

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЕ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**АЛГОРИТМЫ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА
ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(инструкция по применению)

Гомель, 2011

УДК 616.988-006.52-074(083.133)

ББК 55.623.1:53.46

А 45

Авторы-разработчики:

Г.И.Вергейчик, Ж.А.Стрибук, В.Ф.Еремин, И.Н.Мезенцева

Рецензенты:

доктор медицинских наук,
заведующий отделом эпидемиологии, иммунопрофилактики
инфекционных заболеваний ГУ «РНПЦ эпидемиологии и
микробиологии», *Н.Н.Полещук*

доктор медицинских наук,
профессор кафедры акушерства и гинекологии УО «ВГМУ»,
Ю.К.Малевич

А 45 Алгоритмы диагностики и мониторинга генитальной папилломавирусной инфекции с применением метода полимеразной цепной реакции/ авт.-разраб. Г.И.Вергейчик, Ж.А.Стрибук, В.Ф.Еремин, И.Н.Мезенцева – Гомель: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2011. — 18 с.

Предложены алгоритмы диагностики и мониторинга результатов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий путем использования метода ПЦР для качественного и количественного определения ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Инструкция рекомендована МЗ РБ к применению в учреждениях практического здравоохранения и медицинских научных учреждениях.



**АЛГОРИТМЫ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА
ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Вергейчик Г.И., Стрибук Ж.А., д.м.н. Ерёмин В.Ф., Мезенцева И.Н.

Гомель, 2010

Проблема рака шейки матки (РШМ) является актуальной для Республики Беларусь, последние 15 лет наблюдается неуклонный рост заболеваемости цервикальным раком и смещение структуры заболеваемости в сторону женщин молодого возраста. Этиологическая роль вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска в развитии рака шейки матки не вызывает сомнений. Эпидемиологические и вирусологические исследования показали, что ВПЧ является причиной РШМ в 100% случаев.

Несмотря на возможности первичной профилактики РШМ – вакцинации, на сегодняшний день наиболее важным методом профилактики РШМ является ранняя диагностика предраковой стадии папилломавирусной инфекции – цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN).

Цитологический метод исследования, используемый на первом этапе профилактических осмотров, имеет низкую чувствительность, варьирующую в пределах 40-70%, составляя в среднем 50%. В связи с этим целесообразно в программах ранней диагностики использовать тесты, позволяющие выявить ДНК ВПЧ.

Цель: повысить эффективность ранней диагностики и мониторинга результатов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий путем использования метода ПЦР для определения ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники:

1. Типовая ПЦР-лаборатория – для проведения полимеразной цепной реакции.

1.1. Реактивы:

- тест-системы для определения и генотипирования (не менее 12 генотипов) ДНК вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска с использованием эндогенного внутреннего контроля (β -актин, β -глобин).

- тест-системы для определения вирусной нагрузки ВПЧ.

2. Латексные перчатки.

3. Гинекологические зеркала.

4. Одноразовые цитощётки или одноразовые ложки Фолькмана.

5. Пробирки типа «эппендорф» с транспортной средой.

6. Анатомический пинцет.

7. Марлевые шарики.

8. Типовая морфологическая (цитологическая и гистологическая) лаборатория.

Показания к применению:

- на первом этапе профилактических осмотров у женщин в дополнение к цитологическому исследованию;

- для разрешения сомнительных результатов цитологического исследования (атипичные плоские клетки неясного генеза - ASCUS);

- для мониторинга терапии цервикальных поражений (CIN 2-3, рак *in situ*, микроинвазивный рак).

Противопоказания к применению:

Противопоказаний к применению нет.

Выбор тест-системы для проведения ПЦР-анализа

Вирусы папилломы человека – широко распространенная и гетерогенная группа вирусов. По степени канцерогенного потенциала среди ВПЧ выделяют генотипы высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и др.).

Использование тест-систем, идентифицирующих не менее 12 генотипов ВПЧ высокого онкогенного риска, позволяет выявить более 90% случаев ВПЧ-инфекции и существенно повысить эффективность диагностики заболеваний, ею обусловленных.

В табл. 1 представлены особенности различных тест-систем для определения ДНК ВПЧ и комментарии, основанные на многолетнем опыте их применения.

