

Некоторые вопросы ПЦР-диагностики вируса папилломы человека

Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к вирусам, способным инициировать развитие злокачественных процессов. Рак шейки матки (РШМ) имеет длительный период развития. Поэтому скрининговые мероприятия могут быть заведомо эффективными, так как при ранней диагностике возможно эффективное и полное лечение.

Те женщины, у которых ВПЧ длительно персистирует в шейке матки, по сравнению с теми, у которых нет этого вируса, находятся под высоким риском (примерно 65-кратным) развития рака шейки матки. Риск еще выше (130-кратный) у женщин старше 30 лет, если они инфицированы типами ВПЧ высокого онкогенного риска, включая в первую очередь типы 16 и 18 [10].

1. Официальные рекомендации по скринингу рака шейки матки

1.1 Европейское руководство по гарантии качества при скрининге рака шейки матки, 2 издание, 2010 [1] Дополнения к руководству второго издания, 2015 [2]

Определение ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) предполагается для:

- проведения первичного скрининга онкогенных типов ВПЧ, полагаясь исключительно на ДНК-тестирование или совместно с цитологическим исследованием;
- уточнения диагноза у пациенток с неоднозначными результатами цитологического исследования;
- прогноза результата лечения пациенток с цервикальной внутриэпителиальной неоплазией (CIN), т.е. с предраковым состоянием 3х степеней.

Получены многочисленные убедительные доказательства того, что передаваемый половым путём ВПЧ является необходимым, но недостаточным условием развития РШМ. И только генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) и 68й тип, классифицированный, как вероятно канцерогенный для человека, ассоциированы с РШМ. Согласно результатам четырёх европейских рандомизированных исследований, скрининг на основе ДНК ВПЧ обеспечивает защиту от инвазивного цервикального рака на 60-70% эффективнее по сравнению с цитологическим скринингом[3].

Использование ДНК-тестирования ВПЧ для скрининга сейчас интенсивно изучается. Поскольку ВПЧ обычно спонтанно элиминируется (удаляется) из организма особенно в молодом возрасте, то чтобы избежать лишних затрат и повысить специфичность ДНК-тестирования, рекомендуется проводить скрининг женщин от 35 лет старше до 60-65 летнего возраста [2]. Повторение ДНК-тестирования рекомендуют проводить через 6-12 месяцев с целью подтверждения генотипа ВПЧ. Наконец, рекомендуется определение высокой вирусной нагрузки ВПЧ основных онкогенных типов (в особенности ВПЧ16), но значения вирусной нагрузки не оговариваются.

Существуют различные зарегистрированные за рубежом молекулярные тесты. Первый коммерческий ПЦР-набор – Amplicor Human Papillomavirus Test, был разработан компанией Roche Molecular Diagnostics. В настоящее время валидирован набор Roche - Cobas 4800 HPV Test на основе ПЦР в реальном времени с мультиплексной детекцией для выявления 14 генотипов ВПЧ (включая и ВПЧ66) и с внутренним контролем β -глобина человека [4]. Мишень - фрагмент ДНК гена L1 ВПЧ.

Ещё одним валидированным клиническим набором на основе мультиплексной РВ-ПЦР является Abbott Real Time High-Risk HPV assay для выявления тех же 14 генотипов ВПЧ. Мишень – фрагмент ДНК гена L1 ВПЧ. Внутренний контроль – β -глобин человека [5].

Vecton Dickinson HPV test предназначен также для выявления 14 генотипов ВПЧ. Мишень – фрагмент ДНК генов E6/E7. Внутренний контроль – β -глобин человека [6].

В сравнительном исследовании продемонстрирована высокая чувствительность всех трёх ДНК-наборов [6].

ПЦР в реальном времени также может быть применена в мультиплексном формате, когда наличие ВПЧ и вирусная нагрузка различных генотипов определяется одновременно с количеством вносимой ДНК.

В руководстве в качестве первоочередных задач отмечается необходимость стандартизации метода экстракции ДНК/РНК; выбора гена-мишени: L1, E6, E7 или E1 (Интеграция ВПЧ в человеческий геном часто происходит в районе гена E2, сопровождаясь усиленной транскрипцией E6-E7, что предшествует неопластической трансформации); разработки международных стандартов для калибровки.

