
ПОВЫШЕНИЕ КВАЛИФИКАЦИИ

Алгоритмы диагностики вируса папилломы человека

О.Ю. Шипулина

*заведующая лабораторией молекулярных методов,
руководитель научной группы по разработке новых методов
диагностики оппортунистических и папилломавирусных инфекций
отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии
ФГУН "Центральный НИИ эпидемиологии" Роспотребнадзора, г. Москва*

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) – широко распространенная и гетерогенная группа вирусов. В настоящее время идентифицировано 120 генотипов ВПЧ, 40 из которых ассоциированы с аногенитальным трактом человека.

Вирус папилломы относится к семейству паповирусов (*Papoviridae*). Филогенетически ВПЧ разделяют на роды (α , β , γ), роды на виды, которые обозначаются цифрами (1, 2 и т. д.), а каждый вид, в свою очередь, содержит несколько типов вируса [20]. Генитальные серотипы ВПЧ отнесены к роду α , видам $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 11$ (45 серотипов). По степени канцерогенного потенциала ВПЧ подразделяются на генотипы высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 и др.) и генотипы низкого риска (6, 11, 42, 43, 44 и др.) [12, 16].

Вирусы передаются при тесном контакте с пораженными участками кожи и слизистых оболочек. Основной путь передачи ВПЧ аногенитальной группы – половой. Это было неоднократно показано в эпидемиологических исследованиях по выявлению ВПЧ среди девственниц [15].

Методы выявления вирусов папилломы человека

Наиболее широко используемые методы выявления инфекционных агентов, в т. ч. вирусных, можно разделить на две группы – косвенные и прямые.

К косвенным относятся методы, позволяющие оценить эффект, который оказывает вирус на организм (клетки, ткани), – серологические, цитологические и гистологические методы. Серологические методы, направленные на выявление антител различных классов к антигенами вируса, в силу особенностей течения ВПЧ-инфекции и разнообразия вирусов, для рутинной диагностики не используются. Цитологические и гистологические методы, направленные на выявление клеток, измененных воздействием активного вируса (койлоциты) или трансформированных вирусом (раковые клетки), используются для установления степени изменения клеток, но не способны достоверно показать наличие или отсутствие вируса у обследуемого.

Повышение квалификации

Прямые методы направлены на выявление самого вируса или его компонентов – белков, ДНК, РНК. Поскольку ВПЧ не может быть изолирован в культуре чувствительных клеток, основным подход, который широко применяют в настоящее время для обнаружения и изучения вируса, – выявление его нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) методами гибридизации, амплификации, секвенирования.

Выявление ВПЧ подгруппы низкого канцерогенного риска

Низкая степень опасности вируса для его носителей, невысокий процент клинических проявлений инфекции (не более 10% остроконечных кондилом в группе инфицированных вирусом), высокая доля спонтанной элиминации вируса в течение года, отсутствие специфической противовирусной терапии ставят под сомнение необходимость использования скринингового обследования для выявления ВПЧ у этой подгруппы лиц. Основным диагностическим признаком папилломавирусной инфекции низкого риска является выявление остроконечных кондилом при осмотре. Прямые методы лабораторной диагностики (обнаружение ДНК) могут служить вспомогательным инструментом для дифференциальной диагностики, например, от сифилитических перианальных кондилом или от злокачественной опухоли. В этом случае также значение имеет проведение биопсии и гистологического исследования. В случае использования молекулярно-биологических методов достаточно выявлять 6-й и 11-й генотипы ВПЧ, т. к. они ответственны более чем за 95% случаев остроконечных кондилом. Дополнительное выявление других типов (42–44) незначительно повысит чувствительность выявления, но удорожит исследования. Следует заметить, что для этой задачи необходимо брать соскоб эпителия именно с места поражения, иначе велик шанс “пропустить” вирус.

Выявление ВПЧ подгруппы высокого канцерогенного риска

Основная опасность, которую несет инфицирование вирусами данной подгруппы, является риск развития рака шейки матки (РШМ). Этиологическая роль ВПЧ в развитии РШМ на сегодняшний день не вызывает сомнений. Эпидемиологические и вирусологические исследования показали, что ВПЧ является причиной РШМ в 100% случаев, рака заднего прохода – в 90%, рака вульвы и влагалища – в 40%, и только в 12% случаев – орофарингеального рака [17, 22].

