

УДК 618.146:616.988-07

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПОДХОД В ДИАГНОСТИКЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОК С ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Л.Д. Андосова, К.Н. Контршикова, О.В. Качалина,
ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

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

В работе проведен анализ распределения показателей вирусной нагрузки среди ВПЧ ВКР позитивных пациенток – 290 женщин. Материал исследовали с использованием анализатора iQ5 Cyclex (Bio-RAD, США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Клинически малозначимая концентрация ДНК вируса наиболее часто встречается у женщин с латентной формой ПВИ и с фоновыми заболеваниями шейки матки. По мере углубления морфологических изменений вирусная нагрузка повышалась и у больных с поражением эпителия тяжелой степени (HSIL) соответствовала «порогу прогрессии». С возрастом наблюдается тенденция к снижению частоты встречаемости повышенной вирусной нагрузки. Процент женщин с клинически малозначимой концентрацией вируса в более старших возрастных группах выше.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, ВПЧ-тестирование, вирусная нагрузка.

The distribution analysis of the viral load indices among HPV HCR-positive patients – 290 women was conducted in the research. The material were researched by using of analyzer «iQ5» Cyclex («Bio-RAD», USA). Clinically less significant DNA virus concentration most frequently revealed among women with latent form of PVI and with background diseases of the cervix uteri. As morphological changes were deepened the viral load was increased among patients with epithelium lesion heavy degree of disease (HSIL) and the viral load corresponded to the «progression threshold». The tendency to the frequency reduction of the viral load was observed with age. The percentage of women with clinically less significant virus concentration at the senior age groups was higher.

Key words: papilloma viral infection, HPV-testing, the viral load.

Заболевания, ассоциированные с вирусом папилломы человека (ВПЧ), остаются одной из важнейших проблем в акушерстве и гинекологии [1, 2]. Инфицирование, вызванное вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), ассоциировано с риском возникновения цервикальных неоплазий и инвазивных опухолей [3, 4], а рак шейки матки (РШМ), согласно данным исследователей, является одной из основных причин смерти молодых женщин [5].

На сегодняшний день установлено, что нагрузка ДНК ВПЧ и введение порога клинической значимости вирусной нагрузки могут отражать тяжесть и прогноз течения папилломавирусной инфекции. Показано, что выявление вируса в количестве, не превышающем пороговый уровень, имеет малое клиническое значение, так как говорит о высокой вероятности самостоятельного излечения без применения специфической терапии. Основаниями для введения порога клинической значимости послужил 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». Также выделяется второй порог – «порог прогрессии» [6]. Вирусная нагрузка выше данного значения обозначается как повышенная и ассоциирована с большей вероятностью наличия или прогрессии в цервикальную интраэпителиальную неоплазию (ЦИН) [2, 3]. На основании проведенных в ЦНИИ эпидемиологии исследований и данных мировой литературы были определены пороговые значения концентрации ВПЧ в образце: 3 логарифма (или 103) геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток человека – «порог клинической значимости», 5 логарифмов геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток человека – «порог прогрессии» [7].

Цель настоящего исследования – изучение показателей вирусной нагрузки у женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки.

Материал и методы

В результате целенаправленного отбора пациенток, обратившихся в женские консультации и клиники Нижнего Новгорода, под наблюдение были отобраны женщины в возрасте от 17 до 60 лет, средний возраст составил 33,8±0,42 года, с патологическими процессами шейки матки, обусловленными папилломавирусной инфекцией. В работе проведен