Таблица 1 – Преимущества и недостатки различных тест-систем для выявления ДНК ВПЧ

Тест-система	Особенности	Преимущества	Недостатки	Комментарии
ВПЧ-скрин (ВПЧ-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 70)	Выявляет общий участок ДНК для 13 генипов ВПЧ-ВР	1. Простота постановки. 2. Рекомендована для скрининга. 3. Низкая стоимость исследования.	Выявляет наличие или отсутствие ДНК ВПЧ, но не генотипирует.	1. Не подходит для мониторинга результатов лечения заболеваний, обусловленных ВПЧ-инфекцией. 2. Может быть 1-м этапом для отбора инфицированных пациентов, с последующим проведением генотипирования, кольпоскопии, цитологического и гистологического исследований.
ВПЧ-генотип (ВПЧ-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66)	Выявляет ДНК 12 ВПЧ-генотипов с их идентификацией	1. Позволяет за одну постановку выявить ДНК 12 генотипов ВПЧ-ВР. 2. Позволяет	1. Требуется высокая квалификации врача-лаборанта, выполняющего	1. Позволяет проводить эффективный мониторинг лечения заболеваний, обусловленных ВПЧ.

Тест-система	Особенности	Преимущества	Недостатки	Комментарии
		<p>одномоментно не только выявить ДНК ВПЧ, но определить генотипы.</p>	<p>о ПЦР. 2. Стоимость одного исследования в 1,5 раза дороже по сравнению с ВПЧ-скрин.</p>	<p>2. Позволяет дифференцировать персистентную ВПЧ-инфекцию от элиминации одного генотипа и инфицирования другим вследствие смены сексуальных партнеров. 3. Выявление 3 и более генотипов ВПЧ в эпителии шейки матки одновременно является маркером иммунодефицита и показанием для обследования на ВИЧ-инфекцию.</p>
ВПЧ-16, 18	Выявляет только ДНК ВПЧ-16 и 18 типов	<p>1. Позволяет выявить генотипы, ответственные за развитие более 50% случаев рака шейки матки. 2. Низкая стоимость исследования. 3. Простота постановки.</p>	Не позволяет выявлять генотипы ВПЧ отличные от ВПЧ-16 и 18 типов.	Отрицательные результаты по этому тесту ведут к «потере» пациентов, инфицированных другими генотипами ВПЧ.
Количественный ВПЧ-тест	Выявляет точное количество вирусной ДНК в копиях/мл	<p>1. Выявляет только ассоциированные с развитием онкологической патологии генотипы вируса. 2. Выявляет широкий спектр генотипов ВПЧ.</p>	<p>1. Не позволяет идентифицировать генотипы ВПЧ. 2. Выявляет вирусную нагрузку только в филогенетических группах.</p>	<p>1. Позволяет выявить клинически значимое и малозначимое количество вируса, что может иметь значение в мониторинге течения инфекции. 2. В сочетании с генотипированием дает полную картину ВПЧ-инфекции.</p>

Описание технологии использования способа

Широкое использование метода ПЦР для выявления ДНК онкогенных папилломавирусов (ВПЧ-тестов) оправдано с целью ранней диагностики патологии шейки матки, обусловленной онкогенными генотипами ВПЧ, как на первом этапе программ ранней диагностики, так и для прояснения диагноза при получении сомнительных цитологических результатов (атипических плоских клеток неясного значения - ASCUS).

Алгоритмы диагностики с применением ВПЧ-тестов представлены на рис. 1 и 2.

