© Е. А. Золотоверхая,
Е. В. Шипицына, Е. С. Юшманова,
А. М. Савичева

ГУ НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург,
Россия

МАРКЕРЫ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В СКРИНИНГЕ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

УДК 618.146-006-07]:578.827.1

■ **В работе представлены результаты анализа проб от 192 пациенток, содержащих ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) онкогенных типов, методом количественной типоспецифической полимеразной цепной реакции. ВПЧ 16-го типа был обнаружен у 76% пациенток. Анализ распространенности типов ВПЧ по превалирующему типу показал, что 16, 18, 31, 33 и 45-й типы ответственны за 97% случаев рака. Для 16-го типа также была показана ассоциация вирусной нагрузки со степенью тяжести заболевания.**

■ **Ключевые слова:** вирус папилломы человека; рак шейки матки; цервикальная интраэпителиальная неоплазия; вирусная нагрузка.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире выявляется около 500 тысяч случаев рака шейки матки и регистрируется приблизительно 250 тысяч смертей от этого заболевания [3]. Эффективность организованного скрининга подтверждена во многих странах: так, в Европе и Северной Америке в результате реализации скрининговых программ показатели смертности от рака шейки матки снизились на 20–60% [7]. Основой скрининга в течение нескольких десятилетий является цитологическое исследование эпителия шейки матки. Однако считается, что до 30% случаев инвазивного рака шейки матки являются результатом ошибок цитологического скрининга вследствие ограниченной чувствительности цитологического метода [19].

Установление этиологической роли вируса папилломы человека **(ВПЧ)** в развитии рака шейки матки привело к тому, что диагностика папилломавирусной инфекции **(ПВИ)** наряду с цитологическими исследованиями стала рассматриваться как важнейший элемент скрининга рака шейки матки. Обзор последних скрининговых исследований, проведенных с целью оценки диагностических характеристик цитологического исследования и тестирования на ВПЧ, показал, что:

- Тест на ВПЧ обладает гораздо более высокой чувствительностью для диагностики цервикальных интраэпителиальных поражений, чем цитологический тест, однако специфичность тестирования на ВПЧ уступает специфичности цитологического метода;
- Чувствительность и прогностическая значимость отрицательного теста на ВПЧ в сочетании с отрицательным результатом цитологического теста приближаются к 100% [12].

Более низкая по сравнению с цитологическим методом специфичность теста на ВПЧ обусловлена тем, что у большинства женщин, особенно молодых, ПВИ носит транзиторный характер. Среди женщин старше 30 лет показатель спонтанной элиминации вируса значительно ниже, что повышает диагностическую ценность теста на ВПЧ в этой возрастной категории. На этом основании применение теста на ВПЧ в сочетании с цитологическим исследованием официально одобрено в США для первичного скрининга среди женщин старше 30 лет [1].

Для повышения специфичности тестирования на ВПЧ предлагается несколько подходов. По мнению экспертов, на сегодняшний день самым надежным прогностическим индикатором прогрессии заболевания является выявление у женщины персистирующей ПВИ. Показано, что риск персистенции вируса и последующей прогрессии выше при более высокой вирусной нагрузке [21].

Несмотря на то, что высокая вирусная нагрузка как фактор риска неопластической прогрессии активно изучается,

ее использование в клинической практике в настоящее время остается проблематичным по ряду причин. Во-первых, данный подход требует стандартизации процедуры получения клинического материала, при этом должно быть достаточным количество эпителиальных клеток. Во-вторых, необходимо использовать тесты, позволяющие определять истинную концентрацию вирусной ДНК и концентрацию клеток в образце. Точную количественную оценку ДНК можно провести только при использовании метода полимеразной цепной реакции **(ПЦР)** в реальном времени.

Планируя данное исследование, мы ставили своей целью изучить вирусную нагрузку и персистенцию ВПЧ как маркеров прогрессии цервикальных поражений, а также оценить возможность их использования в скрининге рака шейки матки.

Материалы и методы

Клинический материал

Клинический материал был получен от пациенток амбулаторного отделения НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН и пациенток НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова РАМН. Соскобы эпителия цервикального канала собирали дакроновыми щеточками в пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл, содержащие 300 мкл транспортной среды (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Одновременно с материалом для исследования на ВПЧ брали материал для цитологического исследования.

Цитологические исследования

Цитологические исследования соскобов эпителия цервикального канала проводились в лабораториях патоморфологии НИИ акушерства и гинекологии и НИИ онкологии.

