

Сучасна ДНК-діагностика папіломавірусної інфекції

С.І. Жук¹, А.М. Кошмеринська², О.А. Таран³

¹Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ

²Житомирський обласний онкологічний диспансер

³Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

У статті висвітлені нові підходи до ДНК-діагностики папіломавірусної інфекції у жінок репродуктивного віку при запальній та незапальній хворобі шийки матки. Виявлено різні типи вірусів папіломи людини, які вражають генітальний тракт, одночасне контамінування декількома типами вірусів при патології шийки матки та залежність клінічної картини від кількісного навантаження вірусу папіломи. Досліджено, що за допомогою системи Квант 21 в режимі реального часу можливо проводити не лише якісну ДНК-діагностику, а й кількісне визначення 21-го типу папіломавірусів, що вражають генітальний тракт, та проконтролювати правильність забору матеріалу. Доведено, що запропонований новий підхід до ДНК-діагностики папіломавірусної інфекції в режимі реального часу можливо використовувати при запальній та незапальній хворобі шийки матки, а враховуючи отримані результати можна правильно розробити тактику лікування та диспансерного спостереження хворих.

Ключові слова: запальна та незапальна хвороба шийки матки, папіломавірусна інфекція, Квант 21, полімеразна ланцюгова реакція.

Папіломавірусна інфекція є достатньо поширеним захворюванням з великою контагіозністю серед жіночого населення України репродуктивного віку та фоновою і передраковою патологією шийки матки [1, 2]. Вважають, що даний вірус є найпоширенішим серед інфекцій, які передаються статевим шляхом (ІПСШ) [4]. За даними ВООЗ на даний час у світі близько 20 млн людей інфіковані вірусом папіломи людини (ВПЛ), принаймні 50% сексуально активних чоловіків і жінок були інфіковані ВПЛ в якийсь момент їхнього статевого життя [6, 7].

На сьогодні відомо вже більше 120 типів папіломавірусів, виявлених у людини, – при цьому 34 типи вражають сексуальні органи і відповідно передаються статевим шляхом.

Однак на відміну від інших інфекцій, які призводять до генітальних захворювань, папіломавіруси є такими, що спричиняють розвиток доброякісних та злоякісних пухлин.

У зв'язку з цим є зрозумілим не тільки біологічний і медичний інтерес до папіломавірусів, але і сприйняття цієї групи вірусів як соціально значущих агентів, причетних до смертельних захворювань в осіб молодого віку, а саме раку шийки матки [14].

Можна вважати доведеним причинний зв'язок раку шийки матки з певними типами ВПЛ. Деякі дослідники вважають, що 10–15% усіх видів раку у людини пов'язані з папіломавірусами [9, 11].

У той самий час зазначену патологію відносять до захворювань, яким можна запобігти, а в разі своєчасної діагностики та адекватного лікування – досягнути повного одужання пацієнтки.

Важливе значення в розвитку клінічних проявів папіломавірусної інфекції мають порушення клітинної та гуморальної ланок імунної системи. С.І. Роговська та співавтори (2005) зазначили зниження співвідношення CD4+/CD8+лімфоцитів (імунорегуляторного індексу) за несприятливого перебігу інфекції. На тлі хронічних запальних процесів розвивається гіпореактивність, яка проявляється значним зниженням здатності клітин крові відповідати продукцією інтерферону на дію індукторів. Порушення місцевого імунітету проявляються зниженням кількості клітин Лангерганса та рівня основних сироваткових імуноглобулінів, пригніченням активності натуральних клітин-кіллерів. У цервікальному слизу знижується концентрація IgA, IgG і з'являються IgM. У разі прогресування інфекції також відбувається пригнічення рівня апоптозу, що стає причиною бурхливої проліферації анапластичних клітин. Гіперестрогенні порушення гормонального балансу також сприяють розвитку інфекції. Інтеграція вірусної ДНК у хромосому інфікованих клітин спричинює високий стійкий синтез вірусного онкобілка E7. Це забезпечує проліферативну активність пухлинного клону та пригнічення системи імунологічного нагляду [9, 10].