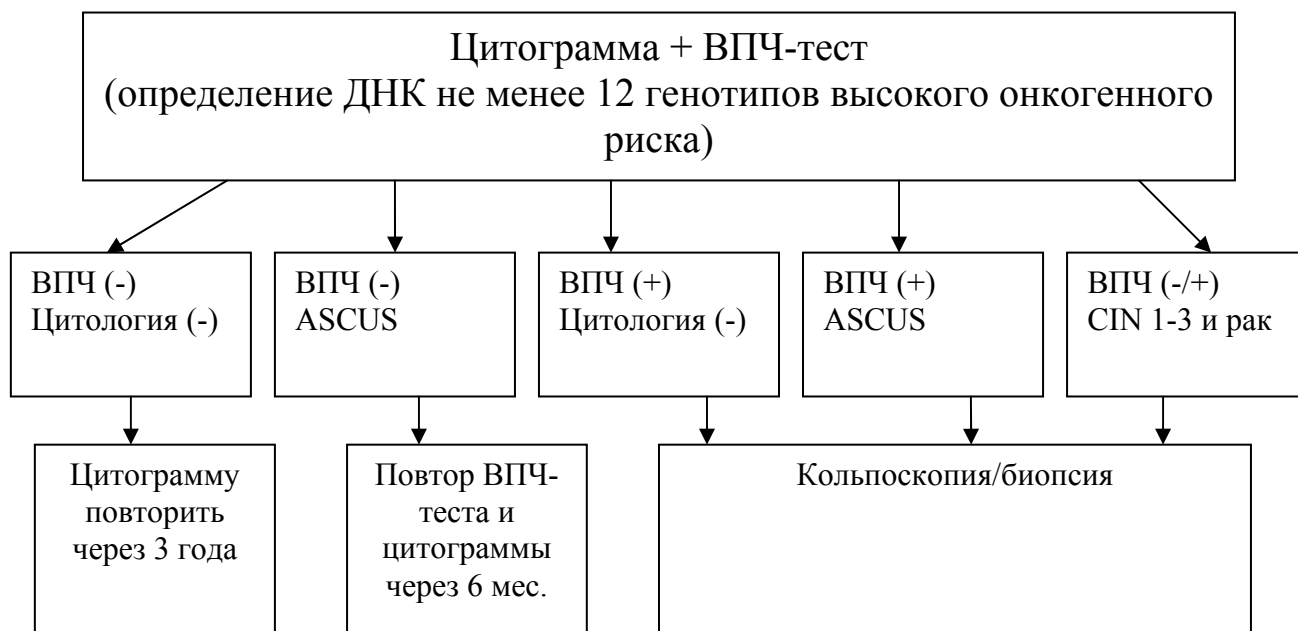


Рис. 1 – Алгоритм использования ВПЧ-теста на первом этапе профилактических осмотров или скрининга рака шейки матки

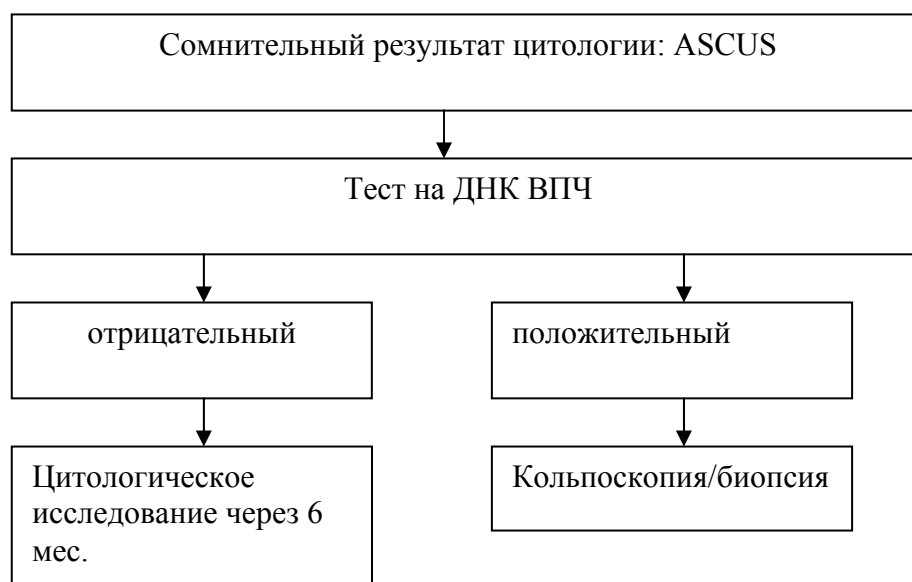


Рис. 2 – Алгоритм использования ВПЧ-теста при сомнительных результатах цитологического исследования

Значение вирусной нагрузки в прогнозировании течения ВПЧ-инфекции

В отсутствие клинической симптоматики переход в состояние дисплазии ассоциирован с вирусной нагрузкой превышающей порог клинической значимости. При наличии диспластических изменений прогрессия более вероятна для случаев вирусной нагрузки превышающей порог прогрессии.

