

УДК 616.62–006.52–055.2–02+618.1–006.52–055.2–02

Диагностика генотипов вируса папилломы человека при смешанных урогенитальных инфекциях у женщин

Е.П. ШЕВЧЕНКО¹, к. мед. н.; Е.Ю.МАЦАС², Е.И. МУЛЬКИНА²

¹Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца, Киев,

²Александровская клиническая больница, Киев/

Резюме

Діагностика генотипів вірусу папіломи людини при змішаних урогенітальних інфекціях у жінок

О.П.Шевченко, О.Ю.Мацас, О.І. Мульткина

У роботі представлені результати дослідження виявлення ДНК високоонкогенних типів вірусу папіломи людини (ВПЛ) у жінок репродуктивного віку, поширеність генотипів та поєднання їх з іншими патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами.

При обстеженні методом ПЛР 1888 жінок репродуктивного віку у 820 (43,4%) пацієнток було виявлено ДНК ВПЛ. Серед високоонкогенних типів ВПЛ найбільш поширеними були 56 (29,5%) тип, 16 (25,5%) тип і 18 (13,9%) тип. Генотипи 33, 39, 45, 58, 59 відмічались в поодиноких випадках (від 0,2 до 0,9%), генотипи 31, 35, 52, 66 зайняли проміжне місце (від 1,9 до 3,0%).

Найчастіше папіломавірус поєднувався з умовно-патогенними мікроорганізмами: *U. urealyticum* – 38,6%, *G. vaginalis* – 27,7%, *M. hominis* – 18,8%. Рідше мікст-інфекції спостерігались з вірусами герпесу: HSV – 2,3%, CMV – 3,0% і абсолютними патогенами: *Chl. Trachomatis* – 6,9%, *T. vaginalis* – 9,7%, *M. genitalium* – 2,8%. У двох клінічних випадках було діагностовано поєднання ПВІ з гонорейною інфекцією – 0,3%.

Встановлено доцільність проведення клініко-лабораторних досліджень всіх пацієнток з ПВІ на присутність інших урогенітальних інфекцій, що дасть змогу проводити диференційовану терапію мікст-інфекцій урогенітального тракту.

Ключові слова: вірус папіломи людини, високоонкогенні типи, змішані урогенітальні інфекції, умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми

Summary

Diagnosis Human Papillomavirus Genotypes Among Women with Mixed Genitourinary Infections

E.P. Shevchenko, E.Y. Matsas, E.I. Mulkina

The Summary presents the results of the study to detect DNA FROM oncogenic types of human papilloma virus in women of reproductive age. Distribution of genotypes and their occurrence with other pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms.

When a method of PCR 1888 women of reproductive age in 820 (43,4%) the patient was detected of HPV DNA. Among the most common HPV types oncogenic were 56 (29,5%) type, 16 (25,5%) type and 18 (13,9%) type. Genotypes 33, 39, 45, 58, 59 we have in rare cases (from 0,2% to 0,9%), genotypes 31, 35, 52, 66 – occupied an intermediate position (from 1,9% to 3,0%).

Often the papillomavirus combined from conditionally pathogens: *U. urealyticum* – 38,6%, *G. vaginalis* – 27,7%, *M. hominis* – 18,8%. Less mixed-infections were observed with viruses of Herpes: HSV is 2,3%, CMV – 3,0% and absolute pathogens: *Chl. trachomatis* – 6,9%, *T. vaginalis* – 9,7%, *M. genitalium* – 2,8%. In two clinical cases have been diagnosed of PVI with gonorrhea infection-0,3%.

The feasibility of conducting clinical and laboratory researches all patients with PVI in the presence of other infections that produce differentiated therapy of mixed-infections of urogenital tract.

Key words: human papilloma virus, oncogenic types, mixed-infections of urogenital tract, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms

На современном этапе папилломавирусная инфекция (ПВИ) занимает одно из ведущих мест по распространенности среди урогенитальных инфекций, особенно в возрастной категории сексуально активного населения [9].

