

В помощь практическому врачу

© КАПТИЛЬНЫЙ В.А., 2016
УДК 618.1-002-022-071:577.2.083

Капительный В.А.

МЕТОДИКА ВЗЯТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ (ПЦР-ДИАГНОСТИКА)

ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России, 119991, г. Москва

Для корреспонденции: Капительный Виталий Александрович — канд. мед. наук, вед. научн. сотр. научно-исследовательского отдела женского здоровья НИЦ, ассистент каф. акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 1imgmu@mail.ru

Обзор описывает метод диагностики с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики) инфекционных заболеваний у пациентов в современной акушерско-гинекологической практике. Особое внимание уделено патогенам урогенитального тракта, подлежащим диагностике методом амплификации нуклеиновых кислот. Описана подготовка к исследованию, цели, технология проведения амплификации. Показана разница в определении ДНК и РНК патогена. Прилагаемые фотографии подробно демонстрируют все этапы получения соскобов из урогенитального тракта.

Ключевые слова: ПЦР-диагностика; шейка матки; вульвовагинальная инфекция; патогены урогенитального тракта.

Для цитирования: Капительный В.А. Методика взятия биологического материала для молекулярно-биологического метода исследования (ПЦР-диагностика). *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2016; 3(3): 156—160.
DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2016-3-3-156-160>

Капительный В.А.

SAMPLE BIOLOGICAL MATERIAL OPERATING PROCEDURE FOR THE METHOD OF MOLECULAR-BIOLOGICAL TECHNIQUES (PCR DIAGNOSTICS)

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation

Review describes a method of diagnostics with the use of the polymerase chain reaction (PCR diagnostics) of infections in patients in modern obstetric-gynecological practice. Particular attention is paid to urogenital tract pathogens to be diagnosed by the method of nucleic acid amplification. There are described the preparation for the study, purposes, the technology of amplification procedure. There is shown the difference in the detection of the DNA and RNA pathogen. The presented photographs show in detail all the stages of obtaining scrapings from the urogenital tract.

Keywords: PCR diagnostics; Cervix; vulvovaginal infections; pathogens of the urogenital tract.

For citation: Kaptilnyy V.A. Sample Biological Material Operating Procedure for the method of molecular-biological techniques (PCR diagnostics). *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal*. 2016; 3(3): 156—160. (In Russ.).
DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2016-3-3-156-160>

For correspondence: Valery A. Kaptilny, MD, PhD, leading researcher of Research Department of Women's Health of Research Center, Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology No1 of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; e-mail: 1imgmu@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 15.09.2016
Accepted 27.09.2016

Показания: урогенитальная инфекция в акушерстве и гинекологии, скрининговое обследование.

Цель: выявление наличия генетического материала микроорганизмов путем амплификации нуклеиновых кислот. Данный метод, как правило, используется в диагностике микроорганизмов, не культивируемых на стандартных питательных средах или требующих специфических питательных сред, при клинических формах инфекции или при бессимптомном носительстве. Также метод уникален в диагностике вирусных ДНК/РНК.

Технология амплификации. Амплификация нуклеиновых кислот объединяет группу методов, использующих в качестве мишени короткий участок ДНК или РНК, уникальный для того или иного вида возбудителя, который с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров энзиматически многократно копируется (амплифицируется), причем накопление такого продукта происходит в геометрической прогрессии, по экспоненциальному механизму. При этом даже при наличии минимального исходного количества возбудителя (теоретически — одной копии его генома) в резуль-

тате реакции амплификации происходит накопление продукта реакции, превышающее исходное количество фрагментов генома в миллионы и миллиарды раз.

На основе технологии SDA (Strand Displacement Amplification) выпускаются тест-системы для диагностики ДНК возбудителей. Для выявления РНК выпускаются тест-системы на основе реакции транскрипционной амплификации (Transcription mediated amplification — ТМА). Диагностическая чувствительность данных тестов находится в пределах 85—98%, а чувствительность тестов последнего поколения вплотную приближается к 100%.