анализ распределения показателей вирусной нагрузки среди ВПЧ ВКР позитивных пациенток – всего 290 женщин. По результатам клинико-лабораторных методов исследований выделены пять групп: 1-я группа – латентная форма ПВИ (отсутствие клинических, морфологических и гистологических изменений при обнаружении ДНК ВПЧ) – 32 женщины, 2-я группа – фоновые заболевания шейки матки – 64, 3-я группа – поражения эпителия легкой степени – LSIL (койлоцитоз, CIN I) – 62, 4-я группа – поражения эпителия тяжелой степени – HSIL (CIN II, CIN III) – 94, 5-я группа – инвазивный рак шейки матки – 38 женщин. Диагноз заболевания шейки матки ставили на основании анамнеза, активного выявления жалоб, гинекологического обследования, ультразвукового исследования малого таза, цитологического исследования мазков с экзо- и эндоцервикса с интерпретацией результатов по классификации Папаниколау, метода ПЦР-РВ, простой и расширенной кольпоскопии, по показаниям биопсии шейки матки. Метод ПЦР-РВ включал в себя ВПЧ-скрининг на вирусы высокого канцерогенного риска, генотипирование и определение вирусной нагрузки. Материал исследовали с использованием анализатора iQ5 Cyclar (Bio-RAD, США), комплекта тест-систем ФГУН «ЦНИИЭпидемиологии» Роспотребнадзора. Материалом для молекулярно-биологического исследования служили соскобы эпителиальных клеток цервикального канала, взятые одноразовыми цитощетками в пробирки, содержащие 500 мкл транспортной среды производства ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» (ЦНИИЭ) Роспотребнадзора. Для выделения ДНК использовался набор реагентов «ДНК-сорб-АМ» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Выявление, количественное определение и дифференциацию 12 наиболее распространенных генотипов ВПЧ ВР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59-й) проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс» ВПЧ ВР скрин-титр-FL» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Анализ результатов осуществляли автоматически с помощью программ AmpliSens FRT HR HPV Genotype Quant Results Matrix.xls и AmpliSens FRT HR HPV Screen Quant Results Matrix.xls. Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с использованием пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0. Оценивались следующие статистические показатели: распределение эмпирических статистических совокупностей и параметров этого распределения, промежуточные итоги в виде абсолютных величин, относительные величины. Оценку качественных показателей осуществляли с помощью точного критерия Фишера, при сравнительном анализе рядов переменных, имеющих нормальное распределение, использовали t-тест для независимых выборок (t-критерий Стьюдента), для случаев множественного сравнения – критерий Данкана. Во всех случаях критическое значение уровня достоверности принималось $p < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты лабораторного скрининга показали, что в группе с латентной формой ПВИ клинически значимая, т. е. более 3 lg концентрация ДНК вируса выявлена у 4 (12,5%) пациенток, у пациенток с фоновой патологией шейки матки – у 23 (35,9%), в группе ранних дисплазий (LSIL) – у 32 (51,6%), у больных с поздними дисплазиями (HSIL) – у 27 (28,7%), в группе женщин с РШМ – у 18 (47,4%) (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1.

Концентрация и распределение вирусной нагрузки у ВПЧ-позитивных женщин

Группы испытуемых	Вирусная нагрузка (lg геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток человека)			Всего обследовано
	ВН>5	5>ВН>3	ВН<3	
	Абс. (%)	Абс. (%)	Абс. (%)	Абс.
Группа 1	9 (28,1)	4 (12,5) $p_{1,2}=0,0288$ $p_{1,3}=0,0003$ $p_{1,5}=0,002$	19 (59,4) $p_{1,3}=0,0018$ $p_{1,4}=0,0005$ $p_{1,5}=0,0074$	32
Группа 2	14 (21,9) $p_{2,4}=0,0023$	23 (35,9)	27 (42,2) $p_{2,4}=0,0236$	64
Группа 3	14 (22,6) $p_{3,4}=0,0024$	32 (51,6) $p_{3,4}=0,0044$	16 (25,8)	62
Группа 4	44 (46,8) $p_{4,5}=0,0332$	27 (28,7) $p_{4,5}=0,0455$	23 (24,5)	94
Группа 5	10 (26,3)	18 (47,4)	10 (26,3)	38
Группа 1+2	23 (23,9)	27 (28,1)	46 (47,9)	96
Группа 3+4+5	68 (35)	77 (39,7)	49 (25,3)	194

Примечание: p – статистически значимые различия в группах наблюдения.

Клинически малозначимая концентрация ДНК вируса (менее 3 lg копий геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток) наиболее часто встречается в 1-й и 2-й группах – 19 (59,4%) и 27 (42,2%), т. е. у половины обследованных женщин. Можно предположить, что в данной группе женщин высока вероятность самостоятельного излечения, без применения медикаментозных и хирургических средств. Повышенная вирусная нагрузка, т. е. «порог прогрессии» – более 5 lg геномов ВПЧ, в группе с латентной формой ПВИ выявлена у 9 пациенток (28,1%), в группе женщин с фоновой патологией шейки матки и в группе с ранними дисплазиями составила 21,9% и 22,6%, в группе с тяжелыми дисплазиями – 46,8%, в группе с раком шейки матки – 26,3%.