В большинстве случаев РШМ предшествуют внутриэпителиальные изменения, которые были названы цервикальной внутриэпителиальной неоплазией (CIN) и разделены на 3 степени. ДНК-тестирование ВПЧ оказалось более чувствительным в сравнении с цитологическим исследованием и при определении степени цервикальной внутриэпителиальной неоплазии CIN2 (умеренной дисплазии), CIN3 (выраженной дисплазии) или рака, позволяя значительно раньше выявлять CIN2 или CIN3. Потенциальные методы для уточнения диагноза: цитология, повторение ДНК-теста через 6-12 месяцев, генотипирование ВПЧ (включая ВПЧ16), оценка типоспецифичной вирусной нагрузки, интеграция вируса, мРНК или регуляторных белков. Выбор оптимальных тестов пока ещё является предметом изучения. Тем не менее показано, что более высокая вирусная нагрузка ВПЧ16 ассоциирована с риском CIN2+.

1.2.1 FDANewsRelease, США

С апреля 2014 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США, официально разрешило использовать только ДНК-тестирование ВПЧ для первичного скрининга РШМ.

1.2.2 Руководство по скринингу для предотвращения и раннего выявления РШМ американского онкологического общества, американского общества кольпоскопии и цервикальной патологии и американского общества клинической патологии (обновление), 2012[7]

Около 90% инфекций ВПЧ являются временными, перестают определяться через 1-2 года. Если же ВПЧ в течение этого времени сохраняется в организме, особенно генотип 16, то в последующие годы прогнозируют развитие CIN3 или даже более тяжелой формы CIN3+ (например, существует 20-30% риск развития CIN3+ через 5 лет после 1-2 годичной персистенции ВПЧ16). CIN3 без лечения имеет 30% вероятность перехода в инвазивный рак на протяжении 30 лет. При лечении лишь у 1% пациенток с CIN3 рак становится инвазивным.

Ассоциация онкогенных типов ВПЧ с РШМ привела к разработке молекулярных тестов. Включение этих тестов в скрининговую программу позволило повысить выявляемость заболевания на ранних стадиях и в несколько раз снизить заболеваемость и смертность от РШМ.

По сравнению с цитологическим исследованием ДНК-тестирование ВПЧ отличают гораздо лучшие чувствительность и воспроизводимость, но более низкая специфичность при выявлении CIN3+ и CIN2+.

Рекомендации для проведения скрининга по возрастным категориям.

- | | |
|-----------|---|
| 21-29 лет | Только цитологический скрининг. Из-за широкого распространения ВПЧ у женщин моложе 30 лет и спонтанной элиминации вируса не использовать ДНК-тестирование ВПЧ. |
| 30-65 лет | Проведение совместного цитологического скрининга и ДНК-тестирования ВПЧ каждые 5 лет. С апреля 2014 года возможен скрининг только ДНК-тестированием, как более чувствительный. По результатам мета-анализа, чувствительность ДНК-тестирования была на 37% выше по сравнению с цитологией при диагностике цервикальной внутриэпителиальной неоплазии CIN3+ или более серьезного диагноза. Отмечается также, что цитологическое исследование неэффективно для снижения частоты цервикальной аденокарциномы. |

Предусмотрена возможность проведения только цитологического скрининга, но он должен проводиться чаще - каждые 3 года.

По возможности после получения положительного теста на ВПЧ онкогенных типов следует провести генотипирование вируса на ВПЧ16 или ВПЧ16/18, так как именно эти генотипы связаны с клинически значимым краткосрочным риском развития CIN3 или рака. Во всех исследованиях генотип ВПЧ16 признан наиболее канцерогенным. Следующим по степени онкогенного риска идёт генотип ВПЧ18, превосходящий остальные онкогенные типы ВПЧ. [Тип ВПЧ16 наиболее часто встречается в ткани плоскоклеточного рака шейки матки, а 18 тип — в ткани аденокарциномы.](#)

старше 65 лет - при отрицательном результате предыдущего скрининга и при отсутствии CIN2+ в предшествующие 20 лет в скрининге не участвуют.

- при наличии CIN2, CIN3 или аденокарциномы продолжают участвовать в скрининге по крайней мере ещё 20 лет.