РШМ является значимой проблемой для здравоохранения России. В нашей стране ежегодно регистрируют около 12 тыс. новых случаев, а примерно 6 тыс. заболевших умирает. Заболеваемость составляет в среднем по стране 12 случаев на 100 тыс. женщин, что соответствует 5-му ранговому месту в структуре онкологических заболеваний у женщин. При этом прирост заболеваемости в возрастной группе до 29 лет за 10 лет составил более 150% [1].

Поскольку основной причиной РШМ является ВПЧ, первичная профилактика должна быть направлена на снижение распространения инфекции в популяции. Эффективный метод первичной профилактики – вакцинация. Вторичная профилактика предполагает раннее выявление и лечение лиц, имеющих предраковые изменения. Несмотря на успехи в разработке и внедрении вакцин про-

тив наиболее часто встречающихся канцерогенных типов ВПЧ, на сегодняшний день наиболее важным методом профилактики РШМ является скрининговое обследование женского населения на наличие маркера предраковой стадии папилломавирусной инфекции – цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН, SIL) [3]. Хорошо известно, что в большинстве экономически развитых стран Европы и Северной Америки внедрение программ скрининга позволило значительно снизить заболеваемость РШМ [18]. Однако в развивающихся странах, на долю которых приходится наибольшее количество случаев заболевания в мире, традиционные программы скрининга оказались неэффективными.

Следует отметить, что основное требование, которому должны отвечать программы скрининга, – высокая эффективность и низкая стоимость. Эффективность выявления женщин группы риска развития РШМ зависит от нескольких параметров: охват женского населения, чувствительность используемого метода и периодичность проведения исследований. При использовании цитологического метода скринингово исследования женщин с возраста 25–30 лет, с 3–5-летним интервалом и не менее чем 75%-ном охвате женского населения удается достичь снижения заболеваемости РШМ на 70–80%, при условии достаточно высокой чувствительности цитологического метода [18]. Однако основным недостатком этого метода как раз является его низкая чувствительность, варьирующая в пределах 40–70%, составляя в среднем 50% [13, 21]. Причины такой низкой чувствительности метода обсуждаются. По одним данным, в 70–90% случаев причиной ложноотрицательных цитологических ответов является некачественный забор материала для исследования и в 10–30% – ошибочная интерпретация цитологических данных. По другим данным, наоборот, отмечается низкая сопоставимость между лабораториями при тестировании одних и тех же препаратов – от 11 до 80%. Кроме того, высока доля сомнительных результатов (до 15% атипичных плоских клеток неясного значения – ASCUS), требующих повторных и подтверждающих исследований. Таким образом, предсказательная ценность отрицательного результата оказывается низкой, что требует более частого проведения исследований и приводит к удорожанию программы скрининга. В связи с этим в последние годы в скрининге все больше стали использоваться тесты, позволяющие выявлять ДНК ВПЧ (ВПЧ-тесты).

Многочисленные международные исследования продемонстрировали более высокую чувствительность ВПЧ-тестов в выявлении ЦИН в сравнении с цитологическими. Доказано, что получение отрицательного результата ВПЧ-теста позволяет значительно увеличить интервал между повторными тестированиями [10]. На основании данных крупных международных исследований, ведущими специалистами международных организаций (ASCCP, EUROGIN, ESIDOG и др.) предложены алгоритмы диагностики с использованием ВПЧ-тестирования, сформулированы рекомендации по применению ВПЧ-теста в программах скрининга:

- ~ на первом этапе скрининга у женщин старше 30 лет в дополнение к цитологическому исследованию;
- ~ для разрешения сомнительных результатов цитологического исследования (ASCUS);

Повышение квалификации

- ~ на первом этапе скрининга для стран, где плохо организованы программы цервикального цитологического скрининга;
- ~ для мониторинга терапии цервикальных поражений высокой степени (ЦИН 2/3, рак *in situ*, инвазивный рак).