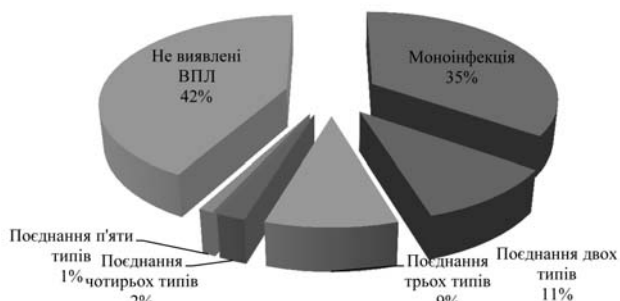
Відомо, що цитомегаловірус, вірус герпесу 2-го типу, трихомонади, *Neisseria gonorrhoeae*, хламідії посилюють диспластичні процеси на вульві, шийці матки. Тому пацієнтки з різними клінічними проявами, характерними для ІПСШ, потребують підвищеної уваги з боку спеціалістів через ризик ураження шийки матки ВПЛ, насамперед його високоонкогенними типами.

Залежно від послідовності нуклеотидів ДНК ВПЛ пронумеровані відповідно до порядку їх ідентифікації: ВПЛ 1-го типу ідентифіковано 1-м; а ВПЛ 16-го типу 16-м по рахунку тощо.

Мішенню дії онкогенних типів ВПЛ є зона трансформації шийки матки. ВПЛ інфікує клітини базального шару в стадії проліферації і відрізняється високим тропізмом до даного типу клітин. Проникнення вірусу відбувається через мікротравми (механічні, бактеріальні), коли їхня глибина досягає базального шару епідермісу. Для виникнення інфекційного процесу достатньо незначне навантаження. Реплікація ДНК ВПЛ відбувається лише в базальному шарі, а в інших шарах вірус здатен тільки до персистенції.

У разі проникнення через мікротравми ВПЛ здатен інфікувати стовбурові клітини базального шару, що призводить до наявності постійного вогнища інфекції епітеліальних клітин, які проходять потім послідовні стадії диференціювання з персистивним репліковано неактивним вірусом.

Унаслідок цього етапами інфекційного процесу є первинна інфекція, персистенція вірусного геному в епісомальній формі з продукцією вірусних частинок, поліклональна інтеграція вірусної ДНК в клітинний геном, індукція мутації в клітинній ДНК, що спричинює не-



Мал. 1. Виявлені ВПЛ при системі Квант 21

стабільність геному, селекцію клону клітин з мутантною ДНК, котра містить інтегровану вірусну ДНК, активне розмноження цього клону клітин і ріст пухлини.

Для діагностики ВПЛ використовують клініко-візуальний метод, що є основним для діагностики клінічних та субклінічних проявів, цитологічний метод, звичайну та розширену кольпоскопію, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) або DIGENE-test, імуноцитологічні методи для визначення капсидного антигена ВПЛ, пап-тест, який є досить інформативним при використанні нової класифікації за Бетездом, електронно-мікроскопічні дослідження для визначення зрілих віріонів у клітинах та гістологічне дослідження.

Серед усіх наведених вище методів діагностики найбільш інформативним залишається ПЛР-діагностика, що дозволяє проводити скринінгові дослідження на наявність високо- і низькоонкогенних штамів ВПЛ, а також генотипування ВПЛ.

Існує багато сучасних методів ПЛР-діагностики для виявлення ВПЛ, однак в останній час досить актуальним залишається не лише якісний скринінг, але і кількісне навантаження ВПЛ. Дану обставину і було покладено в основу діагностики папіломавірусної інфекції за допомогою Кванта 21.

Мета дослідження: ДНК-діагностика, типування та кількісне визначення ВПЛ за допомогою кванта 21 (HRV КВАНТ 21; ДНК-технології) в режимі реального часу, а також контроль забору матеріалу у пацієнок із запальною та незапальною хворобою шийки матки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідження були включені 95 жінок репродуктивного віку із патологією шийки матки: запальні зміни шийки матки (ендо- та екзоцервіцити); ектропіон шийки матки; плоскі кондиломи шийки матки; цервікальна інтраепітеліальна неоплазія шийки матки легкого ступеня; цервікальна інтраепітеліальна неоплазія шийки матки помірного ступеня; цервікальна інтраепітеліальна неоплазія шийки матки важкого ступеня.

