальной зоны соскоб выполняют из поверхности папиллом, после предварительного устранения слизи марлевым тампоном.

5. При полифокальном поражении (на шейке матки и на вульве) отбор материала из шейки матки и из вульвы осуществляется в отдельные пробирки.

6. При контроле элиминации папилломавирусов из эпителия после исчезновения клинических проявлений папилломатоза отбор материала производят из неизмененного эпителия вульвы, влагалища и перианальной зоны.

7. Обильной примеси слизи и крови в пробирке быть не должно. Содержимое пробирки представлено однородной хлопьевидной взвесью белого, светло-желтого или светло-розового цвета.

8. При необходимости проведения исследования не только на определение ДНК вирусов папилломы человека, но и других возбудителей отбор материала осуществляется в одну пробирку.

При отборе биологического материала у мужчин

1. Обнажается головка полового члена до венечной борозды, осуществляется соскоб эпителия головки полового члена и зоны венечной борозды одноразовой ложкой Фолькмана в пробирку типа «эппендорф» с транспортной средой.

2. Для выявления ДНК HPV забор материала не надо производить из уретры, вирус папилломы человека не персистирует в призматическом эпителии уретры.

3. При наличии папиллом на коже лобка, перианальной зоны, внутренней поверхности бедер необходимо делать соскоб из поверхности папиллом.

4. При необходимости проведения исследования не только на определение ДНК вирусов папилломы человека, но и других возбудителей отбор материала осуществляется из поверхности головки пениса, зоны венечной борозды и дополнительно из уретры в одну пробирку (например, на ВПЧ, хламидии, уреаплазму).

В таблице 1 указаны особенности отбора биологического материала у мужчин и женщин при выявлении ДНК HPV методом ПЦР.

Таблица 1

Особенности отбора биологического материала в зависимости от пола пациента и обследуемого органа для выявления ДНК HPV методом ПЦР

Пол	Обследуемый орган	Вид биологического материала	Локализация отбора материала в обследуемом органе	Условия хранения
Женский	Шейка матки	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	1. Обязательно из влажной порции шейки матки (из многослойного плоского эпителия и зоны соединения МПЭ и ПЭ). 2. Дополнительно из цервикального канала в случае смещения зоны трансформации в цервикальный канал (эпидермизация цервикального канала)	При комнатной температуре –6 ч. При температуре 2-8 °С–неделя При температуре не выше -16 °С–1 мес. При температуре ниже -20–60 °С–3 мес. и более.

Пол	Обследуемый орган	Вид биологического материала	Локализация отбора материала в обследуемом органе	Условия хранения
Женский	Вульва	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	1. Из неизмененных участков МПЭ вульвы. 2. Из зоны генитальных папиллом, локализующихся на вульве.	
Женский	Влагалище	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	1. Из неизмененных участков стенки влагалища. 2. Из зоны генитальных папиллом, локализующихся на стенках влагалища.	
Женский	Перианальная зона и анальный отдел прямой кишки	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	1. Из неизмененных участков перианальной зоны и стенок анального отдела прямой кишки (после предварительного очищения кишечника). 2. Из зоны генитальных папиллом, локализующихся в перианальной зоне или на стенках анального отдела прямой кишки.	
Мужской	Пенис	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	1. Обязательно из плоского эпителия, покрывающего головку полового члена снаружи, из зоны венечной борозды. Определение ДНК HPV в эпителии уретры целесообразно только в тех случаях, когда видимый очаг поражения (папиллома, лейкоплакия) уходит в уретру!	
Мужской	Перианальная зона или анальный отдел прямой кишки	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	Из зоны генитальных папиллом в перианальной зоне или анальном отделе прямой кишки	
Мужской	Генитальные папилломы	Соскоб поверхностных слоев многослойного плоского эпителия	Из поверхности папиллом	

При необходимости провести отбор материала для определения ДНК HPV из нескольких органов одновременно у одной пациентки (например, из шейки матки и вульвы) биологические образцы берут разными ложками Фолькмана, в разные промаркированные пробирки.

ВОЗМОЖНЫЕ СЛОЖНОСТИ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

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

1. Наличие ингибиторов в пробе

Образцы с обильным содержанием крови (по концентрации гемоглобина близки к цельной крови) и слизи могут проходить как негативные или имеют заниженный сигнал ВКО.

При излишках слизи, воспалительного экссудата, крови зону отбора биологического материала необходимо просушить тампоном.

При получении образца мутно-желтого или красного цвета, пробу желательно взять повторно.

Если при заборе биоматериала не удастся удалить слизь, то на этапе пробоподготовки необходимо использовать муколизин. Если образец содержит высокое содержание крови на этапе пробоподготовки необходимо использовать специальные способы выделения нуклеиновых кислот.

2. Неверный выбор области забора клинического материала

Когда отбор биоматериала 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 ДНК HPV в нем отсутствует.

Обязательно в образец должен войти материал из влагалищной порции шейки матки и зоны соединения многослойного плоского и призматического эпителия на шейке матки.

В случае смещения зоны трансформации в цервикальный канал после электроэксцизии шейки матки или при возрастной эпидермизации цервикального канала (клетки 3Т — частая локализация папилломавирусной инфекции, так как вирусы тропны к молодому незрелому эпителию, локализуемому в этой зоне) имеет смысл представить в образец эпителий из цервикального канала.

