

ВПЧ 16 типа, остальные типы вируса встречаются менее чем в 5 % случаев. При сравнении спектра выявления генотипов ВПЧ было показано, что среди обследованных женщин Томской области доля ВПЧ 16 и 18 типов составляет 73,3 %, в остальных случаях встречаются другие типы. В р. Тыва доля ВПЧ 16 и 18 составляет 88,0 %, в Якутии — 96,5 %.

При исследовании распределения вирусной нагрузки среди ВПЧ(+) лиц показано, что в группе здоровых женщин Томской области вирус в клинически значимых концентрациях (3–5 lg) выявлялся в 17,1 % случаев, с ФПШМ — в 43,3 %, с дисплазиями — в 56 %, с РШМ — в 61,2 %. Клинически малозначимое количество вируса (< 3 lg) в группе здоровых составило 33,3 %, в группе больных ФПШМ — 15,1 %, в группе с дисплазиями — 6 %, в группе больных РШМ — 9,3 %. Среди женщин республики Тыва ВПЧ в высокой концентрации определялся: в группе здоровых женщин — в 9,4 % случаев; с ФПШМ — в 24,1 %; с РШМ — в 73,4 %. Клинически малозначимое количество вируса (< 3 lg) в группе здоровых составило 37,7 %, в группе больных ФПШМ — 24,1 %, в группе с дисплазиями — 14,1 %, в группе больных РШМ — 23,5 %. Среди женщин республики Саха, больных РШМ, 90,2 % имеют клинически значимую вирусную нагрузку.

Заключение

При исследовании общей инфицированности вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска здоровых и больных с патологией шейки матки воспалительного и пролиферативного генеза женщин, проживающих в Томской

области, республиках Тыва и Саха (Якутия), было показано влияние региональных особенностей на частоту распространения и спектр ВПЧ. У женщин республик Тыва и Якутия наблюдается более высокий по сравнению с жительницами Томской области уровень общей инфицированности ВПЧ, наряду с повышенной частотой встречаемости ВПЧ 16 и 18 типов. Приведенные данные свидетельствуют о необходимости проведения более полного эпидемиологического исследования распространенности ВПЧ в регионе Сибири и Дальнего Востока, что позволит выделить преобладающие типы вируса и послужит основой для создания экономически адекватных программ по профилактике и лечению РШМ в рассматриваемом регионе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Евстигнеева, Н. П. Папилломавирусная инфекция урогенитального тракта женщин: эпидемиология, факторы персистенции, оптимизация ранней диагностики и профилактики онкогенеза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н. П. Евстигнеева. — М., 2007. — 42 с.
2. Куевда, Д. А. ВПЧ-тестирование: алгоритмы диагностики и требования к молекулярным тестам для выявления вирусов папилломы человека / Д. А. Куевда, О. Ю. Шипулина // Генодиагностика инфекционных болезней — 2007: сб. тр. VI Всероссийской науч.-практ. конф. — 2007. — Т. 3. — С. 108–119.
3. Прилепская, В.Н. Профилактика рака шейки матки: методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии / В. П. Прилепская // Гинекология. — 2007. — Т 9, № 1. — С. 12–14.
4. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer / N. Muñoz [et al.] // N Engl J Med. — 2003. — Vol. 348. — P. 518–522.
5. For the American Cancer Society. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA Cancer / D. Saslow [et al.] // J Clin. — 2002. — Vol. 52. — P. 342–362.
6. World Health Organization (WHO). Comprehensive Cervical Cancer Control: a guide to essential practice. Geneva: WHO, 1996.

УДК 618.146-006.6-084-07

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ВПЧ В ПРОГРАММАХ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

А. Н. Волченко, Е. В. Воропаев, В. Н. Беляковский

Гомельский государственный медицинский университет

В статье представлен краткий обзор применяющихся методов лабораторной диагностики папилломавирусной инфекции, описаны возможности различных тест-систем для определения ДНК ВПЧ. Дана краткая сравнительная характеристика ВПЧ ДНК тестов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL» (Россия) и описаны возможности стратегий их использования для целей профилактики развития рака шейки матки.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, молекулярно-генетические методы диагностики.