Использование при диагностике бактериальных инфекций рибосомной РНК может давать некоторые преимущества. Во-первых, количество копий рибосомной РНК, входящей в состав рибосом, может достигать от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч на клетку, обеспечивая даже при минимальной концентрации бактериальных клеток в пробе достаточно высокую концентрацию мишеней для амплификации. Во-вторых, РНК гораздо менее стабильна по сравнению с ДНК. Например, ДНК *Ch. trachomatis* благодаря своей стабильности может достаточно долго выделяться из урогенитального тракта после успешно проведенной терапии, соответственно контроль излеченности рекомендовано проводить через 3—4 нед после окончания лечения. В то же время РНК достаточно быстро деградирует при гибели и разрушении клетки, поэтому на основании РНК-диагностики можно более точно судить о наличии или отсутствии жизнеспособных возбудителей и текущей инфекции. Кроме того, результаты диагностики РНК могут более адекватно отражать эффективность проводимой антибактериальной терапии. Показано, что РНК *Ch. trachomatis* не определялась ни у одного больного через неделю после окончания терапии, в то время как ДНК обнаруживалась у некоторых больных на протяжении еще двух-трех недель.

Также широко применяется метод количественной ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR), или ПЦР в реальном времени, он используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР-продукта в каждом цикле реакции, что позволяет получить количественную оценку возбудителя, что может быть использовано при оценке взаимоотношений в микробных ассоциациях.

Подготовка к исследованию. Специальная подготовка не требуется. При взятии биологического материала необходимо учитывать тканевую тропность определяемого патогена, т. е. отделяемое или соскоб должны быть произведены из той среды или того вида эпителия, где данный патоген способен реализовать свои патогенные свойства, в первую очередь — инвазивно-адгезивные. Например, *Tr. vaginalis* необходимо определять во влагалищном отделяемом (взятие биологического материала производится из заднего свода влагалища), а *Ch. trachomatis* — из цервикального канала и уретры.

Объект исследования. Вопрос об объеме исследования является наиболее неоднозначным и дискуссионным. Вместе с тем доказано, что данный метод является суперчувствительным и суперспецифичным, что подтверждено многими исследователями. Как указывалось выше, диагностика РНК возбудителя является более чувствительной по сравнению с ДНК. Однако мнение о том, что ПЦР-диагностика, как следствие вышеназванного факта, дает множество ложноположительных результатов, нельзя считать правильным. Любой клиницист должен четко понимать, что ДНК/РНК какого-либо микроорганизма или вируса либо присутствует в образцах биологического материала, либо нет. Ложноположительный результат — это либо неправильное использование данного метода диагностики, либо неправильная трактовка результата исследования. Самая частая ошибка — это неоправданное расширение спектра диагностики микроорганизмов.

В клинической практике и лабораторной диагностике необходимо понимание нескольких фактов: какой микроорганизм, из какого локуса и каким лабораторным методом оптимально диагностировать в конкретной клинической ситуации. Не менее важным остается понимание вопросов медицинской экологии и клинической микробиологии — типа взаимодействия микро- и макроорганизма в данном биологическом локусе: один и тот же микроорганизм в разных биологических нишах проявляет совершенно различные свойства: от взаимовыгодных до патогенных. Например, нахождение кишечной палочки в кишечнике является ярким примером мутуализма, когда ее присутствие является обязательным условием для существования макро- и микроорганизма. Однако при смещении биотопа и выраженном обсеменении, например, влагалища, кишечная палочка может проявлять патогенные свойства, что является примером *условно-патогенного взаимодействия*. Основные типы взаимодействия макро- и микроорганизма применительно к урогенитальному тракту представлены в таблице.

