

## Молекулярные методы в диагностике и профилактике папилломавирусной инфекции и рака шейки матки

Е.Г. Бочкарев, Ю.В. Сергеев

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

ЗАО «Институт аллергологии и клинической иммунологии»

## Moleculare tests in diagnostics and prophylaxis of human papillomaviruses and cervical cancer

E.G. Bochkaryev, Yu.V. Sergeyev

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Allergology and Clinical Immunology Institute, Moscow, Russia

### Аннотация

Представлены современные эпидемиологические данные по основному этиологическому фактору рака шейки матки – вирусу папилломы человека (ВПЧ). Молекулярные методы (полимеразная цепная реакция) выявления ВПЧ являются более экономически эффективными, чувствительными и специфичными по сравнению с традиционными цитологическими.

### Ключевые слова

Вирус папилломы человека, рак шейки матки, диагностика.

### Summary

Modern data on epidemiological investigations, cytology test, polymerase chain reaction (PCR) for the diagnostics of human papillomaviruses and cervical cancer are presented here. Moleculare tests are more effective than traditional cytology tests.

### Key words

Human papillomaviruses, cervical cancer, diagnostics

### Вирусы папилломы человека и ВПЧ-ассоциированные заболевания

Вирусы папилломы человека (ВПЧ), инфицирующие и поражающие слизистые оболочки, образуют группу *аногенитальных* типов вируса, передающихся при половом контакте или новорожденному от инфицированной матери при прохождении через родовые пути [1]. Генитальные вирусы, ответственные за такие заболевания как рецидивирующий папилломатоз гортани у новорожденных, кондиломатоз половых органов относят к группе *низкого канцерогенного риска* (6, 11, 30, 42, 43, 44 и другие типы). Вирусы, ответственные за раковые заболевания слизистой шейки матки, вульвы, полового члена, заднего прохода составляют группу *высоко-*

*го канцерогенного риска (ВКР)* (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типы).

Поскольку вирус передается половым путем, основной пик инфицирования приходится на женщин молодого сексуально активного возраста. По данным наших исследований частота инфицирования ВПЧ ВКР в возрастной группе 16-29 лет в два раза превышает частоту инфицирования в возрастной группе 30-59 лет. Однако следует отметить, что у молодых женщин ВПЧ-инфекция часто имеет *транзитный* характер и вирус спонтанно элиминируется в течение 6-12 месяцев не вызывая серьезных поражений эпителия. У женщин старшей возрастной группы ВПЧ-инфекция чаще бывает *персистирующей*. Длительная персистенция ВПЧ наблю-

дается при стойком угнетении местного иммунитета и приводит к появлению и разрастанию участков пораженного эпителия по типу тяжелой дисплазии. Считается, что в среднем от момента инфицирования до появления тяжелой дисплазии проходит 20 лет. Но в последние годы при более пристальном динамическом изучении ВПЧ-инфекции отмечают увеличение случаев стремительного развития тяжелой дисплазии после момента инфицирования в течение двух лет [2, 3].

Отмечается общий рост инфицированности ВПЧ в мире. Однако частота инфицирования неодинакова в разных странах и даже регионах одной страны. Показано, что частота заболеваемости раком шейки матки зависит от сексуального поведения, а риск инфицирования ВПЧ зависит от возраста начала половой жизни, количества половых партнеров, их возраста и наличия у них заболеваний половых органов, а также от способа контрацепции, наличия сопутствующих инфекций и заболеваний урогенитального тракта.

Распространенность различных типов ВПЧ высокого канцерогенного риска неодинакова в разных странах и регионах. Во многих странах проводится организованный мониторинг распространенности различных типов в популяции [2, 3, 4].

Наши исследования показали, что ВПЧ 16/18 ответственны за 84,6% РШМ, в остальных случаях нами обнаружены ВПЧ других типов (31, 33, 39, 45, 59). Риск развития тяжелой дисплазии и рака зависит от канцерогенности (агрессивности) присутствующего типа ВПЧ. По данным исследований IARC (2003) наибольший риск связан с 16, 18, 31 и 45 типами.