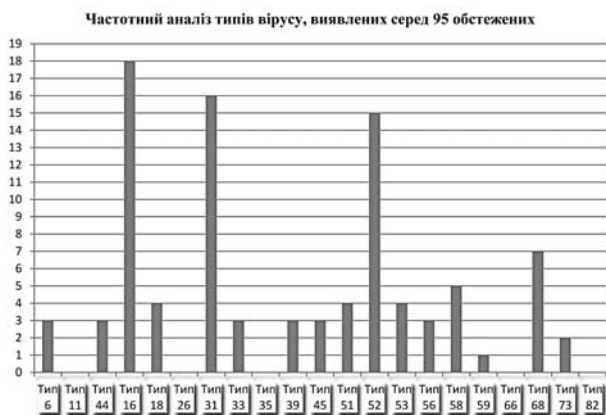
До комплексу обстежень було включено рутинний гінекологічний огляд з одночасним забором матеріалу з екзо- та ендоцервіксу для бактеріологічного та цитологічного дослідження, звичайну та розширену кольпоскопію, гістологічне дослідження біопсійного матеріалу за показаннями.

Діагностика ВПЛ базувалась на принципі методу ПЛР, з використанням процесу ампліфікації ДНК, що полягала в повторюваних циклах: температурній денатурації ДНК, відбитку праймерів з комплементарними послідовностями

Таблиця 1

Типи вірусів виявлені при Квант 21 та їх клінічно значущий показник

Тип вірусу	Кількість пацієнок, в яких виявлений даний тип вірусу		Клінічно значуще навантаження ВПЛ					
			До 3		3–5		Більше 5	
	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%
6	3	3,158	2	2,105	1	1,053	-	0
11	-	0	-	0	-	0	-	0
44	3	3,158	-	0	2	2,105	1	1,053
16	18	18,847	3	3,158	4	4,211	11	11,579
18	4	4,211	2	2,105	-	0	2	2,105
26	-	0	-	0	-	0	-	0
31	16	16,842	7	7,368	4	4,211	5	5,263
33	3	3,158	1	1,053	-	0	1	1,053
35	-	0	-	0	-	0	-	0
39	3	3,158	1	1,053	-	0	2	2,105
45	3	3,158	2	2,105	1	1,053	-	0
51	4	4,211	-	0	2	2,105	2	2,105
52	15	15,789	5	5,263	8	8,421	2	2,105
53	4	4,211	-	0	2	2,105	2	2,105
56	3	3,158	2	2,105	-	0	1	1,053
58	5	5,263	4	4,211	-	0	1	1,053
59	1	1,053	-	0	1	1,053	-	0
66	-	0	-	0	-	0	-	0
68	7	7,368	6	6,316	1	1,053	-	0
73	2	2,105	1	1,053	1	1,053	-	0
82	-	0	-	0	-	0	-	0



Мал. 2. Частотний аналіз типів вірусу, виявлених серед 95 обстежених

і подальшою добувочною полінуклеотидних ланцюгів із даних праймерів Таq-полімеразаю.

Набір реагентів HPV КВАНТ 21 призначений для діагностики, типування та кількісного визначення ДНК ВПЛ низького онкогенного ризику (ВПЛ 6,11,44) середнього та високого онкогенного ризику (ВПЛ 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82). Особливостями набору є специфічність та контроль забору матеріалу.

Дослідження проводили в першу фазу менструального циклу (з 5-го по 15-й день), протягом 3 днів до обстеження не використовували жодних вагінальних препаратів та спринцювання, були відсутні кров'янисті виділення з піхви, протягом 24 год до дослідження відсутність статевого акту, у пацієнток були відсутні будь-які катаральні прояви.

