

12-13. Тема занятия: Лабораторная диагностика папилломавирусных инфекций.

Цель занятия: Знакомство с лабораторной диагностикой папилломовирусных инфекций.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать этиологию, патогенез и принципы лабораторной диагностики папилломовирусных инфекций
- Уметь интерпретировать результаты лабораторных исследований при ВПЧ.

Генитальная папилломавирусная инфекция является распространенным заболеванием, передающимся половым путем. Вирус папилломы человека (ВПЧ) – высокоспецифичная в отношении человека инфекция, обладающая способностью инфицировать эпителиальные клетки, вызываемая вирусом из семейства Papovaviridae. Инфицирование ВПЧ половых органов, так же, как и кожных покровов, происходит при наличии микротравм, при этом резервуаром ВПЧ-инфекции служат уретра, бартолиниевы железы, семенная жидкость. Идентифицировано более ста видов ВПЧ, из которых 35 инфицируют урогенитальный тракт человека, вызывая поражение покровного эпителия кожи и слизистых оболочек половых органов. ВПЧ-инфекция является наиболее распространенной инфекцией, передаваемой половым путем (ИППП), которой инфицирована большая часть сексуально активного населения. Кроме этого, папилломавирусы – единственная группа вирусов, для которых доказана индукция опухолей у человека.

Этиология

Вирус, относящийся к роду А семейства Papovaviridae, сохраняется при температуре 50°С в течение 30 минут. В процессе репликационного цикла геном вируса экспрессирует от 8 до 10 белковых продуктов; за онкогенные свойства вируса ответственны онкопротеины Е6 и Е7. По онкогенной активности различают ВПЧ низкой степени риска – HPV 6, 11, 42, 43, 44; средней – HPV 31, 33, 35, 51, 52, 58 и высокой – HPV 16, 18, 45, 56 степени риска. Одним или более типами ВПЧ инфицировано не менее 50% взрослого населения, живущего активной половой жизнью, в большинстве случаев генитальная ВПЧ-инфекция у них является нераспознанной, протекающей субклинически или асимптомно. Генитальная ВПЧ-инфекция имеет высокую контагиозность; заражение при однократном половом контакте происходит примерно в 60% случаев.

Патогенез

Инвазия вируса происходит через микроповреждения тканей. ВПЧ инфицирует стволовые клетки базального слоя, которые затем являются постоянным источником инфицирования эпителиальных клеток. Вирусы инфицируют делящиеся незрелые клетки базально-клеточного слоя, находящиеся близко к поверхности, что во многом объясняет частоту инфицирования шейки матки и нижней трети влагалища и вульвы.

Вирусная ДНК включается в ядерный материал клетки хозяина. Интегрированная форма ВПЧ способна к злокачественной трансформации, поскольку вирусная ДНК начинает контролировать клеточный генетический материал для воспроизводства ВПЧ-кодированных белков. Интеграция ВПЧ высокого риска в клеточный геном хозяина усиливает продукцию двух онкопротеинов – Е6 и Е7, взаимодействующих с эндогенными клеточными регуляторными белками, ведущими к дерегуляции цикла клеточной прогрессии, что является разрешающим моментом в формировании цервикальной неоплазии, образованию плоских кондилом, невидимых вооруженным глазом.

Однако инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ является необходимым, но не достаточным событием для развития рака. Для формирования необратимой неоплазии необходимы следующие факторы: во-первых, активная экспрессия генов Е6 и Е7, причем высокоонкогенных типов ВПЧ-16 и 18; во-вторых, индукция метаболических механизмов конверсии эстрадиола в 16-ОН; в-третьих, индукция множественных повреждений хромосомной ДНК в инфицированной клетке, которая завершает процесс перерождения.

Первая стадия неоплазии CIN I характеризуется активной репликацией вируса и его бессимптомным выделением. Опухолевая трансформация возникает с большей вероятностью при взаимодействии ВПЧ с другими инфекционными агентами (цитомегаловирусы, вирус простого герпеса 2 типа, *S. trachomatis*, микоплазма и уреоплазма).

Факторы риска

ВПЧ является необходимым, но не достаточным фактором цервикальной неоплазии. Предрасполагающими факторами риска для развития заболевания могут быть: неблагоприятный социально-экономический статус и сексуальное поведение, нарушения клеточного и гуморального иммунитета, сопутствующие сексуально-трансмиссивные заболевания (гонорея, сифилис герпес, трихомониаз хламидиоз и т.д.), молодой возраст, курение, беременность, дисбиоз вагинального биотопа, гипо- и авитаминозы.