Переходя к спектру обследования молекулярно-биологическим методом, следует остановиться на целесообразности его использования в акушерско-гинекологической практике. Как указывалось выше, данный метод оптимален для применения в тех случаях, когда альтернативные методы диагностики трудоемки или априори невозможны. Например, *Neisseria gonorrhoeae* не культивируется на обычных питательных средах, для ее роста необходима т. н. «шоколадная» среда. *Chlamydia trachomatis*, как внутриклеточный патоген, требует для культивирования клеточную суспензию. Обнаружение *Mycoplasma genitalium* на данном этапе невозможно каким-либо альтернативным методом, кроме ПЦР-диагностики. *Trichomonas vaginalis* как представитель простейших представляет ряд сложностей при использовании стандартной световой микроскопии: при высушивании образца клинического материала, нанесенного на стекло, *Trichomonas vaginalis*

Микроорганизмы, типы взаимодействия

Тип биотической связи	Патогенные		Непатогенные	
	абсолютные патогены	условно-патогенная флора	комменсалы	амениализм, антибиоз
При каких условиях вызывают заболевание	Всегда вызывают заболевание (обнаружение данных представителей означает наличие заболевания)	Только при определенных условиях могут быть причиной заболевания	Никогда не вызывают заболевания Микроорганизм извлекает пользу от взаимоотношения с макроорганизмом, последний, в свою очередь, не получает ни пользы, ни вреда	Тип межвидовых взаимоотношений, при котором один вид, именуемый <i>аменисалом</i> , претерпевает угнетение роста и развития, а второй, именуемый <i>ингибитором</i> , таким испытаниям не подвержен
Подлежат ли качественному определению	Да	Нет	Не подлежат диагностике. Исследование данных представителей рассматривается как научный эксперимент	Подлежат качественному анализу (ингибиторы)
Виды микроорганизмов	Хламидия, бледная трепонема, гонококк, трихомонада, микоплазма гениталиум	Кишечная палочка, клебсиелла, протей, кандиды (во влагалище), уреоплазма (в уретре)	Уреоплазма (в генитальном тракте), <i>Endamoeba coli</i> , <i>Iodamoeba butschlii</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Enteromonas hominis</i> (в кишечнике)	<i>Lactobacillus spp.</i> ингибирует рост сопутствующей микрофлоры (не путать с конкуренцией, когда обе популяции отрицательно влияют друг на друга)

теряет свои морфологические свойства, что затрудняет обнаружение данного возбудителя. Этот патоген оптимально визуализируется в образцах нативного материала, смешанного с каплей физраствора. Таким образом, метод ПЦР-диагностики в ряде случаев является приоритетным по отношению как к микроскопическому, так и к бактериологическому методу.

Переходя непосредственно к спектру диагностики патогенов урогенитального тракта с определением ДНК возбудителя, необходимо конкретизировать возможный результат исследования: при выявлении ДНК ответ является *дискретным*, т. е. генетический материал либо обнаружен, либо нет. Таким образом, условно-патогенная флора не подлежит диагностике данным методом, поскольку может наблюдаться у абсолютно здорового человека, не вызывая заболевания. Обнаружение ДНК, например, кишечной палочки, гарднереллы или дрожжеподобных грибов рода кандиды не является маркером патологического процесса во влагалище, а по своей сути становится диагностическим тупиком.

Таким образом, только *абсолютные патогены* (обнаружение которых всегда означает наличие заболевания) подлежат диагностике данным дискретным методом. Абсолютными патогенами урогенитального тракта являются *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*.

В свою очередь, ряд клинических ситуаций позволяют врачу расширить спектр диагностики с применением полимеразной цепной реакции. Например, идиопатические формы женского бесплодия или обнаружение ту-боовариальных образований, не поддающихся терапии

стандартными схемами антибактериальных препаратов, позволяют врачу диагностировать ДНК *Mycobacterium tuberculosis* для исключения генитального туберкулеза (стандартом обследования будет являться аспират из полости матки на высоте менструального кровотечения). Также при обнаружении на коже или слизистых урогенитального тракта изъязвления неуточненной этиологии врач может диагностировать ДНК *Treponema pallidum*, что имеет первостепенное значение в диагностике первичного серонегативного сифилиса, когда стандартные серологические методы неинформативны.