Забір матеріалу проводили перед бімануальним обстеженням, попередньо видаливши стерильним ватним тампоном слиз, запальний ексудат і обробивши шийку матки стерильним фізіологічним розчином. При заборі матеріалу з ендocerвіксу зонд вводили в канал шийки матки на 0,5–1,5 см, а при отриманні матеріалу із екзоцервіксу обережно зскрібали експоліативний клітинний матеріал із піхвової частини шийки матки, зони трансформації.

Зразки отриманого матеріалу транспортували в лабораторію в замороженому вигляді. Замороження проводили відразу після забору матеріалу.

Отриманні результати обробляли за допомогою пакета прикладних програм для статистичного оброблення «Excel».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження за допомогою тест-систем Квант проводили на базах Житомирського обласного онкологічного диспансеру та Клінічного міського пологового будинку № 1 м. Вінниці. Обстеженню підлягало жіноче населення репродуктивного віку даних регіонів із патологією шийки матки. Об'єм обстеження кожної пацієнтки включав рутинний гінекологічний огляд, цитологічне та бактеріоскопічне дослідження, кольпоскопію (просту та розширену) та гістологічне обстеження (за показаннями). Контроль забору матеріалу у всіх пацієнток досліджуваної групи був допустимим та гранично допустимим, що дозволяє нам включити їх у групу спостереження. Вік хворих, у яких проводили ДНК-діагностику ВПЛ за допомогою тест-системи Квант 21 в режимі реального часу при патології шийки матки склав: до 20 років – 2 (2,2%) пацієнтки,

21–30 років – 35 (36,8%), 31–40 – 38 (40%), 41–50 – 14 (14,7%) та більше 51 року – 6 (6,3%). Тривалість захворювання коливалась в межах від 2 до 7 років. Скарги на періодичні виділення з піхви пред'являли 78 пацієнток, що становить 82,1%. Обстеженню підлягали пацієнтки із такими патологічними станами шийки матки: ендocerвіцит виявлений у 35 жінок (36,9%), дисплазія легкого ступеня – у 20 пацієнток (21,1%), дисплазія середнього ступеня – у 14 (14,7%), дисплазія важка – у 8 (8,4%), ектропіон – у 13 (13,7%), поліп каналу шийки матки – у 2 (2,1%) та лейкоплакія лише у 2 (2,1%) пацієнток. При обстеженні ВПЛ був виявлений у 55 жінок із патологією шийки матки, що складає 57,9%. Серед них моноінфекція виявлена у 33 пацієнток (60%), поєднання двох типів папіломавірусів у 10 жінок (18,1%), поєднання трьох типів у 9 пацієнток (16,6%), одночасна персистенція чотирьох типів вірусів у 2 жінок (3,6%) і поєднання п'яти серотипів виявлено у однієї пацієнтки (1,7%). При проведенні даного дослідження встановлено, що найбільш поширеними типами папіломавірусів на території наших регіонів є 16-й тип – виявлений у 18 обстежених жінок, 31-й тип – у 16 пацієнток та 52-й тип – у 15 хворих при фонівій та передраковій патології шийки матки. Одночасна персистенція 16-го та 31-го типів виявлена у трьох жінок, а поєднання 16, 31-го та 52-го типів у двох хворих (мал. 1, 2, табл. 1, 2).

ВИСНОВКИ

Система Квант 21 є високоінформативною сучасною новою методикою ДНК-діагностики ВПЛ, що має великі перспективи застосування при запальній та незапальній патології шийки матки.