Из инфицированных онкогенными вирусами папилломы человека женщин у 30% развивается рак шейки матки, однако на сегодняшний день не известно, у кого из инфицированных вирус элиминирует самостоятельно, а у кого будет персистировать до клинических проявлений. Поэтому выявление клинически значимого и малозначимого количества вируса может иметь важное значение в мониторинге течения инфекции.

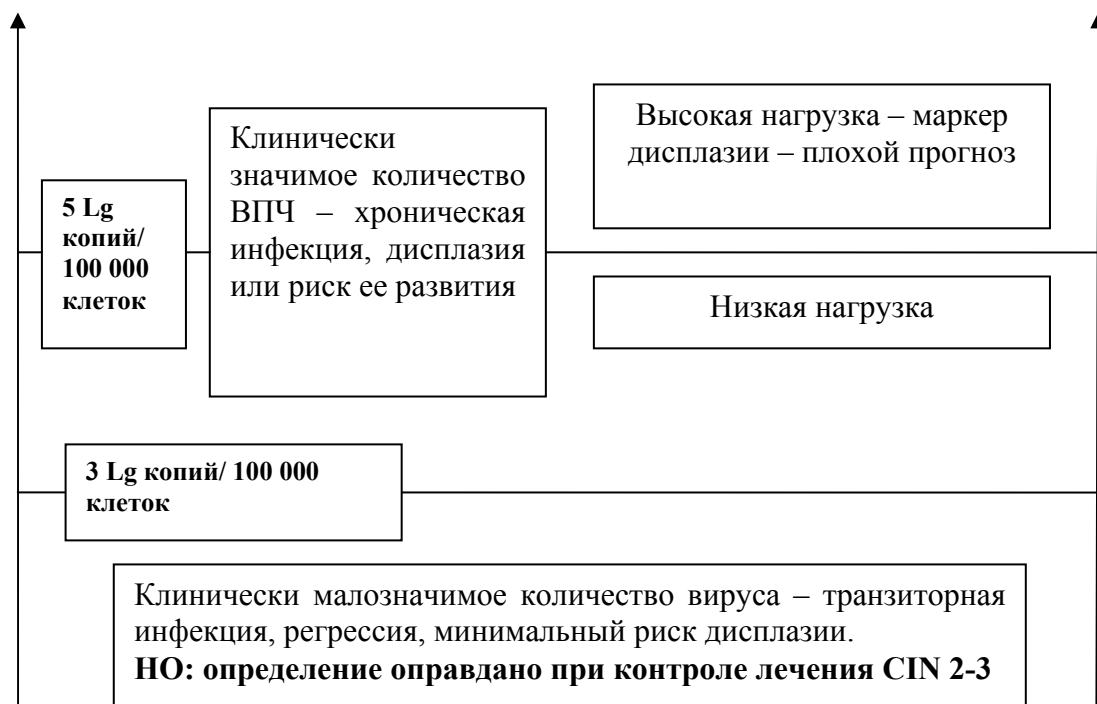


Рис. 3 – Схема интерпретации результата количественного ВПЧ-теста

В приложениях 1, 2 представлены алгоритмы использования качественных и количественных ВПЧ-тестов.

Мониторинг элиминации ВПЧ-инфекции после хирургического лечения цервикальной интраэпителиальной неоплазии 1-3 степени тяжести

Предлагаемый алгоритм мониторинга результатов хирургического лечения пациенток с CIN 1-3 позволит своевременно выявить группу риска по прогрессии заболевания среди пациенток, перенесших радикальное иссечение патологического очага шейки матки, но с персистирующей ВПЧ-инфекцией, назначить им иммунотерапию и предотвратить развитие рецидива заболевания.

Пациенток радикально прооперированных (негативный гистологический край резекции в удалённом конусе шейки матки), у которых произошла полная элиминация ВПЧ после эксцизии шейки матки, при получении двух отрицательных ВПЧ-тестов в течение 6 месяцев после операции можно считать излеченными, снять с диспансерного учета и

наблюдать как здоровых женщин. Выявление ВПЧ-инфекции в эпителии шейки матки после радикального иссечения патологического очага является показанием для иммунотерапии с целью элиминации вируса и устранения риска рецидива заболевания.