Риск ВПЧ-инфекции наиболее высок у гомосексуалистов. Не исключены случаи перинатальной передачи инфекции младенцам, рожденным от инфицированных матерей во время родоразрешения через естественные родовые пути, за счет аспирации околоплодных вод, цервикального или вагинального секрета; случаи папилломатоза гортани, трахеи, бронхов у детей, рожденных с применением операции кесарева сечения, что, по мнению ряда авторов, свидетельствует о возможности трансплацентарной передачи инфекции и нецелесообразности применения кесарева сечения с единственной целью – предупреждения заражения новорожденного ВПЧ.

Течение заболевания и клинические разновидности

Инкубационный период при аногенитальных бородавках составляет от 1 до 3 месяцев. В большинстве случаев ВПЧ-инфекция не манифестирует сразу, оставаясь некоторое время асимптомной. Прогрессия ВПЧ-инфекции высокого онкогенного риска в цервикальную интраэпителиальную неоплазию и рак *in situ* обычно происходит в сроки от 5 до 30 лет.

1. Клинические формы (видимые невооруженным взглядом):
 - 1.1. Экзофитные кондиломы (остроконечные типичные, папиллярные, папуловидные);
 - 1.2. Вестибулярный папилломатоз (мелкие папилломовидные образования преддверья влагалища).
2. Субклинические формы (не видимые невооруженным глазом и бессимптомные, выявляемые только при кольпоскопии и/или цитологическом или гистологическом исследовании):
 - Плоские кондиломы (типичная структура с множеством койлоцитов);
 - Малые формы (различные поражения метапластического эпителия с единичными койлоцитами);
 - Кондиломатозный цервицит/вагинит.
3. Латентные формы (отсутствие клинических, морфологических или гистологических изменений при обнаружении ДНК ВПЧ);
4. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия (плоскоклеточные интраэпителиальные поражения):
 - СIN - CIN I – слабо выраженная дисплазия +/- койлоцитоз, дискератоз;
 - 4.2 CIN II – выраженная дисплазия +/- койлоцитоз, дискератоз;
 - 4.3 CIN III или CIS - тяжелая дисплазия или карцинома *in situ* +/- койлоцитоз, дискератоз;
 - 4.4 Микроинвазивная плоскоклеточная карцинома.

Клинические проявления ВПЧ-инфекции могут быть следующими: остроконечные кондиломы, фиброэпителиальные образования на поверхности кожи и слизистых на тонкой ножке, на широком основании в виде одиночных узелков, либо в форме множественных выростов по типу «цветной капусты».

Поверхность покрыта многослойным плоским эпителием по типу дискератоза. В подлежащей строме имеются атипичные сосуды, явления воспаления. Локализация ОК различна, в основном, в местах возможной мацерации: клитор, малые половые губы, устье уретры, влагалище, шейка матки, анус.

Манифестация генитальной ВПЧ-инфекции сопровождается появлением генитальных бородавок. Экзофитные формы остроконечных кондилом представляют из себя типичное проявление инфекции, обусловленной доброкачественными типами вируса ВПЧ6 и ВПЧ11. Эндофитные кондиломы могут быть плоскими и инвертированными, располагаются на шейке матки и имеют вид плоских или слегка возвышающихся бляшек, определяются при расширенной кольпоскопии.

Субклиническая форма болезни обнаруживается только при кольпоскопии в виде мелких плоских бородавок или устанавливается на основании характерной гистологической картины в виде койлоцитоза. Отсутствие клинических и гистологических признаков инфекции при выявлении ДНК ВПЧ свидетельствует о латентной или асимптомной инфекции.

Наружное отверстие уретры у женщин поражается в 4-8% случаев, более глубокое поражение мочеиспускательного канала вызывает явления вялотекущего уретрита.

Анальные бородавки чаще встречаются у лиц, практикующих анальный секс, и редко располагаются выше зубчатой линии прямой кишки. У лиц, практикующих орально-генитальные контакты, генитальные бородавки могут поражать губы, язык, небо.