Результаты исследований последних десятилетий свидетельствуют о тенденции возрастания значения некоторых вирусных агентов, в частности вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса простого герпеса, цитомегаловируса в этиологии возникновения урогенитальных инфекций. Многими авторами акцентируется также внимание на повышении уровня микст-инфекционного

поражения слизистых урогенитального тракта этими вирусами в сочетании с рядом патогенных бактерий, а также особенностях взаимоотношений различных инфекционных агентов [1,2].

В эпидемиологических исследованиях папилломавирусной инфекции убедительно представлена социальная значимость и опасность поражения ано- и урогенитальной сферы ВПЧ, а также недостаточность клинико-лабораторной базы диагностических исследований при данной инфекции.

Вирус папилломы человека проявляет тропизм к поражению кожи, слизистой оболочки рта, половых органов, прямой кишки,

конъюнктивы, пищевода, бронхов. Клинические проявления ПВИ гениталий очень вариабельны. В настоящее время они подразделяются на остроконечные кондиломы, папиллярные разновидности кондилом (с выраженным экзофитным ростом), а также плоские и инвертированные (внутриэпителиальные) кондиломы с эндофитным псевдоинвазивным ростом. Идентифицированы более 100 типов ВПЧ, из которых четверть поражает женскую половую систему. Типы ВПЧ, поражающие аногенитальную область, разделяют по степени онкогенного риска (высокая, средняя и низкая). ВПЧ типа 6, 11, 36, 42, 43, 44, 46, 47, 50 могут вызывать незначительные или пограничные изменения ядер клеток, в то время как типы ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 являются основным этиологическим фактором предраковых и раковых поражений шейки матки [8].

Вирионы ВПЧ не имеют оболочки, диаметр их равен 50–55 нм. Геном представлен двуспиральной кольцевидно скрученной ДНК. В процессе репликационного цикла экспрессируется от 8 до 10 белковых продуктов. Наиболее важными с точки зрения онкопотенциала вируса папилломы человека являются ранние белки E6, E7.

Течение папилломавирусной инфекции проходит в два этапа (стадии): репродуктивного размножения и интегративной инфекции, при которой ДНК вируса встраивается в геном зараженных клеток. Если первая стадия обратима и чаще всего завершается спонтанной ремиссией, то вторая в большинстве случаев заканчивается развитием опухоли [10]. Установлено, что интеграция ДНК ВПЧ в геном эпителиальных клеток слизистой и кожи сопровождается активным синтезом онкобелков вируса – E6 и E7, т.е. их обнаружение в цервикальных пробах однозначно свидетельствует о начале процесса малигнизации эпителиоцитов, содержащих интегрированную копию генома ВПЧ. Мишенью для ВПЧ являются клетки базального слоя плоского эпителия, которые становятся доступными для внедрения вируса при микротравмах слизистой оболочки, преимущественно в зоне трансформации. Репликация и развитие вируса продолжается по мере созревания эпителиальных клеток и продвижения их к поверхности эпителиального пласта.

Поражение может носить латентное течение, встречается также бессимптомное носительство. При бессимптомной форме инфекции происходит только репликация вируса в клетки. Несмотря на то, что вирус проходит полный инфекционный цикл с возможностью заражения другого человека при половом контакте, морфологических изменений в гистологических и цитологических препаратах практически не отмечается. Чаще при такой транзиторной форме инфекции вирус исчезает в течение нескольких месяцев, возможно, вследствие высокого иммунного ответа. Результатом трансформирующего действия ВПЧ могут быть внутриэпителиальные поражения (дисплазия, внутриэпителиальный рак) и инвазивный рак.

Считается, что формирование непрерывного патологического процесса в шейке матки «цервикальной интраэпителиальной неоплазии» (CIN) происходит путем смены фаз: CIN I, CIN II, CIN III [6]. При первой стадии неоплазии (CIN I) наблюдается активная репликация вируса и его бессимптомное выделение. Превращение в инвазивный рак происходит с очень высокой частотой и, как правило, сопровождается интеграцией вирусной ДНК в геном клетки хозяина. Однако даже в интегрированной форме вирусный геном может быть функционально не активным и активизируется под влиянием ряда экзогенных факторов, в том числе урогенитальных инфекций. Наиболее существенным является сочетание с бактериальным вагинозом, урогенитальным микоплазмозом, хламидиозом, цитомегаловирусной и герпетической инфекциями. Наличие

микст-инфекций также оказывает влияние на клиническое течение заболевания и требует дифференцированной терапии [3].