При отборе биологического материала из пениса у мужчин возникает традиционная ошибка — соскоб берут из уретры, однако HPV-инфекция у мужчин локализуется в МПЭ головки полового члена и в зоне венечной борозды после ее обнажения от крайней плоти.

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.

При правильном заборе материала образец имеет вид мутноватой жидкости белого, светло-желтого или светло-розового цвета с хлопьевидным осадком при рассмотрении пробирки в условиях естественного или искусственного освещения.

Целесообразно проводить визуальную оценку пробы как врачом, берущим биоматериал, так и врачом-лаборантом, готовящим образцы для постановки ПЦР.

4. Выбор вида биоматериала

При отборе биологического материала для ПЦР следует учитывать цели исследований.

Рекомендуемый для выявления ДНК HPV биологический материал — соскобы многослойного плоского эпителия.

Биоптаты менее пригодны для диагностики папилломавирусной инфекции, чем соскоб, так как представленный в биоптате тканевый материал содержит недостаточное количество ДНК папилломавирусов и требует дополнительного механического или химического 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

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.

Для сохранности первичной концентрации вирусных нуклеиновых кислот необходимо снизить активность нуклеаз. Этого можно достичь путем добавления в пробирку с образцом протеиназ или более простым методом — снижением температуры, поместив образцы в термос с хладагентами. Существуют коммерческие транспортные среды с бактериостатиками.

6. Хранение и правила транспортировки образцов

Кроме качества образца для объективных результатов ПЦР имеет значение правильная транспортировка образцов.

Отобранные образцы следует в течение рабочего дня доставить в лабораторию.

Транспортировка, особенно в теплое время года, должна осуществляться по «холодовой цепи». Повышение температуры на 10 °С увеличивает скорость ферментативной реакции в 2–3 раза. 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. 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 сут 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.

Многokратное замораживание-оттаивание недопустимо, так как при этом из разрушенных клеток нуклеиновые кислоты становятся более доступными для действия нуклеаз, которые начинают активизироваться при повышении температуры.

7. Интерпретация и оценка результатов ПЦР при использовании наборов реагентов «АмплиСенс»

Результаты учитываются и интерпретируются на основании наличия/отсутствия специфических продуктов амплификации.

Таблица 2

Возможные варианты результатов амплификации их интерпретация

ВКО (ДНК β- глобинового гена)	ДНК L1-гена HPV (исследуемый образец)	К+ (ПЦР+)*	К- (ПЦР-)*	Оценка результатов	Примечание
+	+	+	-	Результат достоверен, ДНК HPV выявлена	
+	-	+	-	Результат достоверен, ДНК HPV не выявлена	
-	+	+	-	Результат может быть учтен, ДНК HPV выявлена	Возможно, низкое количество эпителиальных клеток
-	-	+	-	Результат недостоверен, повторить анализ, начиная с этапа выделения**	Нарушена технология выделения или присутствие ингибиторов в образце

Продолжение табл. 2

ВКО (ДНК β-глобинового гена)	ДНК L1-гена НRV (исследуемый образец)	К+ (ПЦР+)*	К- (ПЦР-)*	Оценка результатов	Примечание
-	-	-	-	Результат недостоверен, повторить анализ, начиная с этапа выделения	Тест-система не пригодна к использованию или не работает амплификатор
+	+/-	-	-	Результат не подлежит учету, повторить амплификацию с другим контролем ПЦР	Дегградация положительной контрольной ДНК
+	+/-	-	+	Результат не подлежит учету, повторить амплификацию	Возможно, были перепутаны контроли при внесении в амплификационные пробирки
-	-	+	+	Результат не подлежит учету, повторить амплификацию с другими контролями	Признаки контаминации
+	+	+	+	Результат не подлежит учету. Провести генеральную уборку, повторить анализ с новыми тест-системами	Контаминация

* К+ и К-, входящие в комплект тест-системы, контролируют только этап амплификации.

** при повторном аналогичном результате необходимо произвести повтор забора материала.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ «МЕТОДИКИ ОТБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ»

Вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска (HPV-HR) являются этиологическим фактором рака шейки матки (РШМ), от которого ежегодно в мире умирает 270000 женщин.

До 90-х гг. 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) ввиду ее высокой чувствительности, специфичности и простоты технической процедуры.

Учитывая широкое распространение генитальной HPV-инфекции и рост заболеваемости раком шейки матки среди женщин молодого репродуктивного возраста, ПЦР-диагностика вируса папилломы рассматривается как дополнение или альтернатива ранней диагностики цервикального рака и предраковых заболеваний шейки матки во многих странах мира. Кроме того, ПЦР позволяет контролировать элиминацию HPV-инфекции после неспецифической иммунотерапии или хирургического лечения дисплазии, неинвазивной или микроинвазивной карциномы шейки матки. На сегодняшний день результаты ПЦР-диагностики являются равноценными диагностическими критериями, а в некоторых случаях даже более информативными и важными, чем результаты, полученные при гистологическом и цитологическом методе, что заставляет предъявлять высокие требования к осуществлению этого метода.

Известно, что для получения достоверных лабораторных результатов значение имеют все этапы от отбора биоматериала до учета результатов.

В большинстве пособий по проведению ПЦР 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 создания инструкции явилось формирование методики отбора биологических образцов и правил для получения достоверных результатов диагностики HPV-инфекции методом ПЦР.