Генитальные бородавки, как правило, бессимптомны, и часто случайно выявляются при осмотре или на основании Pap-мазка. В связи с этим вначале больные не предъявляют жалоб на связанный с ними дискомфорт. Однако, крупные, травмированные, изъязвленные или подвергшиеся вторичной инфекции бородавки сопровождаются зудом, болью, неприятным запахом. Уретральные бородавки у мужчин могут вызывать раздвоение струи мочи, обструкцию уретрального отверстия.

У больных с нарушением клеточного иммунитета (ВИЧ-инфекция, иммуносупрессивная терапия, беременность), – развиваются очень крупные генитальные бородавки – гигантская кондилома Бушке-Левенштейна, инвазивная и деструктурирующая опухоль, ассоциирующаяся с ВПЧ 6 и 11 типа.

ВПЧ-инфекция, обусловленная типами вируса высокого онкогенного риска (ВПЧ-16 и 18), является этиологическими агентами довольно гетерогенной группы заболеваний: бовеноидный папулез, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки, реже – рак влагалища, вульвы, ануса.

Бовеноидный папулез ассоциируется с ВПЧ-16, а также с другими типами ВПЧ – 1, 6, 11, 18, 31-35, 39, 42, 48, 51-54 и проявляется плоскими папулами и пятнами с гладкой, бархатистой поверхностью. Заболевание обычно развивается у мужчин, имеющих много половых партнеров. У партнерш таких пациентов выявляется инфекция ВПЧ шейки матки и цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Течение бовеноидного папулеза обычно доброкачественное. У некоторых больных бовеноидный папулез может персистировать годами, трансформируясь (особенно у лиц пожилого возраста) в плоскоклеточный рак.

Лабораторная диагностика папилломавирусной инфекции

Лабораторная диагностика ВПЧ-инфекции проводится на основании цитологического, гистологического исследования биоптатов, определения антител к ВПЧ, обнаружения ДНК ВПЧ и онкобелка E7.

Диагностика ВПЧ-инфекции шейки матки включает тестирование по Папониолау (РАР-тест). Молекулярно-биологические методы реакция гибридизации *in situ*, ПЦР, ДНК-зонд. Гистологическое исследование биоптатов тканей эпителия и эпидермиса используются и при малосимптомных или асимптомных формах вирусных заболеваний гениталий. Использование молекулярно-биологических методов исследования целесообразно для доказательства наличия ВПЧ с его типированием, так как и ДНК-гибридизация, и полимеразная цепная реакция позволяют выявить онкогенные типы вируса 16 и 18.

Основным методом диагностики ВПЧ является цитологический – обнаружение койлоцитарных клеток в биоптате эпителия шейки матки (клетки МПЭ промежуточного и поверхностного типа с многоядерным строением), патогномоничные для ВПЧ.

При гистологическом исследовании генитальных бородавок обнаруживается умеренное утолщение рогового слоя с папилломатозом, паракератозом и акантозом; могут присутствовать фигуры митоза. Диагностически важным считается наличие в глубоких участках мальпигиева слоя койлоцитов – больших эпителиальных клеток с круглыми гиперхромными ядрами и выраженной перинуклеарной вакуолизацией.

Существуют три основных категории лабораторных методов определения ДНК ВПЧ: неамплификационные, амплификационные и сигнальные амплификационные (табл. 1).

Таблица 1

Методы обнаружения днк вирусов папилломы человека

Категории методов	Названия методов
Неамплификационные	Дот-блот, саузерн-блот гибридизация, гибридизация in situ на фильтре и в ткани
Амплификационные	Полимеразная цепная реакция - ПЦР, лигазная цепная реакция - ЛЦР
Сигнальные амплификационные	Система гибридной ловушки — Digene Hybrid Capture System II

Неамплификационные методы определения ДНК ВПЧ в настоящее время с диагностической целью не используются. Они в ходу в научно-исследовательских лабораториях.

Среди амплификационных методов наибольшее распространение получила ПЦР, благодаря которой были получены ценные сведения о типах ДНК. Однако постановка ПЦР имеет большое количество ограничений, чтобы не получить ложноположительных результатов. Ограничения в первую очередь касаются строгого разграничения и разобщения по отдельным помещениям разных этапов работы, строгого соблюдения правил пользования перчатками, халатами, лабораторным оборудованием в пределах помещения, предназначенного для определенного этапа исследования, иначе может случиться перенос какого-либо количества ДНК с последующим его размножением в ПЦР. Кроме того, в мире еще нет стандартных реактивов для всех типов ВПЧ, практически используются праймеры и другие реактивы собственного лабораторного изготовления.