Без лечения ВПЧ может спонтанно инволюционировать (в 90% случаев), длительно персистировать или увеличиваться в размере и количестве, трансформируясь в рак (10%). Рак *in situ* без лечения переходит в инвазивный рак в 36% случаях за 3,8–5,7 года [10].

Прогноз папилломавирусной инфекции зависит от типа обособившего ВПЧ, сопутствующих заболеваний, включая инфекции, передающиеся половым путем (ИППП). Современные эпидемиологические данные указывают на то, что наличие, по меньшей мере, одной, а возможно, и нескольких ИППП ускоряет развитие цервикальной дисплазии и является фактором риска инвазивного цервикального рака. Если ВПЧ-16 обычно приводит к развитию плоскоклеточного рака, то ВПЧ-18 – к развитию аденокарциномы шейки матки – формы рака с очень неблагоприятным прогнозом. Неблагоприятным прогностическим фактором является и молодой возраст пациенток [5].

В настоящее время наиболее эффективной методологией, позволяющей детектировать и типировать вирус папилломы человека, является ПЦР-анализ [1]. Созданные в России тест-системы: «АмплиСенс ВПЧ ВКР Скрин» и «АмплиСенс ВПЧ ВКР Генотип» обеспечивают диагностику с чувствительностью соответственно 87,6 и 86,5% [4].

Цель работы. Определение частоты выявляемости генотипов ВПЧ высокого риска онкогенности и определение процентного соотношения его выявляемости в сочетании с другими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами у женщин репродуктивного возраста при различной урогенитальной патологии.

Материалы и методы исследований

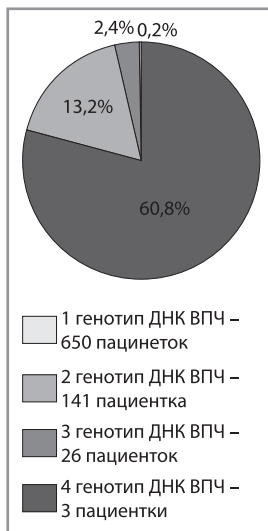
В отделе ДНК-технологий клинической лаборатории Александровской клинической больницы г. Киева в период 2009–2011 гг. было обследовано 1888 пациенток фертильного возраста от 17 до 46 лет (средний возраст составлял 28 лет) на наличие ДНК ВПЧ высокого риска онкогенности 16, 31, 33, 35, 18, 39, 45, 59, 52, 56, 58, 66 типов в отделяемом из урогенитального тракта. Исследование проводилось с использованием набора реагентов «АмплиСенс» ВПЧ ВКР Генотип – EPh», производства ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва. Амплификация проводилась с помощью термоциклера «Терцик» фирмы «ДНК – технология», Россия, и амплификатора «Corbett Research», Австрия. Наличие ДНК *Ch. trachomatis*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, CMV, HSV, *G. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis* определялось с использованием наборов производства ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва. Детекция продуктов амплификации на наличие папилломавирусов и трихомонад проводилась в агарозном геле, с последующей визуализацией при помощи гель-документирующей системы DNA-analyzez. Остальные инфекционные агенты определялись с помощью детектора АЛА – 1/4 с флуоресцирующим сигналом по конечной точке.