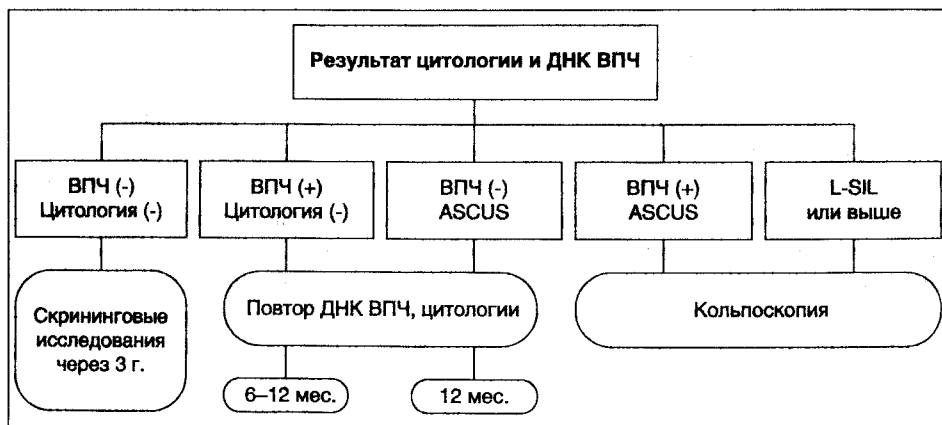


Рис. 1. Алгоритм использования ВПЧ-теста на первом этапе скрининга

Во многих странах совместное применение ВПЧ-теста и цитологического ПАП-теста (рис. 1) позволило увеличить чувствительность выявления ЦИН до 99–100%, удлинить интервалы исследований до 5–7 лет, что, несмотря на использование дополнительного метода исследования, в конечном итоге привело к снижению затрат на программу скрининга. Разработан принципиально новый способ забора клеток цервикального эпителия в транспортно-фиксирующую среду для одновременного проведения цитологического исследования (жидкостная цитология) и ВПЧ-теста. Такой подход позволил, с одной стороны, повысить эффективность цитологического метода, а с другой – разрешать сомнительные результаты цитологического анализа без повторного забора клинического образца (рис. 2).

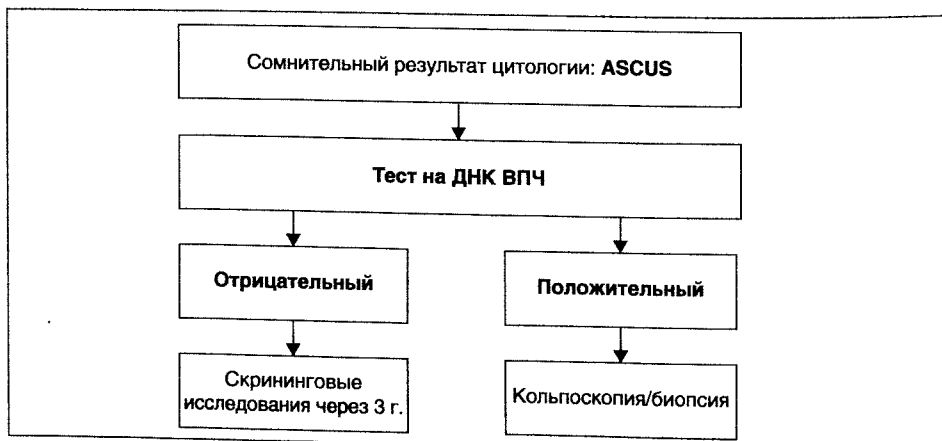


Рис. 2. Алгоритм использования ВПЧ-теста при сомнительных результатах цитологического исследования (ASCUS)

Диагностическая чувствительность рекомендованного для скрининга ВПЧ-теста, в среднем составляющая 88–100%, значительно превышает чувствительность цитологического исследования, а диагностическая специфичность скринингового ВПЧ-теста при использовании его в возрастной группе женщин старше 30 лет лишь немного уступает специфичности цитологического метода (78–99%). Прогностическая значимость отрицательного результата выявления ДНК ВПЧ приближается к 100%. Это является основанием для использования ВПЧ-теста на первом этапе скрининга. Алгоритмы применения ВПЧ-теста, как самостоятельного исследования на первом этапе скрининга были предложены еще в 2003 г. (рис. 3), но широкое применение в программах скрининга они нашли позднее [4].