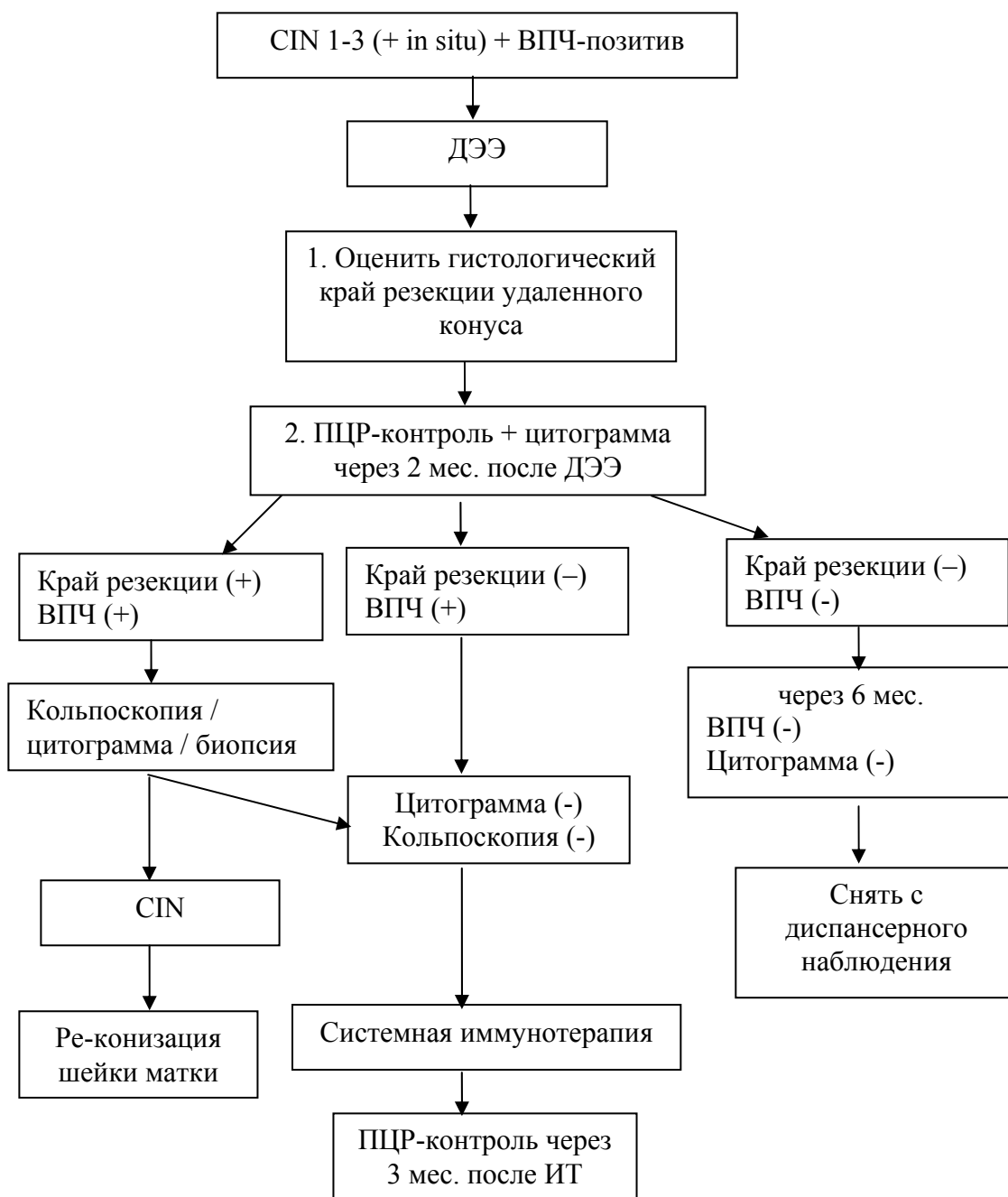