Результаты и их обсуждение

Проведенные нами исследования позволили выявить ДНК папилломавируса у 820 (43,4%) из 1888 обследованных женщин. При этом проведенный ПЦР-анализ с типированием ВПЧ позволил определить, что у пациенток в разном проценте случаев выявлялись 12 генотипов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66). Исследования позволили также проследить распространенность ПВИ с последующим генотипированием. Наиболее распростра-

Таблиця. Распределение выявленных генотипов ВПЧ у обследованных женщин

Типы ВПЧ высокого риска онкогенности	Абсолютное количество положительных результатов	Процент встречаемости (по мере убывания) (%)
56	242	29,5
16	185	25,5
18	144	13,9
35	25	3,0
31	24	2,9
66	22	2,6
52	16	1,9
45	8	0,9
59	5	0,6
33	4	0,4
35	3	0,3
58	3	0,3

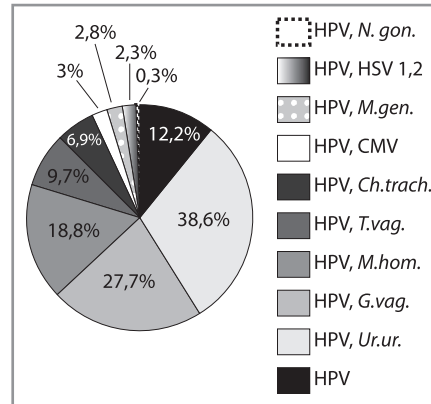
**Рис. 1.** Диагностированное количество генотипов ДНК ВПЧ у 820 обследованных женщин, инфицированных вирусом папилломы человека

женными типами ВПЧ высокой степени онкогенности были 56 (29,5%) и 16 (25,5%) типы, 18 тип был выявлен у 13,9% обследованных пациенток. Генотипы 33, 39, 45, 58, 59 были зарегистрированы в единичных случаях, в частности от 0,2 до 0,9% обследованных, генотипы 31, 35, 52, 66 занимали промежуточное место (от 1,9 до 3,0%) (таблица).

Анализ результатов ДНК-исследования ВПЧ высокого риска онкогенности свидетельствовал, что некоторые пациентки были заражены не одним типом папилломавируса, а двумя или даже несколькими. Так, среди 820 обследованных инфицированных ВПЧ пациенток у 650 (60,8%) женщин был диагностирован один тип папилломавируса высокого риска онкогенности. У 141 (13,2%) пациентки было выявлено два генотипа ДНК ВПЧ, в различных комбинациях. Три генотипа ДНК ВПЧ было диагностировано у 26 (2,4%) обследованных, а четыре генотипа – у 3 (0,2%) обследованных женщин (рис. 1).

У обследованных женщин наблюдались различные сочетания некоторых генотипов ВПЧ высокого риска онкогенности, однако определенные комбинации встречались достаточно часто. Так, из обнаруженных двух высокоонкогенных типов ВПЧ в одном организме, в 48 случаях были выявлены генотипы 16 и 56; в 36 случаях – генотипы 18 и 56; в 25 случаях – генотипы 16 и 18; в 7 случаях – генотипы 16 и 35. Кроме того, в 15 случаях была зарегистрирована комбинация трех высокоонкогенных генотипов ВПЧ, в частности 16, 18 и 56.

Учитывая, что папилломавирусная инфекция в сочетании с другими ИППП может ускорять развитие инвазивного цервикального рака, инфицированные ВПЧ пациенты были также обследо-

**Рис. 2.** Диагностированные ассоциации ВПЧ с другими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами

ваны на наличие других патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Из 820 обследованных нами женщин, инфицированных ВПЧ высокого онкогенного типа, исследования на наличие смешанных урогенитальных инфекций были проведены у 607 пациенток. Согласно результатам этих исследований у 74 (12,2%) инфицированных ВПЧ пациенток не было выявлено сопутствующих урогенитальных инфекций. У остальных 533 (87,8%) пациенток было диагностировано сочетание ВПЧ с другими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В частности, отмечались значительные ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами, такими как *U. urealyticum* – у 206 пациенток (38,6%), *G. vaginalis* – у 148 (27,7%), *M. hominis* – у 114 (18,8%) женщин. Реже микст-инфекции выявлялись в сочетании с другими вирусными инфекциями: I и II типами вируса простого герпеса (HSV) – 14 (2,3%) пациенток, цитомегаловирусом (CMV) – 16 (3,0%) пациенток. Сочетанность с абсолютными патогенами распределилась следующим образом: *Ch. trachomatis* – у 37 (6,9%) женщин, *T. vaginalis* – у 52 (9,7%), *M. genitalium* – у 15 (2,8%) женщин. У двух пациенток было диагностировано сочетание ВПЧ с гонорейной инфекцией (0,3%) (рис. 2).