Выделение ДНК

Выделение ДНК из клинических проб проводили с использованием тест-системы ДНК-сорб-А (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Выявление ДНК ВПЧ онкогенных типов (без типирования)

Для выявления широкого спектра (без дифференциации) ВПЧ онкогенных типов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66) в соскобах эпителия цервикального канала использовали тесты АмплиСенс ВПЧ ВКР скрининг (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Анализ проводили методом ПЦР с электрофорезной детекцией продуктов амплификации в полном соответствии с инструкцией производителя.

Стандарты для количественной ПЦР в реальном времени

Для количественного анализа ДНК ВПЧ использовали следующие клоны ВПЧ: ВПЧ 16, 18 и 45-го типов (любезно предоставлены доктором E. M. de Villiers, Германия), 31, 35 и 56-го типов (любезно предоставлены доктором A. Lorincz, США), 33-го и 39-го типов (любезно предоставлены доктором G. Orth, Франция). Для определения количества клеток в пробе использовали разведения рекомбинантной ДНК, содержащей фрагмент гена β-глобина человека (любезно предоставлен старшим научным сотрудником ЦНИИ эпидемиологии О. Ю. Шипулиной, Россия).

Типирование ВПЧ с одновременным определением вирусной нагрузки

Для типирования ВПЧ в пробах, в которых была обнаружена ДНК ВПЧ онкогенных типов, использовали тесты АмплиСенс FRT ВПЧ ВКР генотип RG4 (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Амплификация с детекцией в реальном времени проводилась в приборе Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия).

Неизвестные значения концентраций ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 и 56-го типов в клинических образцах рассчитывались относительно количественных стандартов с помощью программного обеспечения к прибору.

Все реакции проводили в двух повторах. Количество ДНК ВПЧ рассчитывали по отношению к числу копий гена β-глобина человека и представляли как число копий ДНК ВПЧ на 10^5 копий геномной ДНК человека (одна клетка человека содержит две копии β-глобинового гена).

Статистическая обработка данных

Оценку ассоциации стадии заболевания с частотой встречаемости ВПЧ, а также с инфицированием несколькими типами ВПЧ проводили с использованием χ^2-теста. Для анализа ассоциации степени дисплазии с вирусной нагрузкой использовали критерий Крускала-Уоллиса (H-тест).

Результаты исследований

Для представления результатов цитологического исследования была использована Терминологическая система Бетесда (TSB — Terminology Bethesda System). Стадии рака предшествуют цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN), которые по степени тяжести разделяют на CIN 1 (легкая дисплазия), CIN 2 (умеренная дисплазия) и CIN 3 (тяжелая дисплазия и карцинома in situ). TSB предполагает деление всех плоскоклеточных интраэпителиальных поражений (SIL — squamous intraepithelial lesion) на две группы: SIL низкой степени (LSIL — low SIL) включают CIN 1, SIL высокой степени (HSIL — high SIL) — CIN 2 и CIN 3.

В анализ было включено 192 пробы, в которых была обнаружена ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска. По данным цитологического исследова-

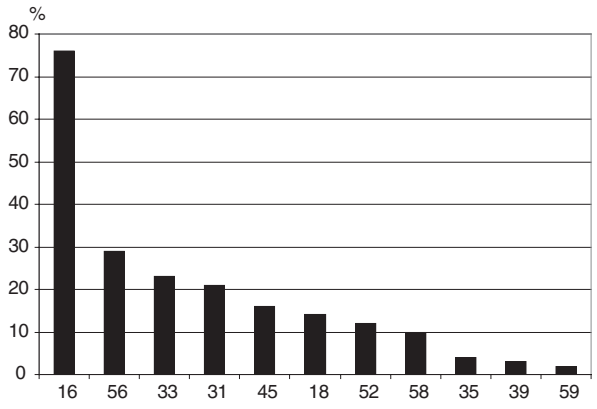

Рис. 1. Общая распространенность ВПЧ онкогенных типов

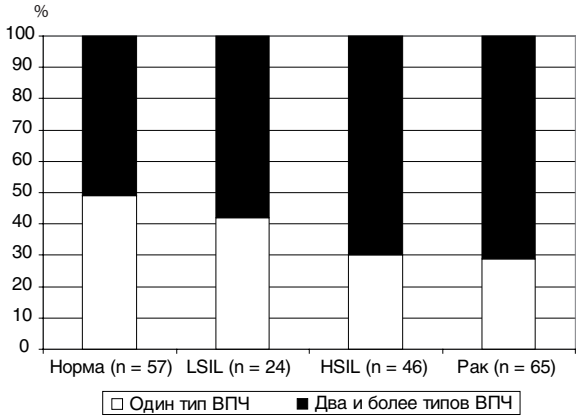

Рис. 2. Показатели инфицирования одним и несколькими типами ВПЧ в группах пациенток с различной тяжестью цервикальных поражений

ния, все пациентки были разделены на 4 группы. Численность группы с цитологической нормой составила 57 человек, LSIL — 24 человека, HSIL — 46 человек. Группу с диагнозом рака шейки матки составили 65 пациенток.