POSSIBILITIES OF THE APPLICATION OF DIFFERENT TEST-SYSTEMS FOR MOLECULAR-GENETIC DETECTION OF HPV DNA IN THE PREVENTIVE PROGRAMS AGAINST CERVICAL CANCER

A. N. Volchenko, E. V. Voropaev, V. N. Belyakovsky

Gomel State Medical University

In the article a brief survey of the applied methods of laboratory diagnostics for HPV infection has been presented, possibilities of different test-systems for HPV DNA detection have been described. A brief comparative characteristics of the tests «AmplifySense® high carcinogenic risk HPV Screen-Titre FL» и «AmplifySense® high carcinogenic risk HPV genotype FL» (Russia) was given and the possibilities of strategies of their application for preventive measures of the development of cervical cancer were described.

Key words: human papillomavirus, molecular-genetic diagnostics methods.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) занимает одно из первых мест в структуре онкологической патологии женского населения. В то же время доказано, что персистенция вируса папилломы человека (ВПЧ) увеличивает риск развития рака шейки матки в 300 раз. Вирусная нагрузка может отражать тяжесть и прогноз течения инфекции [2, 4].

Для выявления патологии шейки матки и лабораторной диагностики ВПЧ применяются различные методы: цитологический, гистологический, включая иммуногистохимический, серологический (используется только в научных целях), молекулярно-генетические, основанные на выявлении ДНК ВПЧ [1, 2, 3].

В настоящее время методы, основанные на определении ДНК ВПЧ, можно разделить на две группы:

1) методы, основанные на технологии — гибридизации ДНК [4];

2) методы, основанные на принципах полимеразной цепной реакции (ПЦР), являются доступными и широко применяются [1, 2, 5]. ПЦР тест-системы представлены широким спектром модификаций метода (детекция путем электрофореза, ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR), Flash (Fluorescent Amplification — based Specific Hybridization) PCR, NASBA PCR (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)), которые позволяют детектировать персистирующие варианты, определить клинически значимые концентрации вируса, жизнеспособность выявленного генома.

Наиболее часто из методов на основе ПЦР используются мультипраймерные технологии. Так, например, тест-системы разработанные французской фирмой «Roche Diagnostics», позволяют определять 37 генотипов ВПЧ, однако данные тест-системы имеет высокую стоимость и не применимы для целей скрининга. Из доступных по цене тест-систем в ПЦР-лабораториях наиболее часто используются наборы Российских фирм «АмплиСенс», «Литех», «Вектор-Бест», «ДНК-технологии».

Большое количество способов диагностики и методов молекулярно-генетического анализа дает возможность как врачу-клиницисту, так и исследователю выбрать необходимые в каждом конкретном случае.

Целью работы является оценка возможности использования ВПЧ ДНК тестов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL» для целей профилактики развития РШМ.

Материал и методы

На наличие ДНК ВПЧ были протестированы 204 образца соскобов с цервикального канала, взятые стандартизованным методом. Использовался протокол ПЦР в реальном времени, при котором, в отличие от классической ПЦР, имеется возможность количественного определения ДНК и отсутствует стадия электрофореза, что снижает влияние субъективного фактора на результат анализа и исключает внешнюю контаминацию. Для детектирования генома вируса были выбраны тест-системы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL» (Россия), разрешенные для применения на территории Республики Беларусь и позволяющие выявить широкий спектр (12) генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска. Исследования проводились в ПЦР-лаборатории Центральной научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета в рамках проекта НИР «Разработать и внедрить протокол диагностики и элиминации вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска у женщин Гомельской области». Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее, m — ошибка средней. Для анализа нормальности распределения применялся критерий Колмогорова-Смирнова, для определения статистической достоверности различий — критерий Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

При анализе результатов сравнительного тестирования была отмечена большая частота выявления при использовании ДНК ВПЧ в цервикальных соскобах при использовании «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL». Так, из 204 образцов тест-системой «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL» был детектирован генетический материал ВПЧ в 90,2 % образцов ($n = 184$), а тест-системой «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» только 64,7 % ($n = 132$), обеими тест-системами — в 63,2 % ($n = 129$). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты определения ДНК ВПЧ тест-системами «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL»

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL»	Положительный ($n = 132$)	Отрицательный ($n = 50$)
Положительный ($n = 184$)	129	34
Отрицательный ($n = 20$)	2	17
Невалидный	0	0

При оценке результатов использования тест-системы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL» были выявлены 22 невалидных образца, в которых количество геномов человека на реакцию не превышает 5×10^3 , что не позволяет нормализовать вирусную нагрузку и рассчитать клиническую значимость, но в некоторых случаях возможно установить принадлежность к той или иной филогенетической группе и определить количество геномов ВПЧ. Эти образцы для дальнейшего анализа не использовались.

