

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

Н.М. Зарецкая, Е.В. Петухова, А.В. Соленкова, Л.Н. Брицкая, Б.Я. Тимофеев, Л.Л. Игнатенко, Е.Ю. Островская, Т.Н. Леонова, Н.И. Разливаева, ФГБУ «Объединённая больница с поликлиникой» УД Президента РФ, г. Москва

Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к наиболее распространённым инфекциям, передающимся половым путём и имеет важное значение в патогенезе возникновения и развития рака шейки матки.

Классическим клиническим проявлением папилломавирусной инфекции являются кондиломы — множественные папиллярные выросты, основой которых является фиброзная ткань, покрытая многослойным плоским эпителием. Кондиломы могут быть остроконечными, плоскими, гигантскими, эндофитными. Цитопатический эффект вируса может проявляться и другими поражениями: патологическое ороговение, дисплазия, внутриэпителиальный рак. Поражение вирусом папилломы человека иногда протекает латентно, встречается и бессимптомное носительство. Характерным цитологическим признаком папилломавирусной инфекции является, так называемая, койлоцитарная атипия (Рисунок 1).

Койлоциты — клетки плоского эпителия неправильной формы с чёткими границами, характерно наличие дегенеративных изменений ядер и обширной перинуклеарной зоны просветления, связанной с некрозом цитоплазмы. Развитие дисплазии и неопластических изменений (CIN) при папилломавирусной инфекции является сложным процессом, зависящим от множества случайных биологических событий. В отдельных случаях может появиться злокачественный клон клеток, способный сохраниться и впоследствии привести к возникновению рака. Особенно высока вероятность перехода доброкачественного ВПЧ-индуцированного поражения в рак шейки матки при инфицировании высокоонкогенными типами ВПЧ. Из известных в настоящее время более 100 типов ВПЧ, 15 являются онкогенными и присутствуют в патогенезе более 70% случаев развития рака шейки матки. По данным исследований проведённых Международным агентством по изучению рака, ВПЧ 16 типа выявляется в 54% случаев развития плоскоклеточного рака и в 42% случаев развития аденокарциномы, а ВПЧ 18 — в 11% случаев и 37% случаев соответственно.

К факторам, усиливающим неопластическую роль ВПЧ, относят некоторые инфекции, генетические особенности и состояние иммунного статуса. Наиболее значимыми являются

сочетания ВПЧ с бактериальным вагинозом, герпетической и цитомегаловирусной инфекцией, микоплазмозом, урогенитальным хламидиозом.

Всех пациентов, в особенности женщин, с клиническими признаками папилломавирусного поражения необходимо тщательным образом обследовать. Вероятность самопроизвольного очищения от ВПЧ-носительства и возможность спонтанной регрессии как клинических, так и субклинических форм папилломавирусной инфекции склоняет к наблюдательной тактике. По литературным данным, персистирующее носительство ВПЧ первоначально диагностированных типов отмечено у 55% пациенток, при этом у 10% обнаруживается смена серотипа. После этого тщательное наблюдение продолжается в течении длительного времени. Практически у 50% пациенток происходит самоочищение от ВПЧ в течении 1-2 лет, а в течении 3 лет наблюдения самопроизвольно элиминируются около 70% ВПЧ высокоонкогенных типов и около 90% низкоонкогенных типов. Отмечается, что клиническая манифестация инфекции происходит только у женщин с персистенцией ВПЧ и, как правило, на фоне дисбаланса иммунного статуса. При отсутствии данных за злокачественное поражение пациенткам возможно проведение электрокоагуляции, криодеструкции или лазерного удаления очага поражения.

В рамках проведения комплексного диспансерного обследования у женщин с доброкачественными заболеваниями шейки матки с подозрением на CIN и эндоцервикозы проводится не только кольпоскопическое обследование, но и цитологическое (скрининговое, а при необходимости и диагностическое, исследование мазков), а так же ПЦР-исследование по соскобам. На основании имеющихся литературных данных, нами проведён ряд собственных лабораторных исследований.