Выводы

1. При обследовании методом ПЦР-анализа 1888 женщин молодого репродуктивного возраста у 820 (43,4%) пациенток было выявлено ДНК ВПЧ.
2. Среди высокоонкогенных типов ВПЧ, выделенных из клеток урогенитального тракта обследованных женщин, наиболее распространенными были 56 (29,5%) тип, 16 (25,5%) тип и 18 (13,9%) тип. Генотипы 33, 39, 45, 58, 59 отмечались у обследованных женщин в единичных случаях (от 0,2 до 0,9%), генотипы 31, 35, 52, 66 – занимали промежуточное место (от 1,9 до 3,0%).
3. Инфицирование одним типом ВПЧ высокого риска онкогенности было диагностировано у 650 (60,8%) из 820 обследованных женщин, двумя типами ВПЧ – у 142 (13,2%), тремя типами ВПЧ – у 26 (2,4%).
4. Инфицирование папилломавирусом у обследованных женщин чаще всего сочеталось с инфицированием другими урогенитальными инфекциями. Без ассоциантов было выделено ДНК ВПЧ у 74 пациенток (12,2%). Чаще всего папилломавирус сочетался с условно-патогенными микроорганизмами: *U. urealyticum* – 38,6%, *G. vaginalis* – 27,7%, *M. hominis* – 18,8%. Реже микст-инфекции наблюдались с вирусами герпеса:

CMV – 3,0%, HSV – 2,3% и абсолютными патогенами: *Chl. Trachomatis* – 6,9%, *T. vaginalis* – 9,7%, *M. genitalium* – 2,8%. В двух клинических случаях было диагностировано сочетание ПВИ с гонорейной инфекцией – 0,3%.

5. Анализ результатов проведенных исследований указывает на целесообразность проведения комплексного клинико-лабораторного обследования всех пациенток с ПВИ на наличие других урогенитальных инфекций, что позволяет проводить дифференцированную терапию микст-инфекций урогенитального тракта.

Список использованной литературы

1. Дмитриев Г.А., Глазко И.И. Диагностика инфекций, передаваемых половым путем. – М.: БИНОМ, 2007. – С. 255–265.
2. Инфекции, передаваемые половым путем. Клиника, диагностика, лечение. / Под редакцией В.А. Молочкова, О.И. Иванова, В.В.Чеботарева. – М.: ОАО. Издательство «Медицина», 2006. – С. 496–515.
3. Кисина В.И., Новикова Н.Г., Михалко О.Е. и др. Роль бактериальных и вирусных агентов в патогенезе фоновых и диспластических процессов слизистой оболочки шейки матки и влагалища // Вестник дерматол. – 2002. – № 2 – С. 40–45.
4. Куевда Д.А. Разработка и апробация тест – систем для генотипирования вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска на основе мульти-праймерной ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) / Д.А.Куевда, О.Ю.Шипулина/ Сб. трудов 5-й Всерос. Научно-прак. конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» – М., 2004.
5. Мазуренко Н.Н. Роль вирусов папилломы в канцерогенезе шейки матки // Современная онкология. – 2003. – №1 – С. 7–10.
6. Молочков В.А., Семенова Т.Б., Киселев В.И., Молочков А.В. Генитальные вирусные инфекции. – М.: БИНОМ, 2009. – С. 108–172.
7. Шабалова И.П., Касоян К.Т. Цитологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки / 3-е изд. Испр. и доп. – М., Тверь: Триода, 2010. – С. 108–123.
8. Шейка матки. Цитологический атлас / пер. с англ. Э. Титмуш, К. Адамс // Под ред. Н.И. Кондрикова. – М.: Практическая медицина, 2009. – С. 107–112.
9. Baner H. Ting/Y/ Creer C/ Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by PCR – based method // JAMA. – 1999. – Vol. 265 – P.472–477.
10. Rubin S.C., Hoskin N.J. et al. Cervical cancer and preinvasive neoplasia. – Philadelphia, 2006 – Lippincott – Raven.