ВПЧ 16-го типа был обнаружен у 145 пациенток (76%). Остальные типы распределились по распространенности следующим образом: 56, 33, 31, 45, 18, 52, 58, 35, 39, 59 (рис. 1).

Результаты определения типов ВПЧ высокого онкогенного риска у пациенток с различной степенью тяжести цервикальных поражений представлены в табл. 1. Частота встречаемости 16-го типа ВПЧ была ассоциирована со стадией заболевания ($p<0,01$): при цитологической норме она составила 56% (32 случая из 57), при LSIL — 67% (16 случаев из 24), при HSIL — 83% (38 случаев из 46), при плоскоклеточной карциноме — 91% (59 случаев из 65). Для остальных типов ВПЧ данная закономерность не прослеживалась.

У 63% пациенток (121 из 192) было обнаружено два и более типа ВПЧ (рис. 2). Инфицирование несколькими типами ВПЧ было ассоциировано с тяжестью цервикальных поражений ($p<0,01$): если в группе пациенток без атипии распространенность множественной инфекции составила 51% (29 из 57), то в группах пациенток с LSIL, HSIL и раком она равнялась 58% (14 из 24), 70% (32 из 46) и 71% (46 из 65) соответственно.

Принципиальной особенностью ПЦР в реальном времени является возможность следить за накоплением продуктов амплификации непосредственно во время реакции. Оптический модуль осуществляет динамическое измерение флюоресценции, генерируемой флюорофорами. Увеличение флюоресценции, отражающее динамику накопления продуктов амплификации, отображается на дисплее прибора в конце каждого цикла. ПЦР в реальном времени позволяет точно определить количество копий исследуемой ДНК в клинической пробе, так как исходное количество исследуемой матрицы оценивается 80% по началу логарифмической фазы реакции, а не по количеству продуктов амплификации в конце реакции. На рис. 3 представлены графики амплификации фрагмента генома ВПЧ 16-го типа в серии десятикратных разведений стандарта

Таблица 1

Общая распространенность онкогенных типов ВПЧ в группах с различной тяжестью цервикальных поражений

Тип ВПЧ	Норма (n=57)		LSIL (n=24)		HSIL (n=46)		Рак (n=65)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
16	32	56	16	67	38	83	59	91
18	6	11	4	17	4	9	12	19
31	11	19	7	29	11	24	11	17
33	7	12	3	13	14	30	21	32
35	1	2	0	—	4	9	3	5
39	2	4	1	4	1	2	2	3
45	9	16	2	8	7	15	13	20
52	9	16	4	17	7	15	3	5
56	20	35	9	38	14	30	12	19
58	8	14	3	13	2	4	6	9
59	0	—	2	8	0	—	1	2

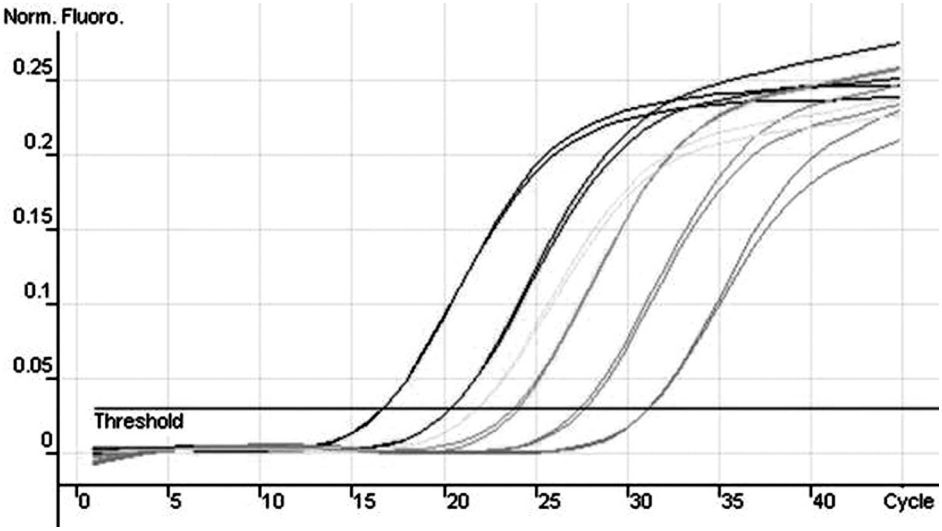

Рис. 3. Графики амплификации фрагмента генома ВПЧ 16-го типа в серии десятикратных разведений стандарта (2×10^5–2×10^1), а также одной клинической пробы

Таблица 2

Среднее значение вирусной нагрузки ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 56 типов при различной степени тяжести цервикальных поражений