Сопоставление клинико-морфологических данных с результатами лабораторных методов обследования позволило сформировать новые исследовательские категории испытуемых женщин. Объединить группы 1 и 2 (латентное течение ПВИ и фоновую патологию шейки матки) с преобладанием продуктивной формы ПВИ, группы дисплазий 3 и 4 (поражения низкой степени тяжести (LSIL) и тяжелые интраэпителиальные поражения (HSIL) и выделить объединенную группу, включающую 4 и 5 группы, то есть тяжелые дисплазии и рак шейки матки с преобладанием интегративной формы ПВИ. В объединенной группе «1 + 2» чаще встречается низкая вирусная нагрузка – 46 (47,9%) пациенток, далее следует клинически значимая концентрация ДНК вируса – 27 (28,1%) и «порог прогрессии» – повышенная вирусная нагрузка – 23 (23,9%) женщины. У больных с дисплазиями (LSIL + HSIL) и с РШМ «3 + 4 + 5» категории вирусной нагрузки «клинически значимая» и «порог прогрессии» наиболее многочисленные – 39,7% и 35%, «клинически малозначимая» концентрация ДНК вируса составила 25,3% больных. В объединенной группе «1 + 2» преобладает категория «ВН<3», т. е. низкая. В группе женщин с тяжелыми поражениями шейки матки «3 + 4 + 5» показатели вирусной нагрузки выше – преобладают категории «клинически значимое инфицирование» и «порог прогрессии».

Показатели средней вирусной нагрузки в группах представлены следующим образом: у женщин с латентной формой ПВИ – 3,42 lg ВПЧ на 100 тыс. клеток человека, с фоновой

патологией шейки матки – 3,52 lg копий ВПЧ. В группах больных с ранними дисплазиями (LSIL), поздними дисплазиями (HSIL) и раком шейки матки показатель средней вирусной нагрузки был выше – 4,14, 4,39, 4,16 lg ВПЧ, соответственно, но без достоверно значимых различий между группами. Имеют место достоверно значимые различия между группой пациенток с латентной формой ПВИ и группой женщин с поражениями эпителия тяжелой степени (HSIL) ($p=0,020$), группой с фоновой патологией шейки матки и группой женщин с поражением эпителия тяжелой степени (HSIL) ($p=0,035$) по критерию Данкана для множественных сравнений. По показателю средней вирусной нагрузки в объединенных группах имеют место достоверные различия, так, в объединенной группе «1 + 2» (латентное течение ПВИ и фоновая патология шейки матки) средняя вирусная нагрузка была ниже – 3,49 lg ВПЧ, чем в объединенных группах «4 + 5» (поражения эпителия тяжелой степени (HSIL) и рак шейки матки) – 4,32 ($p=0,0008$) и в группе «3 + 4 + 5» (дисплазии + рак шейки матки) – 4,26 ($p=0,0011$) по критерию Стьюдента. Таким образом, вирусная нагрузка ВПЧ ВКР может отражать тяжесть и, возможно, влиять на исход заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

Исследование вирусной нагрузки в различных возрастных группах показало, что клинически малозначимая вирусная нагрузка чаще встречается у представителей старшего возраста «старше 50 лет» – 11 женщин (44%) (таблица 2). У пациенток данной возрастной группы также реже всего отмечается повышенная вирусная нагрузка – 4 (16%).

ТАБЛИЦА 2.

Вирусная нагрузка у ВПЧ-положительных женщин в различных возрастных группах

Возраст (годы)	Вирусная нагрузка (lg геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток человека)			Всего обследовано
	ВН>5	5>ВН>3	ВН<3	
	Абс. (%)	Абс. (%)	Абс. (%)	Абс.
До 25	19 (31,7)	22 (36,7)	19 (31,7)	60
25-30	25 (30,1)	29 (34,9)	29 (34,9)	83
31-40	34 (40,9) p_3	30 (36,1)	19 (22,9) $p_1 p_2$	83
41-50	9 (23,7)	13 (34,2)	16 (42,1)	38
старше 50	4 (16,0)	10 (40)	11 (44)	25

Примечание: p_1 – статистически значимые различия в группах женщин категорий «31-40 лет» и «41-50 лет» ($p_1=0,0341$), $p_{2,3}$ – статистически значимые различия в группах женщин категорий «31-40 лет» и «старше 50 лет» ($p_2=0,0458$, $p_3=0,0305$).