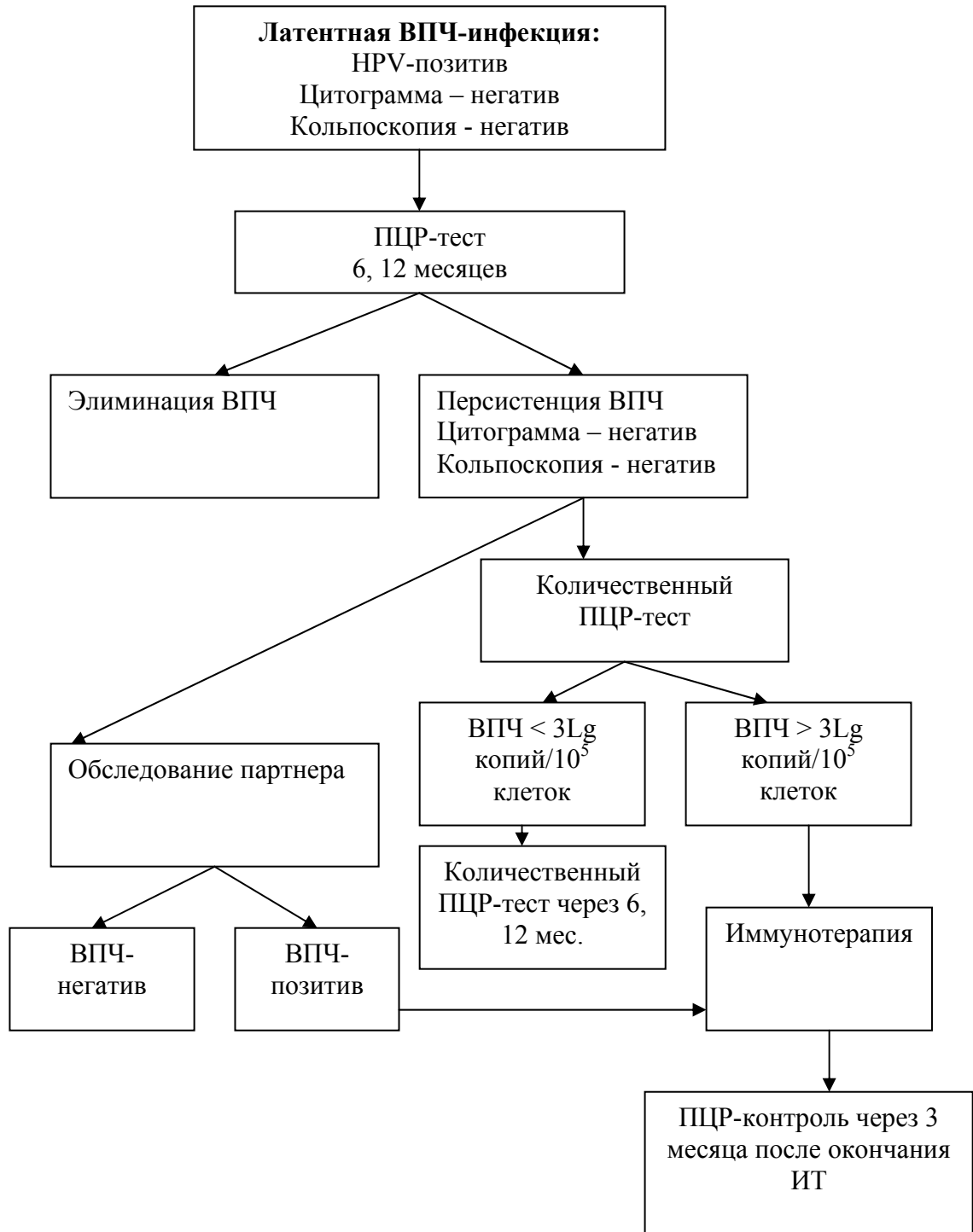