1.3.1 Скрининг рака шейки матки, Россия, 2010 [8]

РШМ является одной из наиболее распространённых форм новообразований, занимая 2-е место по частоте и 3-е место по смертности среди раков у женщин. В большинстве случаев РШМ предшествуют изменения, т.е. имеется достаточный период времени для проведения соответствующих профилактических мероприятий, препятствующих развитию инвазивного РШМ. Методы ранней диагностики и профилактики РШМ могут способствовать изменению ситуации.

По мнению автора, проф. В.И. Новика (НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург), в России существуют и работают централизованные цитологические лаборатории, созданные в 80-х годах прошлого века для проведения цитологического скрининга РШМ. Одной из первостепенных задач для повышения эффективности их работы является введение организованного скрининга с увеличением охвата женского населения... Новые молекулярно-биологические методы исследования могут существенно дополнить цитологический скрининг РШМ, но не заменить его. Значительно более высокая стоимость этих методов по сравнению с цитологическим исследованием позволяет предположить, что они больше подходят для проведения индивидуальной профилактики, чем для массового скрининга.

1.3.2 Материалы противоракового общества России [9]

Все женщины должны проходить скрининг (досимптомное обследование) на рак шейки матки через 3 года после начала половой жизни, но не позже 21 года. Скрининг нужно проводить ежегодно с исследованием мазков из шейки матки.

Начиная с 30-летнего возраста, женщины, имевшие три последовательных отрицательных результата при исследовании мазков из шейки матки, могут проходить скрининг каждые 2-3 года.

Женщины 70 лет и старше с тремя и более нормальными результатами исследования мазков из шейки матки за последние 10 лет могут не участвовать в скрининге.

1.3.3 Папилломавирусная инфекция (Пособие для врачей), 2002[10]

При диагностике ВПЧ-инфекций предлагается использовать одновременное исследование материала, взятого из шейки матки, как цитологическими методами, так и применением ДНК-диагностики.

Применение методов определения ДНК ВПЧ повышает эффективность выявления предраковых состояний, во-первых потому, что чувствительность метода исключительно велика, его предсказательный уровень неизмеримо выше, чем цитологического, во-вторых, совпадение данных цитологического исследования и ВПЧ-диагностики позволяет избежать кольпоскопического исследования.

[Длительная персистенция ВПЧ в ткани органов нижнего отдела генитального тракта способна провоцировать развитие предраковых и раковых процессов.](#)

Прогрессирование клеточного перерождения в большой степени связано с типом ВПЧ; находки ДНК ВПЧ типов высокого онкогенного риска — 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 и 58 дают основание предполагать, что клетки эпителия могут скорее всего подвергнуться злокачественному перерождению.

Комбинированный метод обследования больных, как показал опыт его применения, помогает в 100% случаев выявить цервикальную и внутриэпителиальную неоплазию (CIN) высокой степени выраженности — 2 и 3 ее степени, а тестирование ВПЧ комбинированным методом служит квалифицированным индикатором присутствия ВПЧ с разграничением типов высокого, среднего и низкого онкогенного риска.

Высокий уровень содержания ВПЧ связан с тяжестью заболевания.

В лабораторной диагностике применяют почти исключительно ДНК-методы.

1.3.4 Возможности терапии папилломавирусной инфекции, 2009 [11]

В России до 2008 г. масштабные исследования по изучению инфицированности ВПЧ и определению доминирующего типа вируса у женщин не проводились. В 2008 году была разработана и внедрена программа “Астра” – общероссийская многоцентровая программа мониторинга, обобщения и формирования статистической отчетности при лечении заболеваний, ассоциированных с ВПЧ, в условиях обычной медицинской практики в 26 городах России. В исследовании участвовало 5 896 женщин и 295 мужчин.

Как метод обнаружения ВПЧ ПЦР-диагностика оказалась широко доступна в условиях обычной амбулаторной практики в России. Об этом свидетельствует использование ПЦР-диагностики в 81% случаев. Методы исследования включали не только определение наличия ДНК ВПЧ, но и цитологическое исследование мазков, кольпоскопию и морфологическое исследование биоптата шейки матки.