Наибольшее число пациентов с повышенной вирусной нагрузкой (40,9%) – в возрастной группе «31–40 лет», также у людей данного возраста реже всего отмечается клинически малозначимая концентрация ВПЧ – 22,9%. Высокий процент пациентов с повышенной вирусной нагрузкой (31,7%) в возрастной группе «до 25 лет», у обследуемых данного возраста реже отмечается клинически малозначимая концентрация ВПЧ (31,7%). Анализ распределения вирусной нагрузки в других возрастных группах показал, что с возрастом наблюдается тенденция к снижению частоты встречаемости повышенной вирусной нагрузки. Вместе с тем, процент людей с

клинически малозначимой концентрацией вируса в более старших возрастных группах выше. Полученные данные вполне согласуются с утверждением, что ВПЧ является маркером сексуальной активности [8]. Были проанализированы показатели средней вирусной нагрузки по возрастным категориям. Так, средняя вирусная нагрузка в категории «до 25 лет», «25–30 лет» была одинаковой и составила 4,1 lg ВПЧ на 100 тыс. клеток. В группе «31–40 лет» – 4,3 lg, в группе «41–50 лет» показатель средней вирусной нагрузки – 3,7 lg ВПЧ на 100 тыс. клеток человека, «старше 50 лет» – 3,2 lg. По показателю «средняя вирусная нагрузка» возрастные категории «до 25 лет», «25–30 лет», «31–40 лет», «41–50 лет» не отличаются друг от друга ($p>0,05$). Выявлены достоверные отличия возрастной категории «старше 50 лет» с группой женщин «до 25 лет» – $p_1=0,0468$, «25–30 лет» – $p_2=0,0429$, «31–40 лет» – $p_3=0,0172$. В группах «старше 50 лет» и «41–50 лет» по показателю «средняя вирусная нагрузка» достоверные отличия не выявлены – $p_4=0,2489$ по критерию Данкана. В целом средняя вирусная нагрузка ВПЧ ВКР уменьшается с возрастом.

Выводы

1. Клинически малозначимая концентрация ДНК вируса наиболее часто встречается у женщин с латентной формой ПВИ и с фоновыми заболеваниями шейки матки. По мере углубления морфологических изменений при поражениях эпителия тяжелой степени вирусная нагрузка повышалась и соответствовала «порогу прогрессии».

2. С возрастом наблюдается тенденция к снижению частоты встречаемости повышенной вирусной нагрузки. Процент женщин с клинически малозначимой концентрацией вируса в более старших возрастных группах выше.

3. Определение вирусной нагрузки является новым подходом в диагностике папилломавирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прилепская В.Н., Роговская С.И. Новые технологии профилактики рака шейки матки. В кн.: Патология шейки матки и генитальной инфекции. М.: МЕДпресс-информ, 2008. С. 8-14.
2. Семенов Д.М., Занько С.Н., Дмитраченко Т.И. Папилломавирусная инфекция. СПб.: Диалект, 2008. 84 с.
3. Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки: скрининг (обзор литературы). Научно-практический медицинский журнал «Доктор.Ру». 2009. № 6 (50). С. 14–15.
4. Папилломавирусная инфекция /под ред. В.М. Говоруна. М.: НПФ Литех, 2009. С. 43-45.
5. Питер Л. Стерн, Китченера Генри С. Вакцины для профилактики рака шейки матки. Перевод с английского под общей редакцией акад. РАМН Г.Т. Сухих, проф., В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс-информ, 2009. С. 49-58.
6. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю. ВПЧ-тестирование: алгоритмы диагностики и требования к молекулярным тестам для выявления вирусов папилломы человека. В сб. тр.: 6-й Всероссийской научно-практической конференции Генодиагностика инфекционных болезней. М. 2007. Т. III. С. 108-119.
7. Куевда Д.А., Шипулина О.Ю., Генодиагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска. Количественный подход. В кн.: Патология шейки матки и генитальной инфекции. М.: МЕДпресс-информ, 2008. С. 284-293.
8. Клиническая онкогинекология. Перевод с английского /под ред. Е.Г. Новиковой. М.: Рид Элсивер, 2011. С. 73-97.