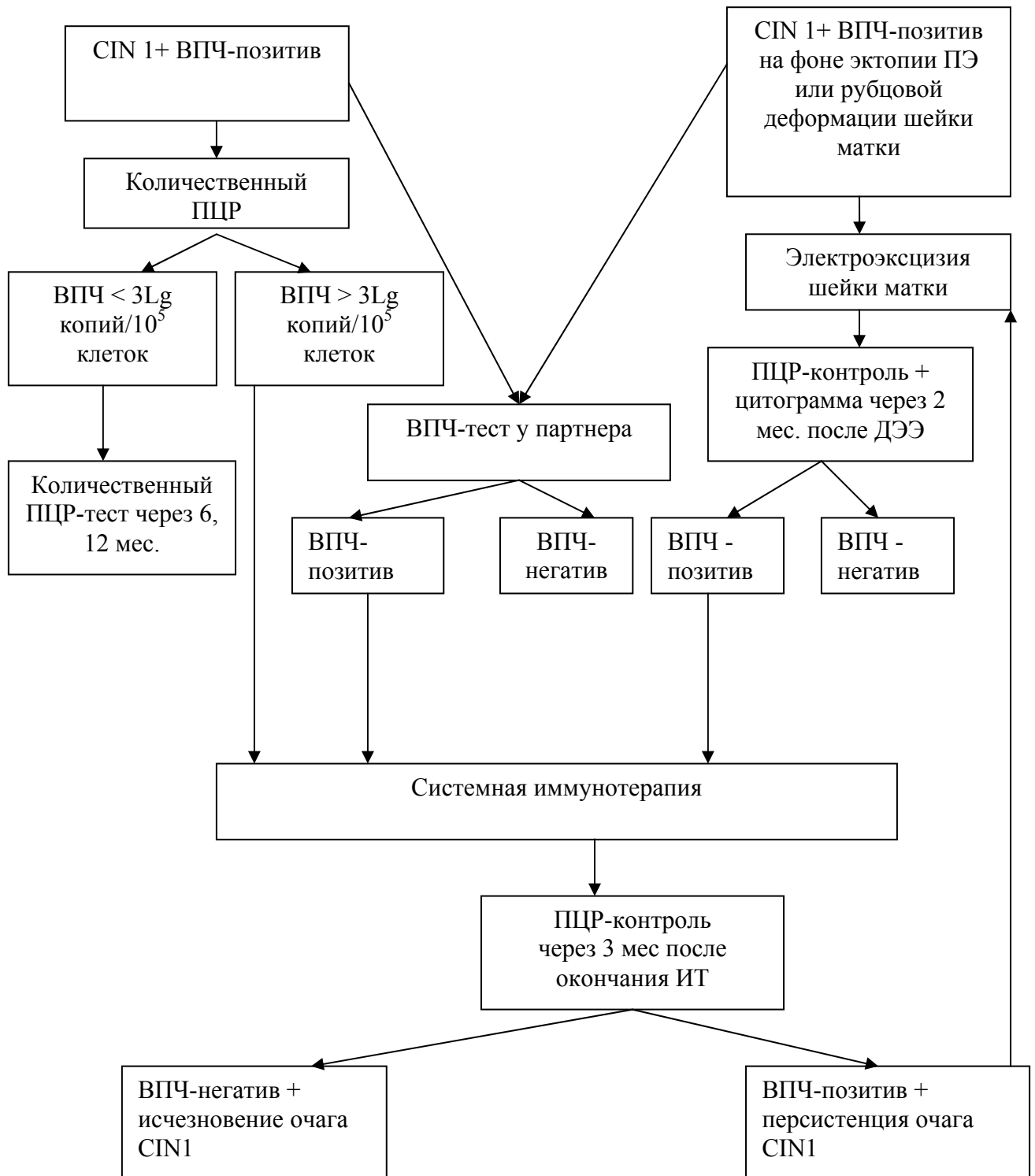