Тип ВПЧ	Норма (n=57)	LSIL (n=24)	HSIL (n=46)	Рак (n=65)
16	9.8×10^6	1.3×10^7	2.9×10^9	1.4×10^9
18	2.6×10^5	1.1×10^5	2.8×10^4	1.9×10^7
31	7.7×10^6	7.5×10^6	1.8×10^6	1.6×10^6
33	1.1×10^6	2.0×10^6	2.6×10^6	2.0×10^7
35	7.2×10^5	—	2.8×10^4	3.3×10^6
39	1.9×10^4	2.3×10^6	3.8×10^1	7.1×10^0
45	2.3×10^6	1.2×10^3	7.5×10^3	7.5×10^4
56	1.7×10^6	4.8×10^6	1.3×10^5	1.1×10^2

(2×10^5–2×10^1) и одной пробе ДНК, выделенной из клинического материала.

Концентрацию ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 и 56-го типов в исследуемых пробах определяли с помощью стандартных кривых, построенных с использованием ВПЧ клонов данных типов (рис. 4). Вирусную нагрузку рассчитывали как количество копий ВПЧ на 105 геномов человека. На рис. 5 представлены показатели вирусной нагрузки.

Среднее число копий ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 и 56 представлено в таблице 2. Среднее количество копий ДНК ВПЧ 16 типа возрастало с увеличением степени дисплазии ($p < 0,05$): если в случаях цитологической нормы оно составляло $9,8 \times 10^6$ копий вирусной ДНК, то у пациентов с LSIL — $1,3 \times 10^7$, а у пациенток с HSIL и раком — $2,9 \times 10^9$ и $1,4 \times 10^9$ соответственно. Для остальных типов зависимости тяжести поражений от вирусной нагрузки не установлено.

Анализ распространенности типов ВПЧ по превалирующему типу (представленному в большем количестве в случаях множественной ВПЧ-инфекции) показал, что 16-й тип существенно доминирует над остальными типами, а основными типами, обнаруживаемыми при раке шейки матки, являются 16, 18, 31, 33 и 45-й типы — вместе они отвечают за 97% случаев рака (табл. 3).

Течение ПВИ наблюдали у 45 пациенток, соскобы эпителия цервикального канала у которых были собраны в двух или более временных точках. Персистенцию ВПЧ высокого риска определяли по нахождению одного и того же типа (типов) ВПЧ в цервикальных образцах во всех доступных временных точках в течение 6 и более месяцев. Персистенция ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска была выявлена у 18 из 45 (40%) пациенток. ВПЧ 16-го типа персистировал у 10 из 24 (42%) пациенток, ВПЧ 18 — у одной из 4 (25%), ВПЧ 31 — у одной из 5 (20%), ВПЧ 33 — у 4 из 9 (44%), ВПЧ 35 — у двух из 5 (40%) и ВПЧ 45 — у трех из 10 (33%). У трех из 18 (17%) пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией **(ПВИ)** наблюдалась прогрессия неопластических изменений инфицированного эпителия. В двух случаях заболевание прогрессировало от CIN 1 до CIN 2: у одной из женщин в нескольких

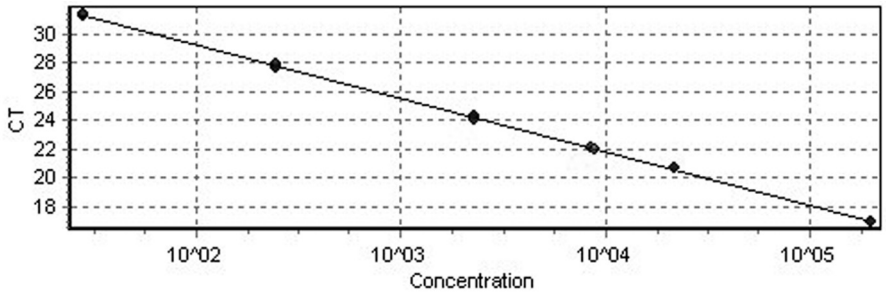

Рис. 4. Стандартная кривая, полученная в результате амплификации фрагмента генома ВПЧ 16-го типа в серии десятикратных разведений стандарта 2×10^5–2×10^1, а также одной клинической пробы