Таблиця 2

Поєднання типів вірусів при обстеженні жінок з патологією шийки матки за допомогою системи Квант 21

Поєднання кількох типів вірусів	Кількість пацієнток, в яких виявлено поєднання кількох типів вірусів		
		% від 95, абсолютні показники	% від 55, відносні показники
16+31	3	3,158	5,45
31+68	1	1,053	1,8
31+52	1	1,053	1,8
44+51	1	1,053	1,8
39+51	1	1,053	1,8
52+56	1	1,053	1,8
31+68	1	1,053	1,8
18+45	1	1,053	1,8
16+31+68	1	1,053	1,8
16+52+58	1	1,053	1,8
16+31+52	2	2,105	3,6
31+51+52	1	1,053	1,8
31+58+68	1	1,053	1,8
58+68+73	1	1,053	1,8
31+39+52	1	1,053	1,8
33+52+59	1	1,053	1,8
16+52+56+73	1	1,053	1,8
6+52+56+58	1	1,053	1,8
44+31+52+53+68	1	1,053	1,8

Превагами даної методики є виконання їх в режимі реального часу, генотипування 21-го ВПЛ з його кількісним навантаженням на організм та контроль забору біологічного матеріалу. Квант 21 є зручним у використанні та не потребує додаткових навичок при проведенні забору матеріалу.

Дану методику можна використовувати у жінок репродуктивного віку, що мають суб'єктивні або об'єктивні симптоми, пов'язані з урогенітальним трактом, жінок репродуктивного віку, в яких цитологічно або гістологічно виявлено цервікальну інтраепітеліальну неоплазію II, III ступеня важкості, жінок репродуктивного віку, в яких протягом 1 року періодично цитологічно виявлено цервікальну інтраепітеліальну неоплазію I ступеня важкості, для контролю якості лікування цервікальної інтраепітеліальної неоплазії різного ступеня важкості, лейкоплакії шийки матки та ерозії асоційованих з ВПЛ, при кольпоскопічній картині гіперкератозу та лейкоплакії, при ерозії шийки матки, що тривало не загоюється, після криодеструкції, ДТКонізації та лазерної вапорізації, за наявності поліпів шийки матки та їх рецидивів, за наявності плоских та гострокінцевих кондилом зовнішніх статевих органів, при незахищеному статевому акті з партнером, що має кондиломи зовнішніх статевих органів, плануванні вагітності, репродуктивних втратах, за наявності 3 і більше статевих партнерів.

Современная ДНК-диагностика папилломавирусной инфекции С.И. Жук, А.Н. Кошмеринская, О.А. Таран

В статье освещены новые подходы к ДНК-диагностике папилломавирусной инфекции у женщин репродуктивного возраста при воспалительной и невоспалительной патологии шейки матки. Выявлены разные типы вирусов папилломы человека, которые инфицируют генитальный тракт, одновременное контаминирование несколькими типами вирусов при патологии шейки

матки и зависимость клинической картины от количественной загрузки вируса папилломы человека.

Доказано, что при помощи системы Квант 21 в режиме реального времени можно проводить не только качественную ДНК-диагностику, но и количественное определение 21-го типа папилломавирусов человека, которые инфицируют генитальный тракт, а также проконтролировать правильность забора материала.

Установлено, что предложенный новый подход к ДНК-диагностике папилломавирусной инфекции в режиме реального времени возможно использовать при воспалительной и невоспалительной патологии шейки матки, а учитывая полученные результаты можно правильно подобрать тактику лечения и диспансерного наблюдения больных.

Ключевые слова: воспалительная и невоспалительная патология шейки матки, папилломавирусная инфекция, Квант 21, полимеразная цепная реакция.

Modern DNA diagnosis of human papillomavirus infection

S.I. Zhuk, A.M. Koshmerynska, O.A. Taran

The paper highlights new approaches to the DNA diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections in women of reproductive age in inflammatory and non-inflammatory disease of cervix. Different types of HPV viruses that affect genital tract, simultaneous contamination with several types of viruses in cervical pathology and dependence of clinical picture on quantitative load of papillomavirus. The researched proved that with the help of quantum 21 in real time it is possible to carry out not only high-quality DNA diagnostics but also quantitative determination of 21 type of papilloma viruses that affect genital tract, as well as to verify the reliability of material intake. It has been proved that the new suggested approach to DNA diagnostics of papillomavirus infection in real time can be used in inflammatory and non-inflammatory disease of cervix; therefore taking into consideration the obtained results it becomes possible to develop a profound treatment strategy and clinical observation of patients.