Рис. 4 – Алгоритм мониторинга элиминации ВПЧ после хирургического лечения CIN 1-3 (+in situ)

Алгоритм использования ВПЧ-теста при латентной ВПЧ-инфекции или койлоцитозе многослойного плоского эпителия шейки матки



Алгоритм использования ВПЧ-теста при мониторинге и лечении CIN1



ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АЛГОРИТМОВ ДАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска (HPV-HR) являются этиологическим фактором рака шейки матки, от которого ежегодно в мире умирает 270 000 женщин [1].

Проблема РШМ является актуальной для Республики Беларусь, последние 15 лет наблюдается неуклонный рост заболеваемости цервикальным раком и смещение структуры заболеваемости в сторону женщин молодого возраста. Этиологическая роль ВПЧ высокого канцерогенного риска в развитии рака шейки матки не вызывает сомнений.

Цитологический метод исследования, используемый на первом этапе профилактических осмотров, течение последних 10-15 лет не позволяет снизить заболеваемость инвазивным раком шейки матки. В связи с этим целесообразно дополнить программы ранней диагностики тестами, позволяющими выявить ДНК ВПЧ [2, 3].

Кроме того, метод ПЦР позволяет контролировать элиминацию HPV-инфекции, после неспецифической иммунотерапии или хирургического лечения дисплазии, неинвазивной или микроинвазивной карциномы шейки матки. На сегодняшний день критерием радикальности проведенной эксцизии шейки матки является отрицательный край резекции, то есть по краю иссечения конуса шейки матки гистологическим методом исследования не выявляют очаги CIN или рака. В случае положительного края резекции риск развития рецидива составляет 70%. Диффузное поражение эпителия шейки матки папилломавирусами даже в случае радикального удаления патологического очага приводит к персистенции HPV-инфекции в 48% случаев и развитию рецидива заболевания в период наблюдения от 1 года до

3 лет у 17,7% пациенток [4]. Таким образом, даже радикальное удаление патологического участка шейки матки в случае диффузного поражения эпителия папилломавирусами не позволяет вылечить пациентку, так как персистенция ВПЧ - основного этиологического фактора рака шейки матки - приводит к развитию рецидива. Своевременное выявление персистирующей ВПЧ-инфекции после радикального удаления патологического очага в шейке матки позволяет своевременно назначить иммунотерапию и добиться элиминации ВПЧ из эпителия, тем самым, предупреждая рецидив заболевания. Радикально прооперированных пациенток, у которых произошла полная элиминация ВПЧ после эксцизии шейки матки, можно считать излеченными, снять с диспансерного учёта и наблюдать как здоровых женщин. Это позволит экономить средства, которые затрачиваются на контрольные осмотры и цитологические исследования каждые 3 месяца в течение 1-го года наблюдения и каждые 6 месяцев в течение 2-го года наблюдения, а также на лечение рецидивов, развивающихся при персистирующей ВПЧ-инфекции.

Формирование среди ВПЧ-инфицированных женщин группы риска по развитию рака шейки матки является ещё одной важной задачей. Мы использовали количественный ВПЧ-тест, который позволил определить клинически значимую вирусную нагрузку и предложить эффективные подходы ведения пациенток с высоким риском вирусассоциированного канцерогенеза.

Целью нашей инструкции явилось повышение эффективности ранней диагностики и мониторинга результатов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий путем использования метода ПЦР для качественного и количественного определения ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Список литературы:

1. Bauer H.M., Manos M.M.. PCR detection of genital human papillomavirus // GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0. IARC Press, 2004.
2. Fahey M.T., Irwing L., Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. Am J Epidemiol, 1995; 141:680-689.
3. Meijer C.J., van den Brule A.J., Shijders P.J.F. et al. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implication for cervical cancer screening // IARC Sci. Publ. – 1992. – Vol. 119. - P. 271–281.
4. Viarheichyk H. Role of persisting papillomaviral infection as risk factor of cervical intraepithelial neoplasia I-III and microcarcinoma progress after electric conization of cervix // 15-th International Meeting European Society of Gynaecological Oncology. – Belgrad. – 2009. – CD.

УТВЕРЖДАЮ

_____ (инициалы, фамилия)

«__» _____ 20__ г.

АКТ
о практическом использовании результатов исследования

в практическое здравоохранение
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования)

Комиссия в составе _____

_____ настоящим подтверждает,
что _____
(название структурного подразделения организации)

Осуществлено внедрение в практическое здравоохранение
Инструкции по применению «Алгоритмы диагностики и мониторинга
генитальной папилломавирусной инфекции с применением метода
полимеразной цепной реакции»

(указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)

полученных Вергейчик Г.И., Стрибук Ж.А., Ерёминым В.Ф., Мезенцевой И.Н.
(фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)

при выполнении темы ГНТП «Определить эпидемиологические и молекулярно-
(название программы, проекта, темы НИР)

генетические особенности папилломовирусной инфекции, вызванной
вирусами папилломы человека высокого онкогенного риска, на основании
полученных данных разработать и внедрить в клиническую практику методику
ранней диагностики пациентов с высоким риском вирусассоциированного
канцерогенеза (№ГР 20091053 от 08.06.2009).

для _____
(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего материалы инструкции «Алгоритмы диагностики и
(приводятся конкретные результаты практического использования)

мониторинга генитальной папилломавирусной инфекции с применением
метода полимеразной цепной реакции»» используются для

Члены комиссии:

_____ (подпись)

_____ (инициалы, фамилия)

_____ (дата)

Научное издание

Вергейчик Галина Ивановна

Стрибук Жанна Анатольевна

Еремин Владимир Федорович

Мезенцева Ирина Николаевна

**АЛГОРИТМЫ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ГЕНИТАЛЬНОЙ
ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Инструкция по применению