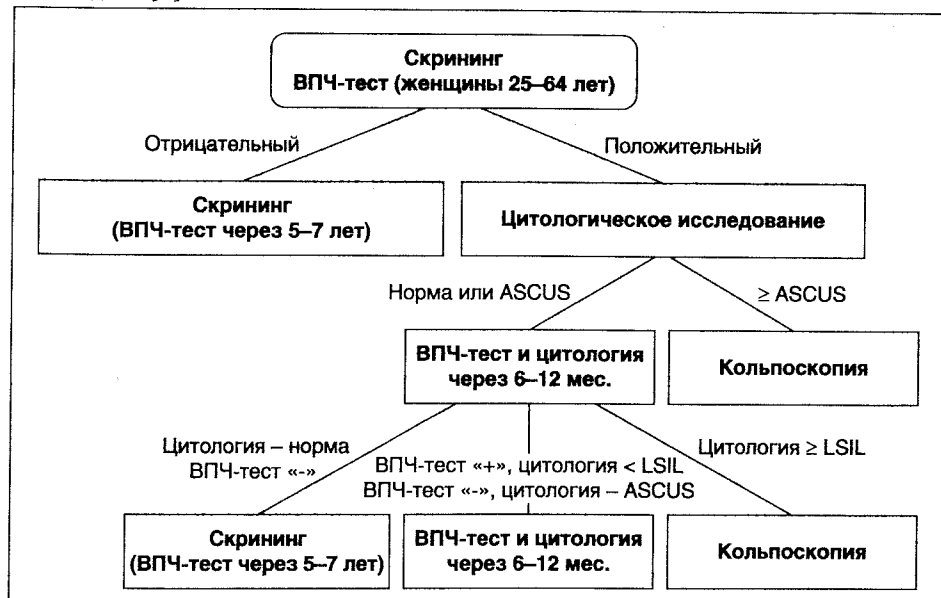


Рис. 3. Алгоритм использования ВПЧ-теста как самостоятельного исследования на первом этапе скрининга [23]

Главное условие эффективного цервикального скрининга – оптимальный баланс между диагностической чувствительностью и специфичностью в выявлении предраковых поражений шейки матки (ЦИН 2/3) и рака. На основании многолетнего мирового опыта применения молекулярно-биологических методов для выявления ДНК ВПЧ в скрининговых программах к настоящему времени сформулированы четкие требования к ВПЧ-тестам, которые могут быть использованы в скрининге [14].

Требования к аналитическим характеристикам теста

Во-первых, ВПЧ-тест должен выявлять только типы вируса, которые относятся к группе высокого канцерогенного риска, т. к. выявление всех типов вируса, включая группу низкого онкогенного риска, которые не вызывают трансформации эпителиальных клеток, будет приводить к значительному снижению

Повышение квалификации

специфичности теста. В то же время, ВПЧ-тест должен выявлять широкий спектр типов вируса высокого канцерогенного риска – не менее 10–13 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 типы), т. к. это обеспечивает не менее чем 90% чувствительность теста. Выявление ВПЧ только 16-го и 18-го типов будет приводить к значительному снижению чувствительности скрининга, поскольку эти два типа ответственны не более чем за 70% случаев предраковых поражений (ЦИН 2/3).

Во-вторых, ВПЧ-тест должен обладать высокой диагностической чувствительностью и специфичностью выявления ЦИН 2/3. Это обеспечивается способностью теста выявлять только клинически значимую концентрацию вируса или дифференцировать клинически значимую концентрацию и клинически незначимую. Исследования голландских ученых показали, что критическое значение вирусной нагрузки, при которой может развиваться дисплазия тяжелой степени, находится в интервале 10^4 – 10^5 копий ДНК ВПЧ в 1 мл клинического образца (в соскобе клеток цервикального канала, взятом в 1 мл транспортной среды) [19]. Стандартные общепринятые ВПЧ-тесты, используемые для скрининга, откалиброваны на выявление клинически значимой концентрации ВПЧ [2, 11].

Клиническая валидация теста

Новый ВПЧ-тест должен быть валидирован в клинических испытаниях относительно стандартного ВПЧ-теста, уже прошедшего клиническую валидацию. Таким тестом на сегодняшний день считается Hybrid Capture 2 High Risk HPV DNA Test, разработанный компанией Digene (США). Этот тест был одобрен FDA* в 2003 г., а затем, после проведения широких испытаний в разных странах мира, рекомендован для скрининга [8]. В основе теста лежит методика гибридизации ДНК ВПЧ со специфическими РНК-пробами в растворе с последующим захватом ДНК-РНК гибридов с помощью моноклональных антител.

Новый ВПЧ-тест должен быть валидирован в клинических испытаниях на гистологически верифицированных образцах. Диагностическая чувствительность ВПЧ-теста определяется как способность выявлять образцы с дисплазией тяжелой степени (ЦИН 2/3), а диагностическая специфичность – как способность не выявлять образцы с гистологической нормой [4].