Полученные данные свидетельствуют о совпадении соотношений распространенности ВПЧ16 и 18 типов папилломавирусной инфекции в РФ и европейских странах. Высокоонкогенные типы вирусов в сумме составляют 58%, что объясняет высокую заболеваемость РШМ на сегодняшний день в нашей стране – 13,8 на 100 тыс. женщин (данные 2008 года).

1.3.5 Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых пациентов с остроконечными кондиломами перианальной области и анального канала, 2013 [12]

В рекомендациях Общероссийской общественной организации “Ассоциация колопроктологов России” среди лабораторных исследований представлены и молекулярно-биологические методы, в частности ПЦР в реальном времени, для типирования онкогенных и неонкогенных типов ВПЧ.

Итог: Как в странах ЕС, так и в США, с недавнего времени тестирование ДНК ВПЧ возможно в качестве единственного метода скрининга РШМ. Но есть возможность и совместного скрининга наряду с цитологическим исследованием. В США предполагается альтернатива и одного цитологического исследования. Т.е. в зависимости от возможностей предусмотрены различные варианты. При этом оговаривается их эффективность. Кроме того, определение онкогенных типов ВПЧ16/18 с наиболее высоким риском развития РШМ является важной составляющей скрининга.

Системных мер по организации скрининга РШМ в целом по России нет. Даже теоретически профессиональным медицинским сообществом предполагается только цитологическое исследование. Молекулярно-биологические методы предназначены исключительно для индивидуального использования.

Однако ПЦР-диагностика широко доступна в условиях обычной амбулаторной практики в России [11] и существуют рекомендации её применения на уровне ведущих медицинских организаций [10]. При этом молекулярно-биологические методы используются не только для выявления генотипов ВПЧ высокого риска, но и для прогнозирования развития инфекции и оценки возможности рецидива после лечения.

2. Вирусная нагрузка

Количественное определение концентрации ДНК ВПЧ (вирусной нагрузки) могло бы существенно пополнить информацию и по оценке риска развития неоплазии и рака, и по уточнению диагноза. Тем более, что метод ПЦР в реальном времени позволяет без труда проводить количественные измерения при наличии стандартов. Были предприняты многочисленные научные исследования в этой области и в разных странах проведены клинические испытания [16, 17, 18]. Но в настоящее время идёт процесс накопления результатов.

2.1 Были попытки уточнить, по какой области генома вируса лучше проводить оценку. Область L генома ВПЧ состоит из L1– и L2–участков геномных последовательностей, детерминирующих структурные белки капсида ВПЧ.

В генезе опухолевого процесса большую роль играют белки ВПЧ — E6 и E7, кодируемые соответствующими участками генома ВПЧ. Эти белки называют онкопротеинами. Они имеются в составе ВПЧ высокого онкогенного риска и не содержатся в ВПЧ низкого онкогенного риска. Оба онкопротеина обеспечивают критические условия развития неоплазм. Однако вирусная нагрузка ВПЧ16 и ВПЧ18 ни по участку генома L1, ни по E7 не дала статистически значимой ассоциации с развитием цервикальных изменений [13].

2.2 В научно-исследовательской работе S. Monnier-Benoiti др. [14] было высказано предположение, что для оценки рисков развития заболевания или элиминации вируса из организма важно учитывать изменение вирусной нагрузки между посещениями врача (6-12 мес), а не одно какое-либо количественное значение.

Согласно результатам исследования M. Marks др. [15], хотя численные значения вирусной нагрузки ВПЧ16 не были связаны с элиминацией вируса, но уменьшение вирусной нагрузки ВПЧ16 более, чем на 2 порядка между 2 посещениями врача стало полезным прогностическим фактором элиминации вируса, т.е. диагностики транзитной инфекции.

В работе шведских исследователей отмечается, что методом количественной ПЦР продемонстрирована последовательно нарастающая вирусная нагрузка ВПЧ16 уже за 13 лет до постановки диагноза [19]. Авторы констатируют, что примерно у 25% женщин с высокой вирусной нагрузкой до 25-летнего возраста в течение 15 лет развивался РШМ.

Согласно результатам проспективных продлённых клинических испытаний во Франции, высокая вирусная нагрузка онкогенных типов ВПЧ может быть маркером прогрессирования предраковых состояний [16].