Для улучшения перинатальных исходов при беременности большое прогностическое значение приобретает

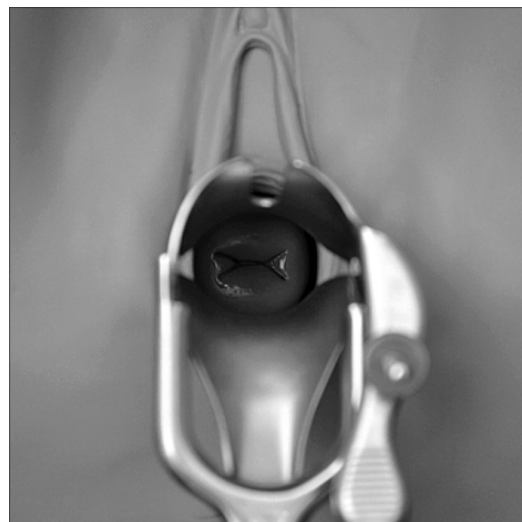


Рис. 1. Шейка матки выведена в зеркалах. Видны передняя, задняя губа шейки матки, щелевидный наружный зев.

В помощь практическому врачу

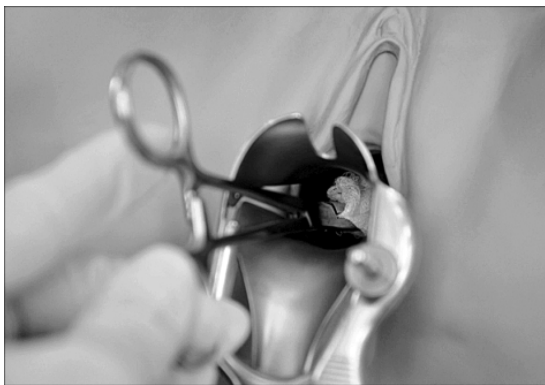


Рис. 2. Удаление цервикальной слизи и влагалищных выделений с поверхности шейки матки стерильным марлевым тампоном.

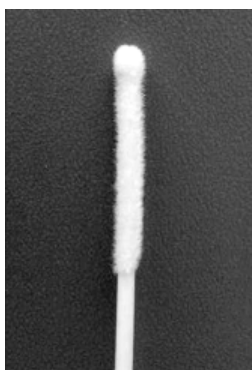


Рис. 3. Зонд урогенитальный универсальный (тип А), обладает мягкой текстурой. Предпочтителен для молекулярно-биологического метода исследования.

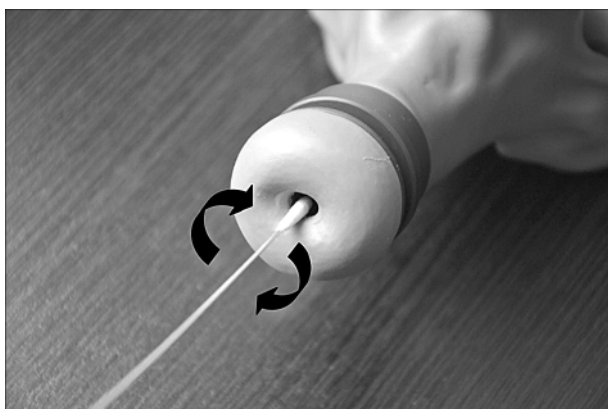


Рис. 4. Взятие соскоба из цервикального канала.



Рис. 5. Мини-пробирка типа «Эппендорф» используется для ПЦР-диагностики.

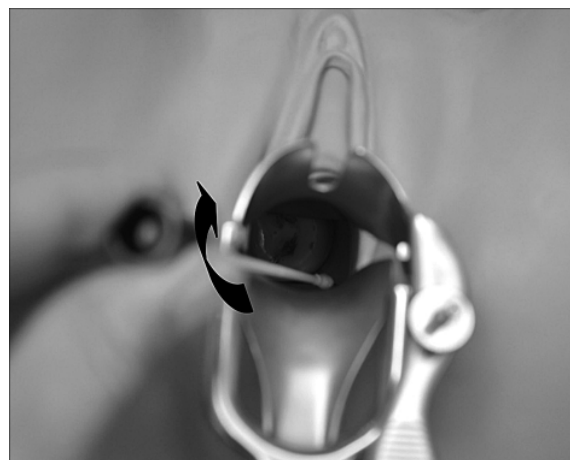


Рис. 6. Взятие отделяемого из влагалища. Материал берется из заднего, бокового и переднего свода.