### **Значение ВПЧ-тестов в цервикальном скрининге**

Сложности в ранней прямой диагностике и высокая стоимость лечения рака шейки матки, высокие потери среди трудоспособного женского населения детородного возраста с одной стороны и высокая эффективность, простота и низкая затратность лечения предракового заболевания с другой приводят к тому, что социально и экономически целесообразным становится проведение скринингового обследования с активным вовлечением женского населения [5]. Целями проведения скринингового обследования являются выявление предраковой патологии среди всех женщин детородного возраста и своевременного ее лечения. Более 20 лет про-

граммы скрининга патологии шейки матки с активным вовлечением женщин проводятся во всех странах Евросоюза, США, Канаде, на сегодняшний день так же реализуются программы в Бразилии и Индии.

Основным методом, ранее активно используемым в скрининговых исследованиях является поиск измененных (атипичных) клеток шейки матки (*цитология*). Однако значительный зарубежный и отечественный опыт использования данного метода показал его невысокую пригодность для скрининга с активным вовлечением женщин. Так чувствительность метода не превышает 50-60% при специфичности 80-90%. Кроме того, данный метод обладает относительно низкой пропускной способностью и требует высокой квалификации специалистов.

При ослаблении иммунной системы в течение нескольких лет неконтролируемое деление измененных клеток приводит к образованию обширных участков пораженного эпителия шейки матки - цервикальная интраэпителиальная дисплазия (ЦИН). Количественное и качественное соотношение измененных и нормальных клеток обуславливает тяжесть дисплазии (1, 2 и 3 степень). Дисплазия тяжелой степени (ЦИН 2/3 и неинвазивный рак) являются предраковыми состояниями.

Были предприняты попытки стандартизовать забор материала, автоматизировать приготовление мазка и его окрашивание, компьютеризировать учет результатов исследования. В целом это дало некоторый положительный эффект - повысилась чувствительность теста, но одновременно снизилась его специфичность и увеличился процент неопределенных результатов. При этом значительное повышение себестоимости нового теста ограничивает его широкое использование в скрининговых исследованиях даже в экономически развитых странах.

Скрининговое обследование всех женщин популяции в возрасте 30-64 лет с пятилетним интервалом может привести к снижению заболеваемости РШМ на 84%.

Открытие вирусной природы рака шейки матки позволило значительно улучшить схему скринингового обследования, используя высокочувствительные методы прямого выявления вируса (*полимеразная цепная реакция*). Согласно данным мирового опыта использования ВПЧ тестов в программах скрининга патологии шейки матки, методы прямого выявления ВПЧ позволяют повысить чувствительность

выявления предрака и рака до 98-99%. Параллельное же определение активности (экспрессии) вирусных онкогенов (*реакция NASBA*) позволяет существенно улучшить специфичность исследования [6, 7, 8, 9].

Ведущие мировые организации, занимающиеся проблемой рака шейки матки (IARC WHO, ASCCP, EUROGIN, ESIDOG) в настоящее время рекомендуют использовать ВПЧ-тесты для первичного скрининга.

В ряде стран (Финляндия, Франция, Великобритания, Америка, Индия, Испания и др.) уже накоплен положительный опыт использования различных методов выявления ДНК ВПЧ в скрининговых исследованиях. На основе этого опыта сформированы требования предъявляемые к ВПЧ-тестам, используемым в скрининге:

- ВПЧ-тест должен выявлять широкий спектр генотипов высокого канцерогенного риска (выявление 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 типов обеспечивает не менее 95%-ную чувствительность теста).
- ВПЧ-тест должен обладать высокой клинической чувствительностью выявления тяжелых дисплазий (ЦИН 2/3).
- ВПЧ-тест должен обладать высокой специфичностью, не уступающей цитологическому исследованию, т.е. выявлять клинически значимую концентрацию вируса.
- Стоимость ВПЧ-теста не должна превышать стоимость цитологического исследования [7].

До настоящего времени единственным коммерческим тестом, одобренным FDA\* для скрининга и отвечающим многим из перечисленных требований являлся «ВПЧ Digene-Тест®». Однако высокая стоимость этого теста затрудняет его широкое внедрение в программу скрининговых исследований в России.

В настоящее время разработан и внедрен в практическое здравоохранение города Москвы менее затратный российский ВПЧ-тест, не уступающий по аналитическим характеристикам мировому стандарту [10].