Однако для заключения о большей или меньшей чувствительности и специфичности не-

обходимы дополнительные исследования с использованием стандартных панелей или третьей тест-системы, принятой за стандарт.

Положительные результаты, полученные на двух тест-системах, определялись в среднем на 26 цикле амплификации. В то же время положительные результаты, полученные только на тест-системе «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL», определялись в среднем на 33 цикле амплификации. Циклы амплификации выше 30 косвенно отражают низкую вирусную нагрузку, что клинически малозначимо [2]. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Средние значения величин циклов, на которых получен положительный сигнал флуоресценции в тест-системе «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL»

Генотип ВПЧ	Положительный результат полученный на тест-системе «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL» при	
	отрицательном результате на «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL»	положительном результате на «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL»
16	32,7 ± 2,6 (n = 12)	25,4 ± 2,3 (n = 30)
31	34,02 ± 0,5 (n = 5)	24,9 ± 2,9 (n = 15)
18	33,8 (n = 1)	27,03 ± 3,05 (n = 11)
39	34,5 (n = 1)	27,7 ± 3,8 (n = 10)
45	23,5* (n = 1)	25,4 ± 2,8 (n = 18)
59	33,1 (n = 1)	22,3 ± 4,2 (n = 9)
33	33,4 ± 0,6 (n = 4)	24,6 ± 2,8 (n = 14)
35	33,5 ± 1,4 (n = 4)	24,1 ± 4 (n = 13)
56	33,7 ± 2,7 (n = 3)	26,3 ± 2,8 (n = 25)
58	32,1 ± 8,6 (n = 3)	24,9 ± 3,7 (n = 13)
52	33,6 (n = 1)	24,6 ± 3,1 (n = 16)
51	33,9 ± 0,6 (n = 3)	24,7 ± 3,1 (n = 27)
Среднее	32,7 ± 1,9 (n = 12)**	25,2 ± 0,9 (n = 12)

* Вероятно ингибирование ПЦР, требует дальнейшего анализа, возможно, необходимо разведение данной пробы; ** $p = 0,028$

Выводы

Таким образом, для целей скрининга наиболее удобна тест-система «АмплиСенс® ВПЧ ВКР Скрин-Титр FL», которая определяет большой спектр генотипов ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска, а также вирусную нагрузку. Результаты дают возможность адекватно обозначить группу повышенного риска развития РШМ и назначить углубленное клиническое исследование целевой группе, что позволяет рекомендовать использование этой тест-системы для задач рутинного скрининга.

Для научных целей, при проведении углубленных популяционных эпидемиологических исследований, а также для контроля лечения более целесообразно использовать тест-систему «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL», позволяющую определить ДНК ВПЧ в малых концентрациях (без учета клинической значимости). Данная тест-система также может быть рекомендована

для верификации ВПЧ-отрицательного рака шейки матки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Разработка и апробация тест-системы для генотипирования вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска на основе мультипраймерной ПЦР в реальном времени / Д. А. Кувейда [и др.] // Молекулярная диагностика инфекционных болезней: матер. междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 мая 2007. — Мн.: Услуга, 2007. — С. 78–79.
2. Современные требования к диагностике генитальной папилломавирусной инфекции: количественный подход / Д. А. Кувейда [и др.] // Молекулярная диагностика инфекционных болезней: матер. междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 мая 2007. — Мн.: Услуга, 2007. — С. 74–75.
3. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women of 30 years and older / L. M. Meijer [et al.] // International Journal of Cancer. — 2009. — № 124(3). — С. 516–520.
4. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker / G. Boulet [et al.] // Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. — 2008. - №17(4). — С. 810 – 817.
5. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воробаев. — Мн.: Юнипол, 2007. — 176 с.