Не останавливаясь подробно на мишень-амплификационных методах, обратимся к сигнальным амплификационным методам, которые не требуют тех ограничений в деятельности, которые характерны для ПЦР-лабораторий. Среди них привлекает внимание система двойной генной ловушки - Digene Hybrid Capture System II фирмы Abbott, которая обеспечивает:

- количественный анализ;
- компьютерную интерпретацию результатов, что исключает субъективизм в оценке;

- воспроизводимость и достоверность результатов;
- полный цикл исследования в течение одного рабочего дня;
- абсолютную специфичность.

Система двойной геномной ловушки – Digene Hybrid Capture System II использует РНК-ДНК гибридизацию в растворе с последующей "хвостовой" иммунологической реакцией между гибридом РНК пробы - ДНК мишени и специфическими антителами к этому гибриду. Тест обязан своей высокой специфичностью нескольким независимым источникам.

Во-первых, весь геном вируса является мишенью. Длинная одноцепочечная РНК эффективно гибридизуется со всеми 8000 нуклеотидов ДНК ВПЧ. Гибрид ДНК-РНК более стабилен, что позволяет избежать нежелательных побочных реакций.

Во-вторых, источником дополнительной чувствительности в реакции является использование антител к гибриду РНК-ДНК, конъюгированных с множеством молекул щелочной фосфатазы. Эти меченные антитела распознают короткие цепочки РНК-ДНК гибрида способом, который не имеет отношения к последовательностям нуклеотидов ДНК и РНК. Тысячи молекул антител могут покрыть единичный геномный гибрид ДНК ВПЧ.

В-третьих, каждый иммобилизированный энзим щелочной фосфатазы реагирует с множеством молекул хемилюминесцента диоксетана за 1 минуту и вызывает постоянный поток фотонов, которые подсчитываются фотомультиплексирующей трубкой люминометра.

В-четвертых, система геномной ловушки имеет преимущества перед естественной амплификацией, т.к. вовлекает большой объем (10-20%) клинического материала в реакцию. Интенсивность испускаемого света пропорциональна количеству ДНК мишени и выражается как отношение сигнала к положительному контролю. На рис. 1 приводим схему опыта по выявлению ДНК ВПЧ по Lorincz A. и Davies P.

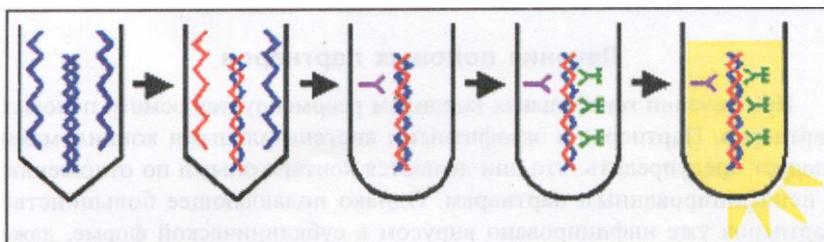


Рис. 1. Детекция ВПЧ с помощью HCS II (по Lorincz A. и Davies P.O)

В "гибридной системе ловушки" – HCS II используются РНК-пробы, комплементарные к полной геномной последовательности 13 канцерогенных типов ВПЧ и 5 типов ВПЧ низкого риска. Составляются смеси - "коктейли" высокого и низкого риска соответственно. Каждый "коктейль" отдельно

инкубируется с денатурированной (одноцепочечной) ДНК из клинического образца. Образующийся РНК-ДНК гибрид переносится в лунки микропанели, на которых иммобилизованы моноклональные антитела к РНК-ДНК гибриду. Антитела специфически распознают гибрид, который прикрепляется к лунке панели. Уловленные таким образом РНК-ДНК гибриды затем вступают в реакцию с моноклональными антителами к гибриду, мечеными щелочной фосфатазой. Избыток антител и негибридизированных молекул удаляют промыванием. В лунки добавляют люминесцирующий субстрат диоксетан. Если субстрат присоединяется к меченному щелочной фосфатазой конъюгату, то происходит испускание света. Эмиссию света можно измерить с помощью люминометра. Количество света генерируется в пропорции к числу мишеней ДНК в образце. HCS II может определить и различить канцерогенные типы ВПЧ (16,18,31,33,39,45,51,52,56,58,59 и 68) и типы низкого риска (6,11,42,43 и 44). Аналитическая чувствительность системы – 0,2 пикаграмма/мл (1000 копий генома ВПЧ). Учитывая клиническую необходимость обследования женщин с низкой степенью клеточной атипии, прибор установлен на определение 5000 копий ДНК/мл, т.е. на определение 1.0 пикаграмма/мл.