Новый российский ВПЧ-тест основан на полимеразной цепной реакции и выполняется в трех вариантах – с электрофоретической детекцией, с детекцией по конечному флюоресцентному сигналу, с флюоресцентной детекцией в реальном времени.

Основные характеристики нового теста:

- Выявляет широкий спектр генотипов высокого канцерогенного риска – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

- Обладает высокой аналитической чувствительностью (5000 копий ДНК вируса в 1 мл образца).
- Обладает высокой клинической чувствительностью выявления тяжелых дисплазий (не менее 96%).
- Имеет низкую стоимость, не превышающую стоимость цитологического исследования. Преимущества нового теста в сравнении с зарубежными аналогами:
- Внутренний контроль ВПЧ-теста – позволяет контролировать не только успех проведения самого ПЦР-анализа, но и правильность забора клинического материала по наличию в клиническом образце количества эпителиальных клеток достаточного для гарантированной чувствительности – реализован во всех вариантах теста.
- Возможность определения групповой принадлежности вируса – вариант теста выполненный на основе ПЦР с детекцией в реальном времени позволяет определять филогенетическую группу выявленного вируса – А9, А7 или А5, А6. ВПЧ первых двух групп встречаются при ЦИН 2/3 более чем в 90% случаев.
- Возможность количественной оценки вирусной нагрузки – вариант теста выполненный на основе ПЦР с детекцией в реальном времени позволяет оценить вирусную нагрузку относительно филогенетической группы, что важно при прогнозировании развития заболевания и при оценке противовирусной терапии. Тест позволяет определить количество вирионов в стандартном количестве клеток, а не в объеме клинического образца, то есть учитывает ошибку при некачественном заборе материала.
- Возможность работы с разными образцами клинического материала – образцы эпителия, собранные с помощью цитощетки в любую транспортную среду, включая спиртосодержащую фиксирующую среду для жидкостной цитологии, биоптаты слизистой шейки матки – реализована во всех вариантах теста.

#### **Апробация нового ВПЧ-теста в скрининговых исследованиях**

Определение чувствительности и специфичности нового ВПЧ-теста в сравнении с ВПЧ Digene-Тестом®.

Исследовано 280 клинических образцов и 150 контрольных образцов. Чувствительность нового ВПЧ-теста составила 99%, специфич-

ность нового ВПЧ-теста составила 97%. Аналитическая чувствительность в зависимости от генотипа в 5–20 раз превосходила аналитическую чувствительность ВПЧ Digene-Теста®.

Определение клинической чувствительности и специфичности выявления тяжелых дисплазий (ЦИН 2/3) в сравнении с обычной и жидкостной цитологией.

Испытания проведены на клинической базе кафедры акушерства и гинекологии Московского государственного медико-стоматологического университета. Было протестировано 82 образца верифицированных гистологически как «ЦИН 2/3» и 236 образцов верифицированных как «норма/реактивные изменения» от женщин в возрасте 16–68 лет. Чувствительность ВПЧ-теста (в зависимости от варианта) составила 96,3–98,7%, специфичность составила 69,9–84,4%. Чувствительность стандартного цитологического теста составила 55,6%, специфичность составила 91,8%, Чувствительность жидкостной цитологии составила 82,5%, специфичность составила 58,5%.

Эффективность теста первичного скрининга основывается на себестоимости теста, его диагностической чувствительности и специфичности, стоимости лаборатории и подготовки персонала, пропускной способности лаборатории. В таблице представлены сравнительные данные по всем скрининговым тестам.

Из представленных данных следует, что новый ВПЧ-тест обладает аналитическими харак-

теристиками, не уступающими мировым стандартам, а с другой стороны, себестоимость нового теста оказалась сравнимой с себестоимостью обычного цитологического теста. Таким образом, использование нового ВПЧ-теста на первом этапе цервикального скрининга для выявления тяжелых дисплазий не только более эффективно, но и экономически выгодно.

### Профилактика и лечение папилломавирусной инфекции и рака шейки матки

Вирусная природа рака шейки матки является основой для разработки вакцин, проходящих на сегодняшний день III стадию клинических испытаний (начало широкого внедрения – 2008 год) [9, 11].