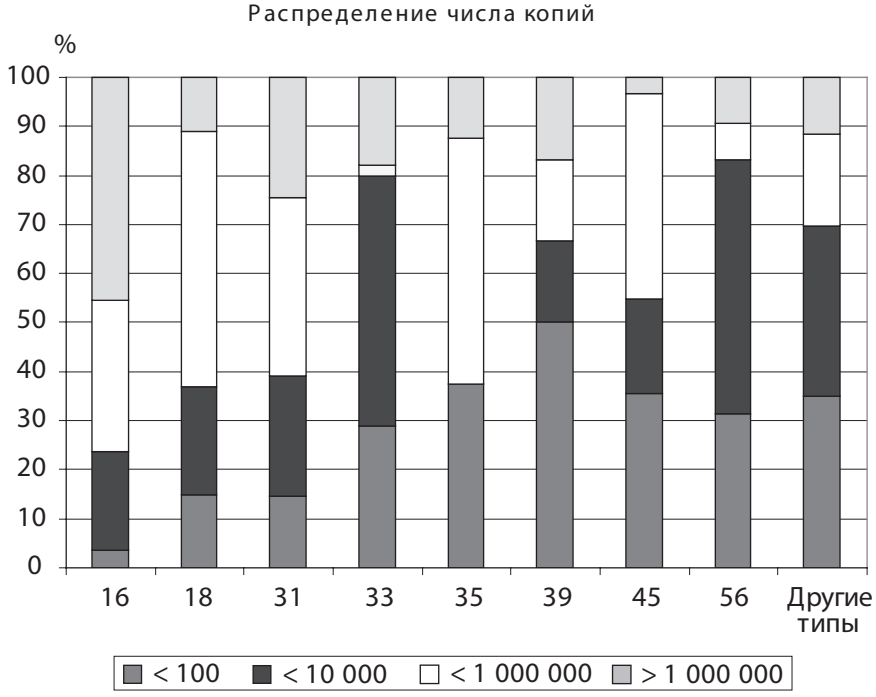

Рис. 5. Показатели вирусной нагрузки ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 56-го типов

последовательных образцах выявляли ВПЧ 16-го типа, у другой — ВПЧ 16-го и 45-го типов. У третьей пациентки ВПЧ 35-го и 45-го типов были выявлены в двух образцах, взятых с интервалом в 9 месяцев: в данном случае заболевание прогрессировало от CIN 2 до CIN 3. Ни в одном из случаев транзиторной ВПЧ-инфекции развитие цервикальной неоплазии не наблюдалось. Также мы не обнаружили случаев персистенции ВПЧ 39, 52, 56, 58, 59-го типов, что может быть объяснено, однако, небольшим размером выборки.

Обсуждение результатов

На сегодняшний день самым эффективным средством профилактики рака шейки матки остается скрининг женского населения с целью диагностики и лечения заболевания на стадии предрака. В основе всех рекомендаций по применению теста на вирус папилломы человека в скрининге рака шейки матки лежит тот факт, что цервикальные поражения высокой степени и рак в отсутствие вируса не развиваются, иными словами, персистенция вируса — необходимое условие развития рака. Во многих странах Европы, Америки, Азии уже накоплен положительный опыт применения различных методов выявления ДНК ВПЧ в скрининговых исследованиях [18, 22].

В США с 2003 года скрининг с одновременным использованием цитологического теста и теста на ДНК ВПЧ является альтернативой цитологическому скринингу среди женщин старше 30 лет [1]. В случае отрицательных результатов обоих тестов рекомендуемый интервал скрининга — 3 года. Женщинам с отрицательным результатом цитологического исследования, но положительным тестом на ВПЧ онкогенных типов, рекомендуется повторить оба теста через 6–12 месяцев: если при повторном обследовании результат какого-либо теста окажется положительным, показано проведение кольпоскопии [13].

В Европе вопрос о применении теста на ВПЧ в первичном скрининге находится в стадии актив-

Таблица 3

Распространенность онкогенных типов ВПЧ по превалирующему типу

Тип ВПЧ	Норма (n=57)		LSIL (n=24)		HSIL (n=46)		Рак (n=65)	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
16	23	40	16	67	32	70	43	66
18	4	7	1	4	—	—	6	9
31	7	12	1	4	5	11	5	8
33	2	4	1	4	2	4	3	5
35	1	2	—	—	2	4	1	2
39	1	2	1	4	—	—	—	—
45	3	5	—	—	1	2	6	9
56	7	12	2	8	2	4	—	—
Другие	9	16	2	8	2	4	1	2
58	8	14	3	13	2	4	6	9
59	0	—	2	8	0	—	1	2

ного обсуждения. Относительно невысокая специфичность теста на ВПЧ удерживает многие европейские агентства по изучению рака от включения теста на ВПЧ в скрининг, особенно в странах, где успешно действуют скрининговые программы на основе цитологии. Невысокие показатели специфичности и прогностической значимости положительных результатов обусловлены тем, что у большинства женщин (около 80 %), особенно молодых, ПВИ носит транзиторный характер.