Рис. 7. Массаж уретры (уретрального кия влагалища) перед взятием биоматериала из уретры.



Рис. 8. Положение руки врача при массаже уретры на сагитальном разрезе.

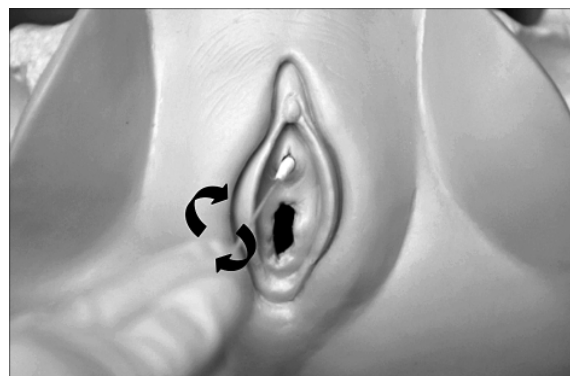


Рис. 9. Получение соскоба из уретры.

бессимптомное бактериальное носительство *Listeria monocytogenes* и *Streptococcus agalactiae*. С учетом высокого риска интранатального инфицирования плода и неблагоприятных исходов беременности, наибольшую опасность представляет *Streptococcus agalactiae* (являющийся причиной неонатального менингита, пневмонии и сепсиса), который также может быть диагностирован молекулярно-биологическими методами.

Таким образом, применение метода полимеразной цепной реакции является неотъемлемой частью в современной лабораторной диагностике в акушерстве и гинекологии; рациональное использование данного метода предполагает диагностику абсолютных патогенов урогенитального тракта.

Техника проведения. Шейка матки обнажается в зеркалах (рис. 1). Необходимым условием является удаление слизи и влагалищных выделений с влажной порции шейки матки (рис. 2). Взятие биологического материала проводится только после визуальной оценки шейки матки! Необходимо уточнить, что метод взятия материала — соскоб. Взятие образцов производится относительно жесткой щеткой, чтобы получить помимо свободного отделяемого клетки эпителия. Это является необходимым условием для диагностики внутриклеточных патогенов (*Chlamydia trachomatis*).

Перед взятием соскоба из цервикального канала предварительно стерильным марлевым тампоном удаляют выделения и слизь с шейки матки (см. рис. 2), мягкую щетку (рис. 3) или ложку Фолькмана вводят в цервикальный канал на глубину до 1—3 см, прокручивают вокруг своей оси 2—3 раза (рис. 4).

Образец биоматериала вносят в мини-пробирку типа «Эппендорф» (рис. 5) методом суспензирования.

Свободное отделяемое из влагалища берется любым из перечисленных расходных материалов, взятие производится из заднего, переднего и боковых сводов (рис. 6). Полученный материал аналогичным образом переносится в мини-пробирку.

Перед получением соскоба из уретры рекомендуется произвести ее массаж — производят 2—3 массирующих движения к наружному отверстию уретры по уретральному килу влагалища (рис. 7, 8). Перед массажем уретры необходимо также протереть наружное отверстие уретры стерильным марлевым тампоном.

Затем выполняют соскоб из уретры (рис. 9).

В заключение необходимо напомнить о корректной и своевременной маркировке всех полученных образцов биологического материала и заполнении бланков-направлений для лаборатории.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Радзинский В.Е. (ред.). *Гинекология: Практикум*. М.: 2010.
2. Кулаков В.И., Савельева Г.М., Манухин И.Б. (ред.). *Гинекология: Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