ВПЧ-тесты в России

Тесты для выявления и генотипирования ВПЧ, основанные на методах гибридизации и/или методах амплификации нуклеиновых кислот, к которым относится полимеразная цепная реакция (ПЦР), начали применять еще более 10 лет назад. В настоящее время в литературе описано достаточно большое число методов выявления и генотипирования ВПЧ. Однако очевидно, что в программах скрининга могут быть использованы только стандартизованные тесты, удовлетворяющие заданным требованиям по чувствительности и специфичности и прошедшие клиническую апробацию. Общепринятый международный

* Food and Drug Administration – Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США.

стандарт Hybrid Capture 2 High Risk HPV test в настоящее время разрешен для применения в России. Но высокая стоимость теста ограничивает возможность использовать его в российских программах скрининга. Тем не менее, поскольку этот тест удовлетворяет практически всем требованиям ВПЧ-теста, он в обязательном порядке должен использоваться для валидации вновь разработанных отечественных ВПЧ-тестов.

Российскими производителями в настоящее время разработано и выпускается большое количество тестов для выявления ВПЧ как низкого, так и высокого канцерогенного риска. Но, несмотря на то, что многие выпускаемые тесты зарегистрированы и разрешены к применению, большинство из них не удовлетворяют требованиям, предъявляемым к ВПЧ-тестам для скрининга. Спектр выявляемых генотипов вируса, аналитическая чувствительность и специфичность отечественных ВПЧ-тестов сильно варьируют в широком диапазоне. И, несмотря на повсеместное применение российских ПЦР-тестов, используемых для диагностики ВПЧ-инфекции, нельзя признать, что все они стандартизованы и прошли должную клиническую апробацию [5].

Учитывая, что международный стандартный ВПЧ-тест недоступен многим российским производителям тест-систем для валидации собственных разработок, назрела необходимость создания стандартной панели контрольных образцов как для оценки качества работы самих тестов, так и лабораторий, использующих эти тесты. Согласно международному опыту создания панелей контрольных образцов, необходимо, чтобы разработанные панели удовлетворяли условиям работы всех тест-систем, представленных на рынке, и были валидированы с помощью стандартного международного теста (www.QCMD.org). Поскольку ВПЧ невозможно вырастить в культуре клеток, контрольная панель может состоять из рекомбинантных ДНК, содержащих полные геномы различных типов ВПЧ. Необходимость использования полноразмерных ДНК ВПЧ продиктована тем, что в разных тест-системах используются разные гены вируса в качестве мишени для амплификации. Таким образом, контрольные панели количественно охарактеризованных образцов могут служить для контроля выпускаемых серий тест-систем, а также для проведения контроля качества лабораторных исследований [6].

Особенности преаналитического этапа

Важным условием эффективного применения ВПЧ-тестов является стандартизация всех этапов исследования, прежде всего – процедуры получения клинического материала и сбора данных. Необходимо четко представлять, кому, как и зачем проводить исследование. Согласно международным рекомендациям по ВПЧ-тестированию, исследование по выявлению ВПЧ высокого канцерогенного риска проводят только у женщин. Материалом для исследования служит соскоб цервикального канала и/или зоны трансформации, выполненный цервикальной цитологической щеточкой. При взятии материала щетку обламывают и сохраняют рабочую часть щетки в транспортной среде до доставки в лабораторию. ВПЧ-тесты, разработанные на основе ПЦР, позволяют контролировать адекватность клинического образца по наличию в нем ДНК человека [14].

ВПЧ-тестирование мужчин с целью скрининга или выявления носительства не рекомендуется. Инфицированность мужчин ВПЧ сходна с инфицированностью женщин, но при этом рак полового члена – крайне редкое заболевание. Поэтому мужчины являются бессимптомными носителями инфекции. С учетом того, что опасность развития ассоциированной с ВПЧ онкологической патологии у мужчин невелика, а существующие формы рака не имеют 100% ассоциации с ВПЧ, проводить скрининговое выявление папилломавирусной инфекции у мужчин не следует. Исследование возможно лишь по эпидемиологическим показаниям и при проведении дифференциальной диагностики клинической формы папилломавирусной инфекции с другими патологиями [7].

В заключение следует отметить, что в нашей стране на сегодняшний день созданы все условия для стандартизации и масштабного использования ВПЧ-тестов в лабораторной службе, т. к. доступны тест-системы, удовлетворяющие международным требованиям, создана сеть лабораторий для работы с этими тест-системами, налажена система обучения специалистов и разработаны панели для контроля качества работы лабораторий.

Список использованной литературы

1. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2000 году. Сборник “Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000”. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2002. С. 85–106.
2. Кувда Д.А., Шипулина О.Ю. Генодиагностика папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска. Количественный подход. Патология шейки матки и генитальные инфекции / под редакцией В.Н. Прилепской. М.: “МЕДпресс-информ”, 2008.
3. Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А. Предрак шейки матки. М.: Издательский дом “Аэрограф-медиа”, 2001. 112 с.
4. Минкина Г.Н., Комарова Е.В., Шипулина О.Ю., Кувда Д.А. Результаты ВПЧ-ДНК генотипирования у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями. Материалы IV съезда акушеров-гинекологов России.
5. Шипулина О.Ю., Кувда Д.А. Перспективы использования тестов для выявления ДНК вируса папилломы человека в программах скрининга рака шейки матки в России. Патология шейки матки и генитальные инфекции / Под редакцией В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс-информ, 2008.
6. Шипулина О.Ю., Кувда Д.А., Ермакова Н.В. и др. Разработка панели контрольных образцов ДНК вирусов папилломы человека, ее валидация и тестирование в ВПЧ-тестах марки “АмплиСенс”. Сборник трудов 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика – 2007”. 2007.
7. Agular L. V., Lazzano-Ponce E., Vaccarella S. Human papillomavirus in men: comparison of different genital sites // Sex. Transm. Inf. 2006. V. 82. P. 31–33.
8. Arbyn M., Sasieni P., Meijer C.J. et al. Clinical applications of HPV testing: A summary of metaanalyses // Vaccine. 2006. Aug V. 24. Suppl 3: P. 78–89.
9. Cuzick J., Mayarand M., Ronco G. et al. New dimentions in cervical canser screening. Vaccine. 2006 Aug 21; 24. Suppl 3: P. 90–97.

10. *Dalstein V., Bory J., Graesslin O.* et al. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Monsonogo J* (ed). Emerging issues on HPV infections: from science to practice. Basel Karger, 2006. P. 103–119.

11. *Gravity P.E., Burk R.D., Lorincz A.* et al. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantification. *Cancer*. 2003. V. 12: P. 477–484.

12. *Hoory T., Monie A., Gravitt P., Wu T.C.* Molecular epidemiology of human papillomavirus // *J Formos Med Assoc*. 2008 Mar.; 107(3), P. 198–217. Review.

13. *McCrary D.C., Matchar D.B., Bastian L.* et al. Evaluation of cervical cytology. *Evid Rep Technol Assess* (Summ). 1999 Jan. V. 5. P. 1–6.

14. *Meijer Chris J.L.M., Berkhof J., Castle P.E.* et al. Guidelines for human papillomavirus DNA tests requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older // *Int. J. Cancer*. 2009. Feb 1. Vol. 124(3). P. 516–520.

15. *Munk C., Svare El., Poll P., Bock J.E., Kjaer S.K.* Risk factors and association with Papanicolaou smear history // *Sexual Transmitted Diseases*. 1997 Noy.; V. 24. P. 567–572.

16. *Munoz N., Bosch F.X., Castellsague X.* et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective // *International Journal of Cancer*. 2004. V. 111. P. 278–285.

17. *Parkin D.M., Bray F.* The burden of HPV-related cancers // *Vaccine*. 2006. Aug V. 24. Suppl 3. P. 11–25.

18. *Peto J., Gilham C., Fletcher O., Matthews F.* The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK // *Lancet*. 2004. V. 364. P. 249–256.

19. *Sniders J., Meijer C.* The Value of Viral Load in HPV Detection in Screening // *HPV today*. 2006. V. 8. P. 8–9.

20. *De Villers E.M., Fauquet C., Broker T.R.* et al. Classification of papillomaviruses // *Virology*. 2004. V. 324. P. 17–27.

21. *Wright T.C. Jr, Schiffman M., Solomon D.* et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening // *Obstetrics and Gynecology*. 2004, Feb., V. 103 (2). P. 304–309.

22. International Agency for Research on Cancer. Human papillomaviruses. Lyon, 2006. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 90).

23. *Cuzick J., Mayrand M., Ronco G.* et al. New dimensions in cervical cancer screening // *Vaccine*. 2006. V. 24. S. 3. P. 90–97.