Внедряемая вакцина является двухкомпонентной и защищает от инфицирования только 16 и 18 типами ВПЧ, которые ответственны за 60–85% тяжелых дисплазий и РШМ. Для оценки эффективности применения вакцины важными являются проведение массовых эпидемиологических исследований с применением молекулярных методов, направленных на изучение распространенности не только 16-го и 18-го, но и других генотипов ВПЧ ВКР: 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 генотипов в норме и при таких патологиях, как тяжелая дисплазия и РШМ.

Основными методами лечения персистентной ВПЧ-инфекции при наличии участков по-

**Таблица 1**

**Сравнительная себестоимость, диагностическая чувствительность, специфичность и пропускная способность различных методов лабораторной диагностики ВПЧ**

Метод лабораторной диагностики	Себестоимость, руб. (включая трудозатраты)	Чувствительность выявления ЦИН 2/3 (%)	Специфичность	Пропускная способность (образцов/день)**
Обычная цитология	120	55,5	91,8	20
Жидкостная цитология	300	82,5	58,5	30
ВПЧ Digene-Тест®.	620	84,3 – 97,6*	84,8 – 96,5*	176
Российский ПЦР-ВПЧ-тест***	100–120	96,3 – 98,7	69,9 – 84,4	216–544

\* - по зарубежным публикациям, т.к. в России испытания по выявлению ЦИН 2/3 не проводились

\*\* - из расчета на двух сотрудников лаборатории

\*\*\* - в зависимости от варианта теста

ражений эпителия являются различные деструктивные методы, хотя в последнее время для лечения легких поражений пытаются применять противовирусные и иммуномодулирующие препараты без использования деструктивных методов. И в том и в другом случае надежным доказательством эффективности проводимого лечения служит не только исчезновение видимого пораженного участка, но и полная или частичная элиминация вируса, показателем которой является его отсутствие или снижение вирусной нагрузки в эпителиальных клетках слизистой. Для этого необходимо использовать молекулярные методы, позволяющие определять концентрацию вируса в стандартном объеме образца или стандартном количестве эпителиальных клеток.

## Литература

1. de Villers E.M. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Rep.* 2001; vol.12: 57-63.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomavirus. – Lyon: IARC. 1995; vol. 64.
3. Bosch F.X., Lorincz A., Munoz N., Meijer CJM et al. The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J.Clin. Pathol.* 2002; 55: 255-265.
4. Ferris D. The GSK HPV 16/18 VLP vaccine-preliminary efficacy results. 5th International Multidisciplinary Congress EUROGIN 2003. Final program and abstracts book. Paris: EUROGIN, 2003.
5. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000 году. М., 2002: 305 с.
6. Liaw K.L., Hildesheim A., Burk R.D., Gravit P., Wacholder S., Manos M.M. et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and association with acquisition and persistence of other HPV types. *J.Infect. Dis.* 2001; vol. 183: 8-15.
7. Manos M.M., Wright D.K., Lewis A.J., Broker T.R. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In Furth M., Greaves M. eds. *Molecular diagnostics of human cancer.* Cold Spring Harbor.- New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: 209-214.
8. Schiffman M., Herero R., Hildesheim A., Sherman M.E., Bratti M. et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a light-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000; vol. 283: 87-93.
9. Wright T.C., Denny L., Kuhn L., Pollack A., Lorincz A. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA* 2000; vol.283: 81.
10. Разработка и апробация ПЦР-тестов для проведения скрининговых исследований на наличие папилломавирусной инфекции и предраковых заболеваний шейки матки. Информ. письмо Департамента здравоохранения город Москвы. М., 2006: 7 с.
11. Rodern R.B., Ling M., Wu T.C. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Hum.pathol.* 2004; vol.35: 971-982.

## Заключение

Затрудненность прямой диагностики и высокая смертность трудоспособного женского населения фертильного возраста от рака шейки матки обуславливают широкое внедрение в здравоохранение низкочрезвычайно затратных скрининговых методов, направленных на выявление его основного этиологического фактора – вируса папилломы человека. Наиболее экономически эффективными, чувствительными и специфичными являются молекулярные тесты на основе полимеразной цепной реакции.

Внедрение вакцинации женского населения против ВПЧ должно сопровождаться массовыми эпидемиологическими исследованиями с применением молекулярных методов, направленными на изучение распространенности не только 16-го и 18-го генотипов ВПЧ, но и других генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска.