

УДК 578.827.1:618.1-006.6-092

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

 Л.Д. Андосова¹, К.Н. Контрщикова¹, С.Ю. Куделькина²,
О.В. Михалева², О.Л. Блатова², И.А. Кузнецова³,

¹ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», ²Медицинский центр «Тонус», г. Н. Новгород,

³ГУЗ «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко»

Андосова Лариса Дмитриевна – e-mail: larisa-andosova@yandex.ru

Цель и задачи исследования: используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) формата «реального времени», оценить частоту встречаемости, вирусную нагрузку и кратность инфицирования различными генотипами вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у женщин репродуктивного возраста в Нижнем Новгороде. За период с декабря 2009 года по август 2010 года на генотипы ВПЧ ВКР было обследовано 1404 женщины в возрасте от 16 до 50 лет. Анализ частоты выявления различных генотипов ВПЧ показал, что 56-, 51- и 16-й типы были обнаружены чаще других. В материале у 54,8% обследованных пациенток присутствовал только один генотип ВПЧ ВКР, у 26,2% было выявлено два генотипа, у 19% женщин – три и более генотипов. Количество пациенток, содержащих клинически значимую концентрацию ВПЧ, больше группы с клинически малозначимой концентрацией – 444/272, в процентном отношении 57% против 35%. Генодиагностика папилломавирусной инфекции позволяет быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять этиологический фактор возможной патологии.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, полимеразная цепная реакция, генотипирование вирусов папилломы человека.

Goals and objectives of research: to evaluate the frequency of disclosure, infection repetition factor by different genotypes of human papilloma virus of high carcinogenic risk, viral load among women at child-bearing age by using the method of polymerase chain reaction format "Real time" in Nizhniy Novgorod. From December 2009 to August 2010 1404 women were examined at the age of 16 to 50 years old. The analysis of frequency of disclosure different genotypes of human papilloma virus displayed that 56, 51 and 16 types were revealed more often at 33 percentages and 15 percentages. The one genotype of human papilloma virus of high carcinogenic risk was revealed in material of 54,8 percentages of examined patients, 26,2 percentages of patients revealed two genotypes, 19% - three and more genotypes. The amount of patients with clinically significant concentration of human papilloma virus is greater by 57 percentages than the group of patients with clinically concentration of little significance. Genodiagnosics of papilloma virus allows revealing etiological agent of possible pathology promptly, with fast response and peculiarity.

Key words: papilloma virus infection, the method of polymerase chain reaction, genotype of human papilloma virus.

Проблема диагностики и лечения заболеваний, обусловленных вирусом папилломы человека (ВПЧ) продолжает привлекать внимание врачей различных специальностей в виду достоверного роста заболеваемости во всем мире, значительной контагиозности и доказанной высокой онкогенности определенных типов ВПЧ [1, 2]. На настоящий момент известно около 100 различных типов вирусов папилломы человека, которые выявляются в тканях бородавок, кондилом и других опухолевых образований [3, 4]. В связи с этим вопрос ранней диагностики ВПЧ остается актуальным и в настоящее время [5, 6]. Одним из наиболее удобных на сегодняшний день методов, позволяющих обнаружить вирус, а также дать ответ на вопрос, каким генотипом ВПЧ произошло заражение, сколько генотипов присутствует одновременно, какова вирусная нагрузка, является метод ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР–РВ) [7, 8, 9].

Цель исследования: используя метод ПЦР формата «реального времени», оценить частоту встречаемости, вирусную нагрузку и кратность инфицирования различными генотипами вируса папилломы человека высокого кан-

церогенного риска у женщин репродуктивного возраста в Нижнем Новгороде.

Материал и методы

Всего за период с декабря 2009 года по август 2010 года на ВПЧ ВКР было обследовано 1404 женщины в возрасте от 16 до 50 лет, обратившихся в клиники Нижнего Новгорода по поводу различных гинекологических заболеваний и генитальных инфекций. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала, взятые с использованием одноразовых универсальных зондов в транспортную среду торговой марки «Ампли Сенс» для материала из урогенитального тракта женщин. Для выявления и определения генотипа ВПЧ использовали тест-систему «Ампли Сенс ВПЧ ВКР генотип-Fl», «Ампли Сенс ВПЧ ВКР скринитиф-Fl». Наборы данных реагентов предназначены для выявления, дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ ВКР 16-, 18-, 31-, 33-, 35-, 39-, 45-, 51-, 52-, 56-, 58-, 59-го типов в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Принцип метода основан на одновременной амплификации (мультикомплекс – ПЦР)

в одной пробирке участков ДНК трех типов ВПЧ и участка ДНК -глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК двенадцати типов ВПЧ проводится в четырех пробирках. Каждый тип регистрируется по своему каналу флуоресценции, что позволяет не только выявлять, но и определять генотип обнаруженного ВПЧ ВКР. Концентрацию ДНК ВПЧ в исследуемых пробах определяли с помощью стандартных кривых, построенных с использованием ВПЧ клонов данных типов. Вирусную нагрузку рассчитывали как количество копий ДНК ВПЧ, выраженное в lg на 10⁵ клеток [10]. Полученный материал исследовали методом ПЦР-РВ с использованием анализатора «iQ5» Cycler («Bio-RAD», США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Полученные данные подвергнуты статистической обработке. Оценивались следующие статистические показатели: распределение эмпирических статистических совокупностей и параметров этого распределения, промежуточные итоги в виде абсолютных величин, относительные величины.

Результаты и их обсуждение

Результаты обследования женщин позволили выявить высокий процент инфицирования онкогенными папилломавирусами – 1026 пациенток (73,1%). Показано широкое распространение ВПЧ ВКР у женщин репродуктивного возраста с эрозивно-дисплазивными изменениями эпителия дистальных отделов урогенитального тракта. Анализ частоты выявления различных генотипов ВПЧ показал, что 56-, 51- и 16-й типы были обнаружены чаще других – в 30 и 15 процентах случаев соответственно (таблица).

ТАБЛИЦА.
Частота выявления различных генотипов ВПЧ ВКР

Типы ВПЧ ВКР	56	51	16	31	39	52	58	18	45	33	59	35
Частота выявления, %	29,8	15,4	15,2	7,8	6,5	6,2	4,8	4	3,3	3,2	2,5	1,3

Доминировали геноварианты 31 (7,8%), 39 (6,5%), 52 (6,2%). Частота распространения остальных генотипов варьировала от 1 до 5%. Для определения зависимости между частой выявления ВПЧ и возрастом женщины обследуемую группу мы разделили по возрастным категориям. Наиболее многочисленная группа – это женщины 20-30 лет – 622 положительных результата (60,6%). В группе 31-40 лет – 193 женщины, процент положительных находок составил – 18,8%. Пациентки до 20 лет в нашем исследовании составили 28 человек (2,7%) выявлений ВПЧ ВКР. После 40 лет процент обнаружений – 6,8% – 70 женщин. Среди обследованных пациенток в 63,3% случаев ДНК ВПЧ была обнаружена у лиц в возрасте от 16 до 30 лет, в 25,6% – у лиц 30 лет и старше. Известно, что папилломавирусы являются своего рода маркером сексуальной активности, поэтому не стал большой неожиданностью пик выявления ВПЧ в возрасте до 30 лет. После 30 лет вирусы обнаруживаются реже. Это

обстоятельство может являться еще одним косвенным доводом против теории кумуляции и пожизненного носительства ВПЧ. В 40–50 лет выявляемость ВПЧ падает почти в 10 раз относительно возрастной группы до 30 лет. Эти цифры объясняются эпидемиологическими характеристиками и патогенетическими особенностями папилломавирусной инфекции. Кратность инфицирования отдельными типами ВПЧ ВКР показала, что в материале у 54,8% обследованных пациенток присутствовал только один генотип ВПЧ ВКР, у 26,2% было выявлено два генотипа. Три и более генотипов вируса папилломы выявлено при обследовании 104 женщин (19%): 3 типа – 62 пациентки (11,3%), 4 типа – 26 (4,8%), 5 типов – 12 (2,2%), 6 типов – 3 (0,5%), 7 типов – 1 женщина (0,2%). При исследовании распределения вирусной нагрузки среди ВПЧ-позитивных лиц группы в 780 человек показано, что количество женщин, содержащих клинически значимую концентрацию ВПЧ, составляет 56,9% – 444 человека, чаще всего встречается концентрация 3–5 lg на 100 тыс. клеток 275 (35,2%), далее следует 2–3 lg – 165 (21,1%), концентрация 5–6 lg – 87 женщин (11,1%). Основаниями для введения порога клинической значимости послужили ряд работ, указывающих на то, что вирусная нагрузка ниже определенного значения («порог значимости») не встречается в образцах тяжелой дисплазии и рака и ассоциирована с регрессией инфекции (клинически незначимое инфицирование). Нагрузка выше данного порога обозначается как клинически значимое инфицирование. Так же выделяется второй порог («порог прогрессии»). Вирусная нагрузка выше данного значения обозначается как повышенная и ассоциирована с большей вероятностью наличия или прогрессии в CIN2,3 [11]. На основании проведенных в НЦИИ эпидемиологии исследований и данных мировой литературы были определены пороговые значения концентрации ВПЧ в образце: 3 логарифма геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток – порог клинической значимости, 5 логарифмов ВПЧ на 100 тыс. клеток – порог прогрессии. Количество пациенток, содержащих клинически значимую концентрацию ВПЧ больше группы с клинически малозначимой концентрацией – 444/272, в процентном отношении 57% против 35%. В группе женщин, имеющих клинически малозначимые концентрации ВПЧ ВКР, можно думать о высокой вероятности самостоятельного излечения без применения медикаментозных и хирургических средств; у 169 женщин (21,7%) наблюдается ВПЧ с вирусной нагрузкой, обозначаемой как «порог прогрессии», 5 lg и более на 100 тыс. клеток, т. е. это группа, которая требует дальнейшего обследования и наблюдения.

Выводы

Полученные данные подтверждают высокий уровень инфицированности ВПЧ у женщин с различными гинекологическими диагнозами, что свидетельствует о необходимости проведения скрининговых исследований методом ПЦР на ВПЧ высокого канцерогенного риска при профилактических осмотрах женщин. Данные по распределению вирусной

нагрузки не противоречат аналогичным, полученным при изучении инфицированности ВПЧ женского населения других регионов России, главным образом, Европейской части, где лидирующими вирусами также являются ВПЧ 56-, 51-, 16-го типов. Определение вирусной нагрузки является новым подходом в диагностике папилломавирусной инфекции, поэтому заслуживает особого внимания. Генодиагностика папилломавирусной инфекции позволяет быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять этиологический фактор возможной патологии, определять группы риска по онкозаболеваниям урогенитального тракта у женщин.



ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов Д.М., Занько С.Н., Дмитраченко Т.И. Папилломавирусная инфекция. СПб.: Диалект, 2008. С. 82.
2. Прилепская В.Н. Патология шейки матки и генитальные инфекции. М.: МЕД пресс-информ, 2008. С. 384.
3. Молочков В.А., Киселев В.И., Рудых И.В. и др. Папилломавирусная инфекция. М.: Мириада Вива, 2008. С. 32.
4. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 188.
5. Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки. Методы ранней диагностики и лечения. *Акушерство и гинекология*. 2007. № 5. С. 73–76.
6. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю. ВПЧ-тестирование: алгоритмы диагностики и требования к молекулярным тестам для выявления вирусов папилломы человека. Сборник трудов 6-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней-2007». 2007. Т III. С. 108–119.
7. Кубанов А.А. Комплексная иммунологическая и молекулярная диагностика папилломавирусной инфекции у больных и определение формирования злокачественной трансформации эпителиальных тканей: Автореф. дис. ... доктора мед. наук. 2005.
8. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю. Сравнение аналитических характеристик различных молекулярно-биологических тестов для диагностики папилломавирусной инфекции. Сборник трудов 5-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней-2004». 2004. Т I. С. 325–331.
9. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: Медицинское информационное агентство. 2003. С. 13–38.
10. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Минкина Г.Н. и др. Количественный подход в диагностике генитальной папилломавирусной инфекции. Сборник трудов 6-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней-2007». 2007. Т III. С. 120–124.
11. Шкарупета М.М., Портнова Н.И., Байцур М.В. Папилломавирусная инфекция: пособие для врачей. М. 2009. С. 39–45.