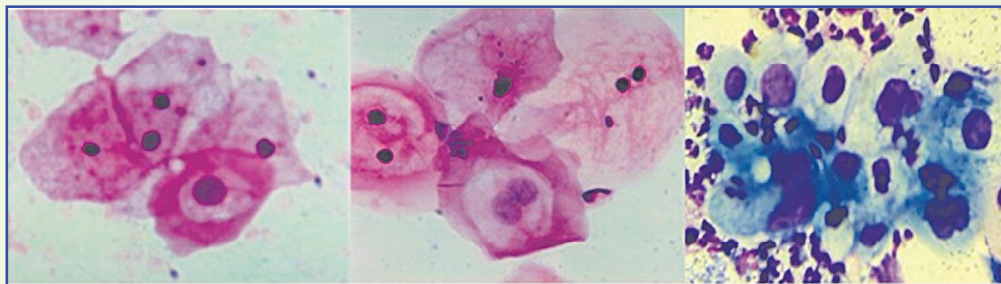


Рисунок 1. Характерные изменения эпителиальных клеток при поражении ВПЧ. [Собственные микрофотографии препаратов мазка с шейки матки, окрашенных по Романовскому-Гимзе; увеличение $\times 600$].

В течение одного года проведены исследования у 2 339 женщин, в возрасте от 19 до 58 лет. Все пациентки проходили регулярное диспансерное обследование у врача-гинеколога не менее одного раза в год. Всем пациенткам были взяты мазки для цитологического исследования, а у 151 пациентки выполнено ПЦР-исследование на ВПЧ. При этом, в ряде случаев, нами были отмечены некоторые несовпадения в назначениях лечащих врачей: нескольким пациенткам с подозрением на ВПЧ при цитологическом исследовании ПЦР-диагностика не проводилась. Данные несовпадения показаны в представленных далее результатах нашей работы и отражены в выводах публикации.

При цитологическом исследовании мазков уделялось внимание гинекологическому статусу с назначением на диагностическое обследование. Присланные препараты с нанесённым на стекло материалом, высушенные на воздухе окрашивались по Романовскому-Гимзе с использованием стандартизованного набора красителей Leucodif-200, ЗАО «Лахема Интернэшнл», Россия, г. Москва. Просмотр препаратов проводился с использованием микроскопа «OLYMPUS Cx31», «OLYMPUS Corporation», Япония.

Выявление ДНК ВПЧ проводили с использованием многофункционального высокоскоростного амплификатора CFX-96 «REAL TIME», Bio-Rad, США, и тест-систем серии «Реал-Бест», ЗАО «Вектор-Бест», Россия, г. Новосибирск, для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска 16, 18, 31, 33, а так же скрининг-тестов ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов с одновременным количественным определением вирусной нагрузки в режиме реального времени. Тест-системы «Реал-Бест» позволяют выявлять точное количество вируса и номинировать его на количество попавших в образец клеток человека, что нивелирует вариации результата, связанные с неадекватным забором материала. Все расчёты проводились автоматически на ПК с использованием программы «Реал-Бест Диагностика» ЗАО «Вектор-Бест», Россия, г. Новосибирск, 2012 г.

В ходе проведения лабораторных исследований нами был выявлен ВПЧ у 60 пациенток. При этом, у 8 пациенток было дано цитологическое заключение о подозрении на ВПЧ на фоне доброкачественного заболевания шейки матки (CIN-1, CIN-2, CIN-3), у 3 из них результаты исследования были подтверждены с помощью ПЦР-диагностики,

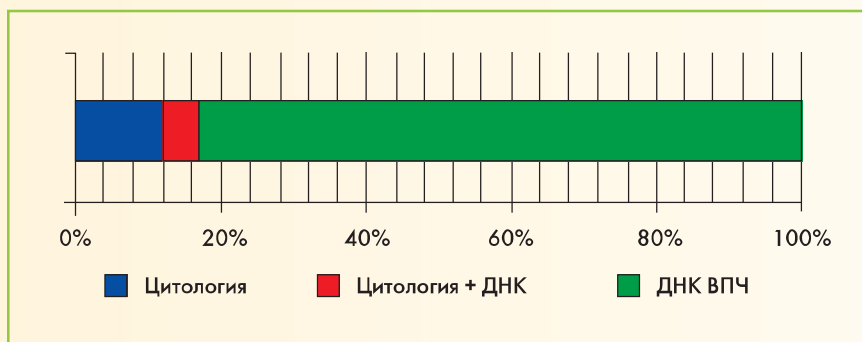


Диаграмма 1. Группа обследованных пациенток с выявленным ВПЧ.