3. Капительный В.А., Беришвили М.В., Мурашко А.В. *Акушерство и гинекология. Практические навыки и умения с фантомным курсом: Учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
4. Капительный В.А., Беришвили М.В., Мурашко А.В. *Методические рекомендации по практическим навыкам и умениям в акушерстве и гинекологии: Учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
5. Капительный В.А., Беришвили М.В., Мурашко А.В. *Схема написания истории родов: Учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
6. Кулаков В.И. *Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
7. Карпищенко А.П. (ред.). *Медицинская лабораторная диагностика. Программы и алгоритмы*. СПб.: Интермедика; 2010.
8. Кулаков В.И., Прилепская В.Н. (ред.). *Практическая гинекология: Клинические лекции*. 4-е изд. М.: МЕДпресс-информ; 2008.
9. Радзинский В.Е. *Руководство к практическим занятиям по гинекологии: Учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
10. Савельева Г.М., Бреусенко В.Г. (ред.). *Гинекология: Учебник для студентов медицинских вузов*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
11. Савельева Г.М. *Гинекология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
12. Серова В.Н., Сухих Г.Т. *Акушерство и гинекология: Клинические рекомендации*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
13. Цвелев Ю.В., Кира Е.Ф. *Руководство к практическим занятиям по гинекологии*. СПб.: Фолиант; 2009.
14. Oyelowo T., Urbano R. et al. *Mosby's Guide to Women's Health: A Handbook for Health Professionals*. St. Louis: Mosby Elsevier; 2007.

REFERENCES

1. Radzinskiy V.E. (Ed.). *Gynecology: Practical Work. [Ginekologiya: Praktikum]*. Moscow; 2010. (in Russian)
2. Kulakov V.I., Savel'eva G.M., Manukhin I.B. (Eds). *Gynecology: National Leadership. [Ginekologiya: Natsional'noye rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
3. Kapitil'nyy V.A., Berishvili M.V., Murashko A.V. *Obstetrics and Gynecology. Practical Skills with Phantom Course: Textbook. [Akusherstvo i ginekologiya. Prakticheskiye navyki i umeniya s fantomnym kursom: Uchebnoye posobiye]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
4. Kapitil'nyy V.A., Berishvili M.V., Murashko A.V. *Methodical Recommendations for Practical Skills in Obstetrics and Gynecology: Textbook. [Metodicheskiye rekomendatsii po prakticheskim navykam i umeniyam v akusherstve i ginekologii: Uchebnoye posobiye]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
5. Kapitil'nyy V.A., Berishvili M.V., Murashko A.V. *Driving Writing Childbirth Stories: Textbook. [Skhema napisaniya istorii rodov: Uchebnoye posobiye]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
6. Kulakov V.I. *Guidelines for Outpatient Care in Obstetrics and Gynecology. [Rukovodstvo po ambulatorno-poliklinicheskoy pomoshchi v akusherstve i ginekologii]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
7. Karpishchenko A.P. (Ed.). *Medical Laboratory Diagnostics. Programs and Algorithms. [Meditsinskaya laboratornaya diagnostika. Programmy i algoritmy]*. St. Petersburg: Intermedika; 2010. (in Russian)
8. Kulakov V.I., Prilepskaya V.N. (Eds). *Practical Gynecology: Clinical Lectures. [Prakticheskaya ginekologiya: Klinicheskiye lektsii]*. 4-th Ed. Moscow: MEDpress-inform; 2008. (in Russian)
9. Radzinskiy V.E. *Guide to Practical Training in Gynecology: Textbook. [Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po ginekologii: Uchebnoye posobiye]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
10. Savel'yeva G.M., Breusenko V.G. (Eds). *Gynecology: The Textbook for Students of Medical Universities. [Ginekologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskikh vuzov]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. (in Russian)
11. Savel'yeva G.M. *Gynecology. [Ginekologia]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
12. Serova V.N., Sukhikh G.T. *Obstetrics and Gynecology: Clinical Guidelines. [Akusherstvo i ginekologiya: Klinicheskiye rekomendatsii]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. (in Russian)
13. Tselev Yu.V., Kira E.F. *Guide to Practical Training in Gynecology. [Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po ginekologii]*. St. Petersburg: Foliant; 2009. (in Russian)
14. Oyelowo T., Urbano R. et al. *Mosby's Guide to Women's Health: A Handbook for Health Professionals*. St. Louis: Mosby Elsevier; 2007.

Поступила 15.09.2016

Принята к печати 27.09.2016