Key words: inflammatory and non-inflammatory disease of cervix, papilloma virus infection, quantum 21, polymerase chain reaction.

Сведения об авторе

Жук Светлана Ивановна – Национальная медицинская академия последилового образования имени П.Л. Шупика, г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9. E-mail: zhuksvitlana@ukr.net

Таран Оксана Анатольевна – Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Винница, ул. Пирогова, 56; тел.: (097) 538-12-06. E-mail: taranoa@ukr.net

Кошмеринская Алина Николаевна – Житомирский областной онкологический диспансер, г. Житомир, ул. Фещенко-Чопивского, 24/4; тел.: (067) 113-62-75. E-mail: alina.koshmerinskaya@mail.ru

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Громова А.М. Патологічна характеристика фонових і передракових захворювань шийки матки, асоційованих з папіломавірусною інфекцією / А.М. Громова, Е.І. Крутікова, А.В. Білаш // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2002. – № 6. – С. 86–91.
- Кишакевич І.Г. Удосконалення лікування фонових захворювань шийки матки у жінок з папіломавірусною та герпетичною інфекціями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.01.01 «Акушерство і гінекологія» / І.Т. Кишакевич. – Львів, 2004. – 20 с.
- Коханевич Е.В. Актуальные вопросы акушерства, гинекологии и репродуктологии. – М.: Трида Х, 2006. – 480 с.
- Коханевич Е.В. Тактика лікування дисплазії епітелію шийки матки при порушенні гормонального статусу / Е.В. Коханевич, А.А. Суханова, В.В. Семченко // Збірник наукових праць Асоц. *Статья поступила в редакцию 11.04.2013*
- акуш.-гінек. України. – К.: ТМК, 2000. – С. 466–469.
- Козлюк В.А. Клинические, молекулярно-биологические и цитоморфологические особенности заболеваний шейки матки на фоне папилломавирусной инфекции / В.А. Козлюк, А.С. Козлюк, К.В. Прощаков // Репродуктивное здоровье женщины. – 2004. – № 1 (17). – С. 40–44.
- Кулаков В.И. Папилломавирусная инфекция гениталий. Клиника, диагностика и лечение / В.И. Кулаков, С.И. Роговская, Т.Н. Бебнева // Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы: Клинические лекции / Под ред. проф. В.Н. Прилепской. – 4-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2005. – С. 241–254.
- Прилепская В.Н. Папилломавирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика / В.Н. Прилепская, С.И. Роговская, Н.И. Кондриков, Г.Т. Сухих – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 32 с.
- Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки: методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии: клиническая лекция / В.Н. Прилепская // Гинекология, 2007. – Т. 9, № 1. – С. 12–15.
- Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 141 с.
- Роговская С.И. Клинико-морфологические особенности папилломавирусной инфекции гениталий у женщин / С.И. Роговская, И.С. Ежова, В.Н. Прилепская и др. // Гинекология. 2004. – Т. 6, № 2. – С. 57–59.
- Сопко Н.И. Современные представления о папилломавирусной инфекции / Н.И. Сопко, В.В. Максимов // Мед. аспекты жен. здоровья. – 2006. – № 3. – С. 23–25.
- Human papillomavirus infection and cervical cytology in women screened for cervical cancer in the United States, 2003–2005 / S.D. Datta, L.A. Koutsky, S. Ratelle [et al.] // *ann. Intern. Medicine.* – 2008. – Vol. 148. – P. 493–500.
- Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening acceptability among adults in Quebec, Canada / C. Sauvageau, B. Duval, V. Gilca [et al.] // *BMC Public Health.* – 2007. – Vol. 7. – P. 304.
- Human papillomavirus and cervical cancer / E.M. Burd // *Clin. Microbiol. Reviev.* – 2003. – Vol. 16. – P. 1–16.
- Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review / A.G. Ostor // *Int J Gynecol Pathol.* – 1993. – Vol. 12 (2). – P. 186–192.
- Human Papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study / Schwartz S.M., Daling J.R., Shera K.A. et al // *J Clin Oncol.* – 2001. – Vol. 19 (7). – P. 196–215.