у 5 пациенток ПЦР-диагностика не проводилась. Всего при проведении ПЦР-диагностики ДНК ВПЧ была обнаружена у 55 пациенток (Диаграмма 1, таблица 1).

Данные, представленные в диаграмме 1, свидетельствуют, что у 60 пациенток из обследованной нами группы был обнару-

Таблица 1. Результаты собственных цитологических исследований и ПЦР-диагностики.

Пациент	Цитологические изменения	ПЦР-диагностика		
		ВПЧ 16	ВПЧ 18	ВПЧ 35
В., жен. 22 года	Цитограмма эпителиальной дисплазии 2 ст. (CIN-2) Элементы воспаления Подозрение на ВПЧ	+	-	-
Л., жен. 51 год	Отмечаются признаки дискариоза в отдельных клетках Подозрение на ВПЧ	-	+	-
К., жен. 53 года	Цитограмма эпителиальной дисплазии 3 ст. (CIN-3) Цитологические признаки ВПЧ	-	-	+

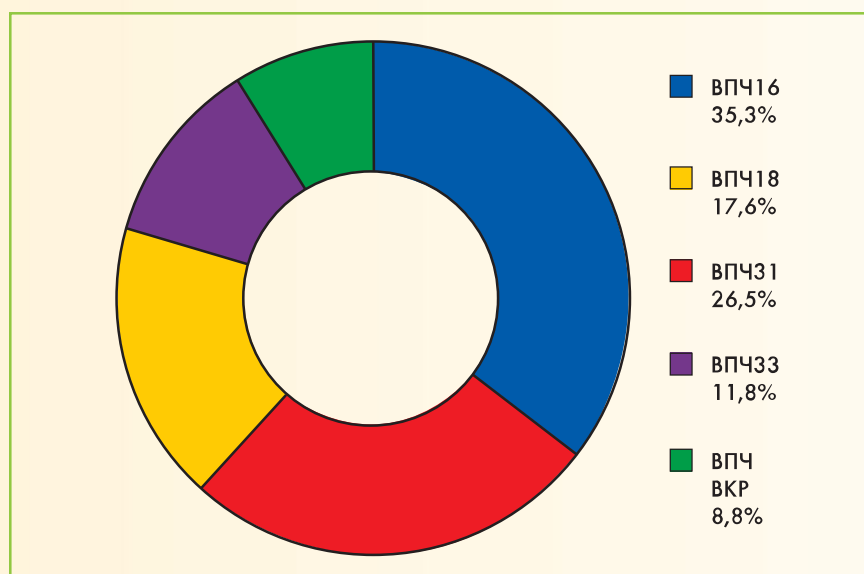


Диаграмма 2. Частота выявления генотипов ВПЧ.