Основным аргументом сторонников использования теста на ВПЧ в первичном скрининге является то, что высокая чувствительность и прогностическая значимость отрицательных результатов позволяют существенно увеличить интервал скрининга для женщин, у которых ВПЧ не обнаружен [5]. Для повышения специфичности тестирования на ВПЧ предлагается несколько подходов. Один из них — использовать цитологический метод как дополнительный у женщин с положительным тестом на ДНК ВПЧ [14]. Еще один подход заключается в повторном тестировании на ВПЧ с интервалом 6–12 месяцев. Показано, что у женщин с персистирующей ПВИ риск развития рака во много раз выше, чем у женщин с транзиторной инфекцией [8]. Наиболее эффективным методом выявления персистенции вируса является генотипирование, так как тестирование на ВПЧ без определения типа не позволяет дифференцировать персистенцию и реинфекцию.

В качестве одного из критериев клинически значимой инфекции, способной развиться в заболевание, рассматривается вирусная нагрузка, хотя ее прогностическая ценность на сегодняшний день однозначно не определена. Так, Dalstein V. и соавт. (2003) с помощью метода Hybrid Capture II показали, что показатель спонтанной элиминации вируса был выше в случаях ПВИ с более низкой вирусной нагрузкой [21]. Прогрессия заболевания имела место только в случаях персистенции ВПЧ, а риск прогрессии был связан с высокой вирусной нагрузкой. Авторы работы заключили, что высокая вирусная нагрузка может использоваться в качестве прогностического маркера, хотя низкая нагрузка не исключает прогрессию заболевания. Ассоциация вирусной нагрузки со стадией заболевания была также установлена в работе D. M. Hernandez и соавт. [2]. В противоположность этому, Szoke K. и соавт. (2003), изучая факторы риска неопластической прогрессии также с использованием Hybrid Capture II, показали, что высокая вирусная нагрузка не предсказывала онкогенной прогрессии [15].

Swan D. C. с соавт. (1999), сравнивая возможности разных методов при определении вирусной нагрузки, отметили, что ни один из применяемых в настоящее время методов не позволяет оценить количество копий ДНК вируса с такой точностью, как метод ПЦР в реальном времени [10]. С помощью этого метода они исследовали связь между количеством копий ДНК ВПЧ 16, 18, 31 и 45-го типов и степенью дисплазии и показали, что среднее число копий ДНК существенно варьировало в зависимости от типа ВПЧ, причем самые высокие показатели вирусной нагрузки были зарегистрированы для ВПЧ 16-го типа. Так, у пациентов с CIN 2 и CIN 3, инфицированных ВПЧ 16-го типа, среднее число копий ДНК вируса в 4–6 тысяч раз превышало среднее число копий ДНК ВПЧ 18, 31 и 45-го типов, обнаруженных у пациентов с той же степенью заболевания. Кроме того, среднее количество копий ДНК ВПЧ 16-го типа резко возрастало с увеличением степени дисплазии: если в случаях цитологической нормы оно составляло $2{,}2 \times 10^7$ копий вирусной ДНК на 1 мкг клеточной ДНК, то у пациентов с CIN 1 — $4{,}1 \times 10^7$, а у паци-

ентов с CIN 2 и CIN 3 — $1{,}3 \times 10^9$. Интересно отметить, что для других типов вируса такой связи выявлено не было.

Аналогичные данные были получены нами при определении количества копий ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 и 56-го типов: ассоциация вирусной нагрузки с тяжестью заболевания была показана только для 16-го типа.

Исследуя связь между количеством копий ДНК ВПЧ 16-го типа и степенью дисплазии, Peitsaro P. с соавт. (2002) также пришли к выводу, что прогрессия заболевания тесно связана с вирусной нагрузкой [20]. Авторы высказали предположение, что первоначально большое число копий генома ВПЧ увеличивает вероятность интеграции вирусной ДНК в геном хозяина и, как следствие, развития заболевания.

В нашем исследовании 63% пациенток были инфицированы двумя и более типами вируса, и показатель множественной ПВИ (инфекции, вызванной одновременно несколькими типами ВПЧ) возрастал со степенью дисплазии. На сегодняшний день не существует также единого мнения о значимости множественной ПВИ для неопластической прогрессии. Так, в работе Swan D. C. с соавт. (1999) было показано, что количество проб, содержащих ДНК ВПЧ нескольких онкогенных типов, увеличивалось в процентном отношении с возрастанием степени дисплазии [10]. В противоположность этому, согласно данным Perovic M. C. с соавт. (2003), множественная ПВИ чаще встречалась в случаях дисплазии легкой степени [9]. Корреляция степени дисплазии и инфекции, вызванной несколькими типами ВПЧ, была показана в работе Fife K. H. с соавт. [6]. Lee S. A. с соавт. (2003), изучая частоту встречаемости множественной ПВИ с помощью олигонуклеотидных чипов, также пришли к выводу, что инфицирование несколькими типами ВПЧ было ассоциировано с повышенным риском развития РШМ [17]. Rolon P. A. и соавт. (2000), напротив, не выявили статистически значимых различий в риске развития РШМ среди женщин, инфицированных одним типом ВПЧ, и женщин, инфицированных несколькими типами вируса [11]. В работе Rousseau M. C. с соавт. (2003) было показано, что персистенция ПВИ не зависела от того, одним или несколькими типами ВПЧ была инфицирована женщина на «базовой линии», то есть в самом начале наблюдения [23].