Наблюдается большой разброс количественных значений вирусной нагрузки ВПЧ16 от неоплазии с цитологической нормой до степени \geq CIN 2. Так, по данным исследователей из Нидерландов, диапазон вирусной нагрузки ВПЧ16 составляет от 0,61 до 11,62 копий/клетку [17]. В публикации англичан диапазон по ВПЧ16 отличается: 0,019 – 4,194 копий/клетку. Видимо, по причине значительных расхождений в количественном диапазоне в руководствах лишь упоминается необходимость определения вирусной нагрузки, но значения не приводятся. Необходимо иметь в виду, что разные типы онкогенных ВПЧ характеризуются различными диапазонами вирусной нагрузки в интервале от неоплазии с цитологической нормой до степени \geq CIN2. В той же публикации Snijders P. и др. выявленный диапазон ВПЧ31 составлял 3.27-23.40, а ВПЧ33: 10.95-83.70 [17].

В интернете на сайтах различных российских лабораторий можно встретить количественные референсные значения вирусной нагрузки ВПЧ и их интерпретацию (10^3 копий/ 10^5 клеток – как клинически малозначимую вирусную нагрузку с минимальным риском развития РШМ; 10^3 - $10^5/10^5$ клеток - как клинически значимую вирусную нагрузку с высоким риском развития дисплазии и РШМ; $>10^5$ г-экв/ 10^5 клеток при персистенции ВПЧ более года – как нагрузку ВПЧ с повышенным риском тяжелой дисплазии, также часто встречающуюся при РШМ; снижение вирусной нагрузки в 10 раз за 6 месяцев расценивается как транзитная инфекция; рост вирусной нагрузки через 6 месяцев и более после лечения свидетельствует о возможности рецидива). Однако никаких официальных общепринятых количественных показателей ни зарубежных, ни российских пока нет.

Литература

1. Arbyn M. et al, European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening, 2nded, 2010, *Annals of Oncology* 21 (3):448-458
2. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening second edition – Supplements, EU, 2015
3. Ronco G. et al, Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomized controlled trials, 2014, *The Lancet*, 383 (9916): 524-532
4. Heideman D.A.M. et al, Clinical Validation of the cobas 4800 HPV Test for Cervical Screening Purposes, 2011, *J Clin Microbiology*, 49 (11), 3983-3985
5. Carozzi F.M. et al, Comparison of Clinical Performance of Abbott RealTime High Risk HPV Test with That of Hybrid Capture 2 Assay in a Screening Setting, 2011, *J Clin Microbiology*, 49 (4):1446-1451
6. Szarewski A. et al, Comparison of Seven Tests for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears: the Predictors 2 Study, 2012, *J Clin Microbiology*, 50 (6):1867-1873
7. Saslow D. et al, American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer, 2012, *Am J ClinPathol*, 137:516-542
8. Новик В.И. Скрининг рака шейки матки, 2010, *Практическая онкология*, 11 (2): 66-73
9. Противораковое общество России. Рекомендации по раннему выявлению рака шейки матки, <http://www.pror.ru>
10. М.А.Башмакова, А.М.Савичева (НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург), Папилломавирусная инфекция (Пособие для врачей), М., Медицинская книга, Н. Новгород: Из-во НГМА 2002
11. Прилепская В.Н., Костава М.Н. (Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Росмедтехнологий. Москва), Возможности терапии папилломавирусной инфекции, 2009, *Русский медицинский журнал*, 17 (1)
12. Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых пациентов с остроконечными кондиломами перианальной области и анального канала, 2013
13. Winer R. L. et al Quantitative human papillomavirus 16 and 18 levels in incident infections and cervical lesion development, 2009, *J Med Virol*, 81 (4): 713-721
14. Monnier-Bnoit S. et al, Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions, 2006, *J ClinVirol*, 35 (3): 270-277
15. Marks M. et al, Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance, 2011, *J ClinVirol*, 51 (1): 44-49
16. Dalstein V. et al, Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study, 2003, *Int J Cancer*, 106: 396-403
17. Snijders P. J. F. et al, Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology, 2006, *Int J Cancer*, 119: 1102-1107
18. Flores R. et al, Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia, 2006, *Int J Cancer*, 118:1187-1193
19. Ylitalo N. et al, Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study, 2000, *Lancet*, 355 (9222): 2194-2198