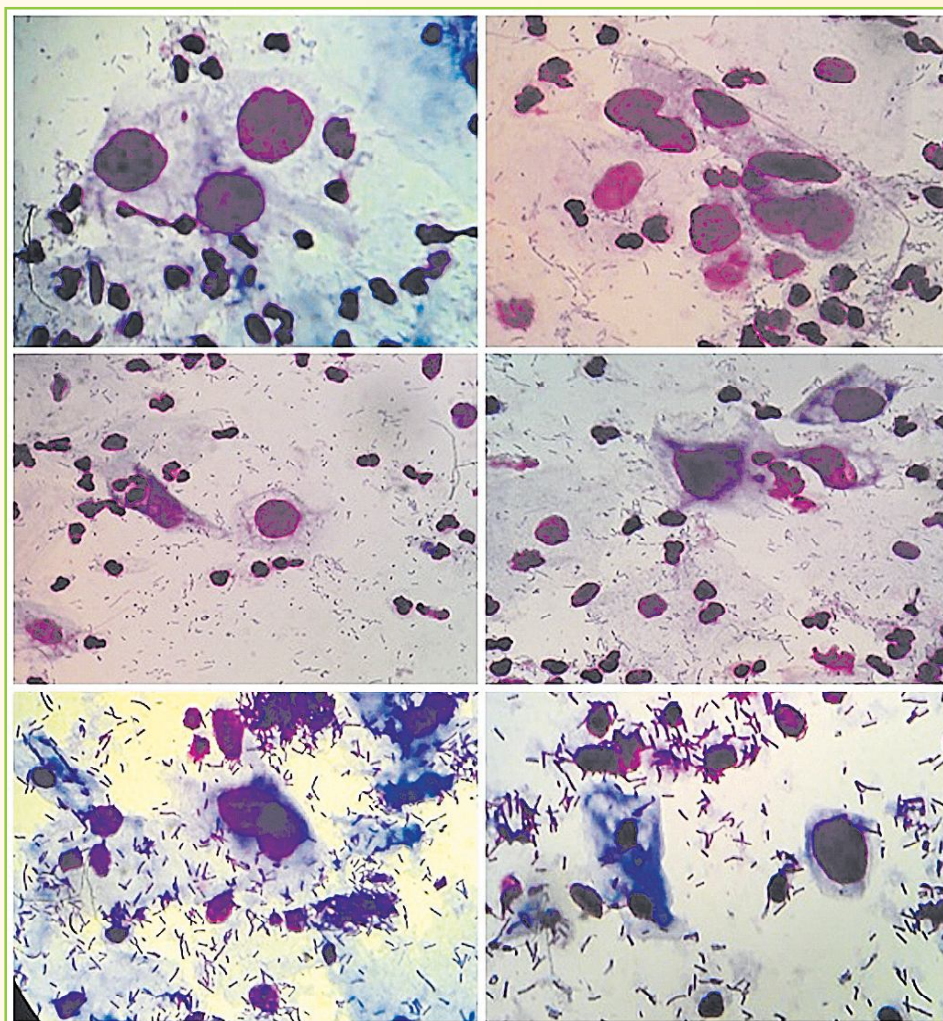


Рисунок 2. Пациентка В., 22 года. Эпителиальная дисплазия шейки матки 2-ст. [Препараты мазка с шейки матки, окрашенные по Романовскому-Гимзе; увеличение $\times 600$].

жен ВПЧ, при этом в 13,3% случаев отмечались характерные морфологические изменения в эпителиальных клетках.

Один из клинических случаев с имеющимися характерными признаками изменения эпителиальных клеток при папилломавирусном поражении, подтвержденном последующей ПЦР-диагностикой, приведен на *Рисунке 2*.

При проведении ПЦР-диагностики обнаружена ДНК ВПЧ 16 типа.

При проведении нами статистической обработки данных, полученных при ПЦР-диагностике, анализ частоты выявления различных генотипов ВПЧ показал, что 16 и 31 типы обнаруживаются чаще других: в 35,3% и 26,5% случаев соответственно (*Диаграмма 2*).

В ходе динамического наблюдения за пациентками данной группы нами было отмечено:

1. У пациентки К. 48 лет, с обнаруженным по данным ПЦР-диагностики ВПЧ 33, вирус через 3,5 месяца самопроизвольно элиминировался;

2. У пациентки Н. 34 лет, через месяц наблюдения отмечалась сероконверсия ВПЧ с 16 на 18 серотип, а ещё через 4,5 месяца при проведении ПЦР-диагностики было выявлено присоединение уреоплазмоза на фоне ВПЧ 18. Одновременно с этим пациентке проводили исследование онкомаркеров РЭА и СА-125, результаты данных тестов оставались в пределах референсного диапазона.

Выводы

Врачам клинических отделений ЛПУ необходимо учитывать, что проведение полного комплексного обследования, включая цитологическое исследование, ПЦР-диагностику, при необходимости кольпоскопическое исследование, позволяет своевременно диагностировать внутриэпителиальные неоплазии и папилломавирусное поражение, что в свою очередь приводит к вовремя начатому лечению, и тем самым существенно повышает качество жизни пациенток.