Исследуя разнообразие типов ВПЧ в обычной скрининговой популяции и ассоциацию множественной инфекции с цервикальной неоплазией, Cuschieri K. S. с соавт. (2004) выявили высокую частоту встречаемости множественной ПВИ вне зависимости от степени дисплазии [16]. Анализ полученных данных показал, что инфицирование несколькими онкогенными типами ВПЧ не является лучшим прогностическим индикатором развития дисплазии высокой степени по сравнению с инфицированием одним онкогенным типом вируса. Кроме того, случаи инфицирования несколькими типами ВПЧ чаще встречались среди женщин молодого возраста. По мнению авторов, это свидетельствует о том, что трансмиссия множественной ПВИ ассоциирована с более высокой сексуальной активностью. На основании полученных результатов авторы пришли к заключению, согласующемуся с мнением авторов более раннего исследования [24], что различные типы ВПЧ не кооперируют в неопластической трансформации. Ранее Thomas K. K. с соавт. (2000), изучая множественную ВПЧ-инфекцию, не обнаружили такого сочетания типов ВПЧ, которое при передаче имело бы преимущество перед другим сочетанием типов ВПЧ [4]. Кроме того, они показали, что риск инфицирования новым типом вируса не был меньше, если женщина ранее была инфицирована ВПЧ. Таким образом, множественная ПВИ, возможно, лишь отражает обычную сексуальную трансмиссию одновременно нескольких типов ВПЧ.

Как известно, развитие тяжелой дисплазии возможно только у женщин с персистирующей ПВИ [8]. Наиболее эффективным методом установления персистенции ВПЧ является генотипирование вируса, позволяющее дифференцировать персистирующую инфекцию от реинфекции. Типоспецифическая персистенция и высокая вирусная нагрузка как факторы риска неопластической прогрессии активно изучаются, однако их использование в клинической практике в настоящее время представляется проблематичным. Во-первых, на сегодняшний день опубликовано недостаточно данных относительно клинической значимости динамических маркеров персистенции ВПЧ, и практически все исследования сосредоточены на ВПЧ 16-го типа. Во-вторых, в отсутствие стандартизованной методологии определения концентрации вирусной ДНК динамические измерения вирусной нагрузки, а также установление клинически значимой пороговой концентрации не могут считаться вполне корректными.

В данной работе мы представили первые результаты исследования по определению прогностической значимости персистенции ВПЧ. Несмотря на ограниченность выборки (повторный материал был получен от 45 пациенток), уже можно сделать вывод, что типоспецифическая персистенция ДНК ВПЧ высокого риска, определяемая генотипированием, указывает на повы-

шенный риск развития цервикальной неоплазии. Определение генотипа вируса и количества вирусной ДНК в пробах, взятых с определенным интервалом, позволят, во-первых, дифференцировать персистирующую инфекцию от реинфекции, во-вторых, прогнозировать элиминацию вируса (при значительном снижении концентрации вирусной ДНК), либо персистенцию ВПЧ и риск прогрессии заболевания. Очевидно, что для адекватной интерпретации динамических показателей необходимо использовать методы, позволяющие определять концентрацию вирусной ДНК, строго нормированную на количество клеток в клинической пробе. Если учесть, что исследования для выявления ВПЧ становятся важным элементом в скрининге цервикальных неоплазий и рака шейки матки, необходимость дальнейшего изучения данного аспекта не вызывает сомнений.