В комплексе с цитологическим исследованием, определение ВПЧ с использованием HCS II достигает 95% обнаружения ЦИН-1 и ЦИН-2, т.е. может служить эффективным дополнением к цервикальной цитологии и может помочь снизить заболеваемость и смертность от цервикального рака.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Этиология ВПЧ.
2. Патогенез ВПЧ.
3. Течение заболеваний и клинические разновидности.
4. Лабораторная диагностика нозологических форм ВПЧ.
5. Генотипирование папилломовирусов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, характеристики ВПЧ.
2. Записать этиологию, патогенез, течение и клинические разновидности ВПЧ-инфекции.
3. Записать лабораторную диагностику нозологических форм ВПЧ-инфекции, а также генотипирование папилломовирусов.
4. Ответить на тестовые задания и ситуационные задачи по теме «Папилломавирусная инфекция», изложенные в конце темы занятия.

Перечень рекомендуемой литературы

Основная литература:

1. Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. Т. 1 [Электронный ресурс] / [В. В. Алексеев и др.] ; под ред. А. И. Карпищенко. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970422748.html>
2. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] / А.А. Кишкун - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. - <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970431023.html>

Дополнительная литература:

1. Статистические модели в теории надежности [Электронный ресурс] : Учеб. пособие / А.В. Антонов, М.С. Никулин. - М. : Абрис, 2012. - <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785437200278.html>
2. Карманов Ф. И. Статистические методы обработки экспериментальных данных [Электронный ресурс] : лабораторный практикум с использованием пакета MathCad : учебное пособие / Карманов Ф. И., Острейковский В. А. - М. : Абрис, 2012. – 208 с. : ил. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Кишкун А. А. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015 . – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
3. Клиническая лабораторная диагностика : в 2 т. Т. 1. [Электронный ресурс] : национальное руководство / под ред. В.В. Долгова. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - (Национальные руководства). – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970421291.html>
4. Клиническая лабораторная диагностика : в 2 т. Т. 2 [Электронный ресурс] : национальное руководство / под ред. В.В. Долгова. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - (Национальные руководства). – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970421314.html>
5. Хайтов Р. М. Иммунология: структура и функции иммунной системы [Электронный ресурс] : учебное пособие / Хайтов Р.М. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 280 с., 12 табл., 68 рис. (цв.). - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
6. Хайтов Р. М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы [Электронный ресурс] : руководство / Хайтов Р. М., Пинегин Б. В., Ярилин А. А. - М., 2009. - 352 с. : ил. - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
7. Методы клинических лабораторных исследований [Текст] : [учебник] / Камышников В. С., Волотовская О. А., Ходюкова А. Б. и др. ; под ред. В. С. Камышникова. - 7-е изд. - М. : МЕДпресс-информ, 2015. - 735, [1] с. : ил., цв. ил.
8. Уоллах Ж. Лабораторная диагностика: все лабораторные исследования для диагностики и лечения [Текст] : [пер. с англ.] / Уоллах Ж. ; отв. ред. О. Шестова. – 8-е изд. - М. : Эксмо, 2013. – 1358, [1] с. : ил.

Тестовые задания для самоконтроля
Выберите один правильный ответ

1. Вирус папилломы человека высокого онкогенного риска ассоциируют с...
 - а) раком кожи
 - б) раком шейки матки
 - в) раком молочной железы
 - г) раком гортани

2. Источником папилломавирусной инфекции является...
 - а) больной человек
 - б) домашние животные
 - в) крупный рогатый скот

3. Пути передачи папилломавирусной инфекции: 1) фекально-оральный; 2) контактный; 3) трансмиссивный; 4) парентеральный:
 - а) 1, 2
 - б) 1, 2, 3
 - в) 2, 3, 4
 - г) 3, 4

4. Клиническим проявлением папилломавирусной инфекции является...
 - а) твердый шанкр;
 - б) остроконечные кондиломы
 - в) папулы
 - г) пенистые выделения

5. В диагностике вируса папилломы человека используется: 1) полимеразная цепная реакция; 2) иммуноферментный анализ; 3) бактериологический метод; 4) проточная цитометрия:
 - а) 1,2
 - б) 2,3
 - в) 3,4
 - г) 1,3
 - д) 1,4