Литература

1. ACOG: ACOG Practice Bulletin: clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Number 45, August 2003. Cervical cytology screening (replaces committee opinion 152, March 1995) // Obstet. Gynecol. — 2003. — Vol. 102. — P. 417–427.
2. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women / Hernandez-Hernandez D. M., Ornelas-Bernal L., Guido-Jimenez M. [et al.] // Gynecol. Oncol. — 2003. — Vol. 90. — P. 310–317.
3. Comprehensive Cervical Cancer Control. A guide to essential practice: World Health Organization. — Geneva: WHO, 2006.
4. Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types / Thomas K. K., Hughes J. P., Kuypers J. M. [et al.] // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 182. — P. 1097–1102.
5. *Cuzick, J.* Role of HPV testing in clinical practice / Cuzick J // Virus Res. — 2002. — Vol. 89. — P. 263–269.
6. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia / Fife K. H., Cramer H. M., Schroeder J. M. [et al.] // J. Med. Virol. — 2001. — Vol. 64. — P. 550–559.
7. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics / Quinn M., Babb P., Jones J. [et al.] // BMJ. — 1999. — Vol. 318. — P. 3.
8. Effects of HPV detection in population-based screening programmes for cervical cancer; a Dutch moment / Bekkers R. L., Meijer C. J., Massuger L. F. [et al.] // Gynecol. Oncol. — 2006. — Vol. 100. — P. 451–454.
9. High-risk human papillomavirus (HPV) types in patients with squamous intraepithelial lesions (SIL) / Perovic M. V., Berisavac M. J., Kuljic-Kapulica N. [et al.] // Eur. J. Gynaecol. Oncol. — 2003. — Vol. 24. — P. 178–180.
10. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type / Swan D. C., Tucker R. A., Tortolero-Luna G. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. — P. 1030–1034.
11. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay / Rolon P. A., Smith J. S., Munoz N. [et al.] // Int. J. Cancer. — 2000. — Vol. 85. — P. 486–491.
12. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening / Dalstein V., Bory J., Graesslin O. [et al.] // Emerging issues on HPV infections: from science to practice / Ed. Monsonego J. — Basel: Karger, 2006. — P. 103–119.
13. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening / Wright T. C., Schiffman M., Solomon D. [et al.] // Obstet. Gynecol. — 2004. — Vol. 103. — P. 304–309.
14. *Lorincz, A. T.* Screening for cervical cancer: new alternatives and research / Lorincz A. T. // Salud. Publica Mex. — 2003. — Vol. 45, suppl. 3. — P. 376–387.
15. Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities / Szoke K., Sapy T., Krasznai Z. [et al.] // J. Med. Virol. — 2003. — Vol. 71. — P. 585–592.
16. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population / Cuschieri K. S., Cubie H. A., Whitley M. W. [et al.] // J. Clin. Pathol. — 2004. — Vol. 57. — P. 68–72.
17. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA Chip / Lee S. A., Kang D., Seo S. S. [et al.] // Cancer Lett. — 2003. — Vol. 198. — P. 187–192.
18. New dimensions in cervical cancer screening / Cuzick J., Mayarand M. H., Ronco G. [et al.] // Vaccine. — 2006. — Vol. 24, suppl. 3. — S. 3. P. 90–97.
19. *Nuovo, J.* New tests for cervical cancer screening / Nuovo J., Melnikow J., Howell L. P. // Am. Fam. Physician. — 2001. — Vol. 64. — P. 780–786.
20. *Peitsaro, P.* Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique / Peitsaro P., Johansson B., Syrjanen S. // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40. — P. 886–891.
21. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study / Dalstein V., Riethmuller D., Pretet J. L. [et al.] // Int. J. Cancer. — 2003. — Vol. 106. — P. 396–403.
22. *Petry, U. A.* German project uses HPV-testing as primary screening test in the prevention of cervical cancer / Petry U. A. // HPV Today. — 2006. — Vol. 9. — P. 7.
23. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types / Rousseau M. C., Abrahamowicz M., Villa L. L. [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2003. — Vol. 12. — P. 1029–1037.
24. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco / Chaouki N., Bosch F. X., Munoz N. [et al.] // Int. J. Cancer. — 1998. — Vol. 75. — P. 546–554.

Статья представлена А. Р. Хачатурян
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

MARKERS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN SCREENING FOR CERVICAL CANCER

Zolotoverkhaya E., Shipitsyna E., Yusmanova E., Savicheva A.

■ **Summary:** The aim of this study was to investigate an association of high viral load of oncogenic human papillomavirus **(HPV)** types and HPV persistence with an increased risk of cervical neoplastic progression. With the use of quantitative polymerase chain reaction, clinical samples obtained from 192 patients who were positive for high-risk HPV types were analysed and HPV 16 was detected in 76% of the patients. HPV 16, 18, 31, 33 and 45 are responsible for 97% of cervical cancer. HPV 16 viral load was associated with the severity of the disease.

■ **Key words:** human papillomavirus; cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia; viral load.

■ **Адреса авторов для переписки**

Золотоверхая Екатерина Андреевна — научный сотрудник лаборатории микробиологии

E-mail: shipitsyna@inbox.ru

Савичева Алевтина Михайловна — д. м. н., руководитель лаборатории микробиологии, профессор

E-mail: savitcheva@mail.ru

ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, 199034 Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

Zolotoverkhaya Ekaterina — researcher.

D. O. Ott RI of Obstetrics and Gynecology, Laboratory of Microbiology, 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3