7. Вирус папилломы человека относится к семейству:
 - а) Вирусам простого герпеса
 - б) Паповавириде
 - в) Коронавирусов
 - г) Ретровирусов
 - д) Поксвирусам

8. Вирус папилломы человека локализуется:
 - а) в эпидермисе

- б) в сосочковом слое дермы
- в) в сетчатом слое дермы
- г) в подкожном слое
- д) в крови

9. Укажите орган, ткани которого наиболее подвержены малигнизации, вызванной вирусом папилломы человека:

- а) печень
- б) селезенка
- в) шейка матки
- г) прямая кишка
- д) головной мозг

19. Наиболее часто связывают возникновение рака шейки матки с вирусом группы:

- а) герпес
- б) вирус папилломы
- в) аденовирус
- г) вирус гепатита
- д) правильные ответы а) и б)

20. Необходимым элементом вирусного канцерогенеза является:

- а) размножение вируса в клетке
- б) гибель клетки
- в) внедрение генома вируса в геном клетки
- г) изменение иммунологического статуса

Ситуационные задачи для самоконтроля

Задача № 1

Пациентка П, 16 лет. Обратилась для профилактического обследования на ИППП. Со слов пациентки, половые контакты с 15 лет.

При гинекологическом осмотре выявлена следующая клиническая картина (Рис 1.) – папилломы в области половых органов и лейкоплакия шейки матки:



Рис 1. Объективные клинические симптомы заболевания у пациентки П.

При проведении цитологического исследования слизистой оболочки шейки матки выявлена следующая картина (Рис 2.):

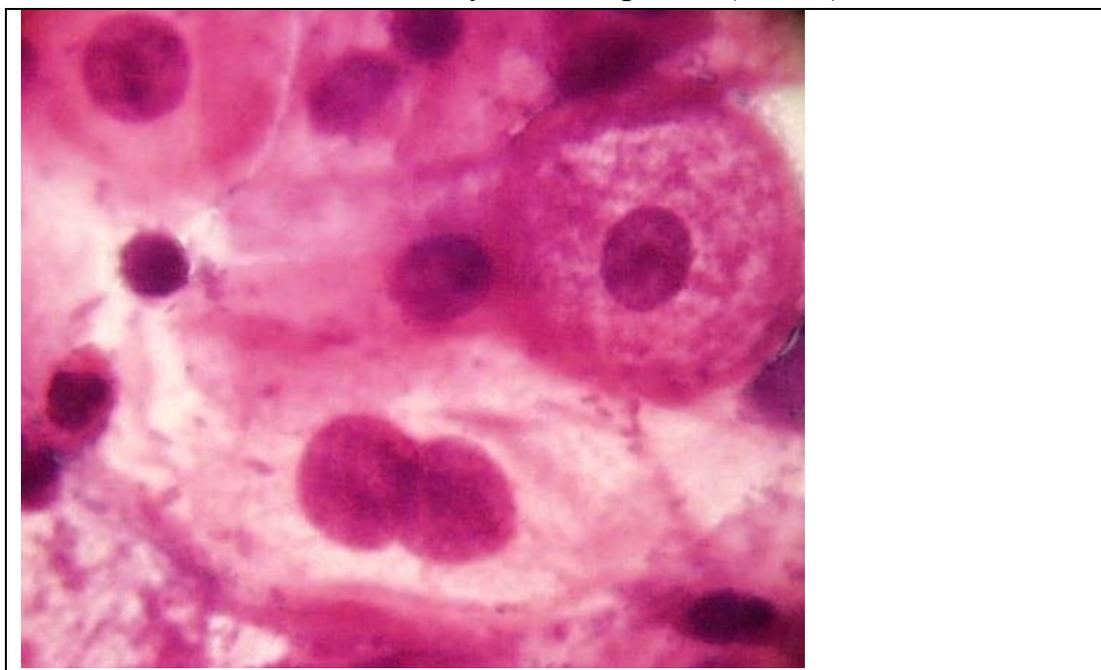


Рис. 2 Результаты цитологического исследования слизистой оболочки шейки

Контрольные вопросы:

1. Установите диагноз и определите клиническую форму заболевания.
2. Проведите дифференциальную диагностику.

3. Какие лабораторные тесты можно провести для верификации диагноза?
4. Какой цитологический критерий подтверждает данный диагноз?