

Возможности лабораторной диагностики патологии шейки матки, ассоциированной с вирусами папилломы человека

Ворошилина Екатерина Сергеевна

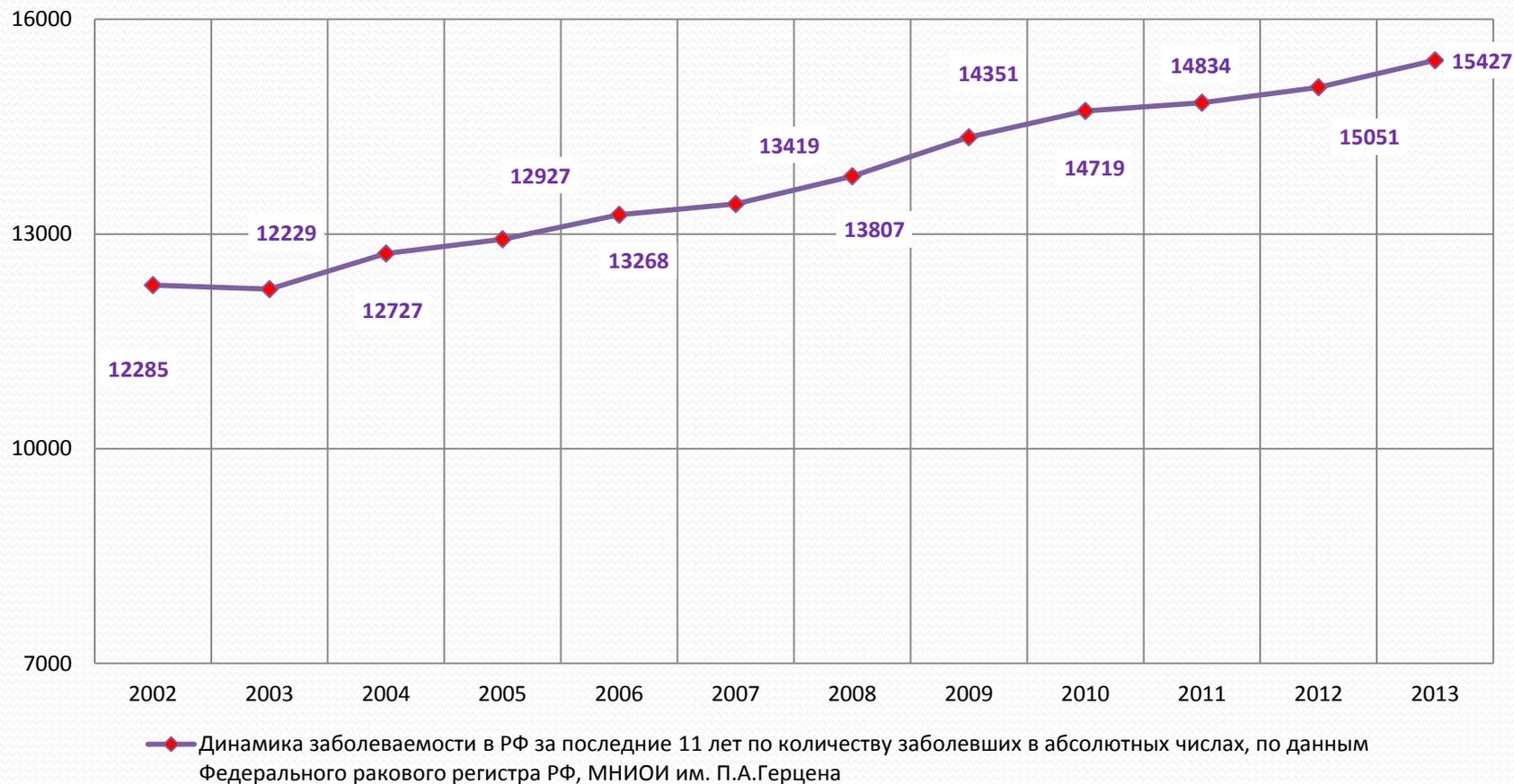
Доктор медицинских наук,
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Уральского государственного медицинского университета
Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург

Рак шейки матки (РШМ) - второе место среди поражений органов репродуктивной системы*

- **Злокачественные опухоли шейки матки составляют почти 15% среди поражений органов репродуктивной системы;**
- **На ранних стадиях инвазивный рак шейки матки диагностируется лишь у 20 % женщин;**
- **Большая часть женщин обращается уже на 3-4 стадии рака;**
- **Каждая пятая женщина умирает от рака шейки матки в течение года только потому, что диагноз был поставлен слишком поздно;**
- **РШМ является основной причиной смертности женщин в возрастной группе 30-39 лет.**

***здесь и далее по данным Федерального ракового регистра РФ, МНИОИ им. П.А.Герцена**

РШМ – прирост заболеваемости 26% за последние 10 лет



РШМ – заболевание с доказанной вирусной этиологией

- Вирус папилломы человека (ВПЧ) - это ДНК-содержащий вирус из семейства Papovaviridae.
- ВПЧ делят на две крупные группы:
 - Вирусы низкого онкогенного риска – 6, 11, 44;
 - Вирусы высокого онкогенного риска - 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82.
- Самопроизвольная элиминация ВПЧ при первичном инфицировании может произойти в течение 3–24 месяцев от момента заражения;
- Инфицирование ВПЧ и заболевание — НЕ СИНОНИМЫ!
- На каждый 1 000 000 инфицированных женщин - 100000 - предраковые изменения шейки матки, и лишь у 1600 - рак шейки матки.

Вирус папилломы человека

Попав в организм вирусы папиллом инфицируют **базальный слой эпителия**, причем наиболее пораженным участком является зона перехода многослойного плоского эпителия в цилиндрический эпителий.

В зараженной клетке **вирус** существует в двух формах:

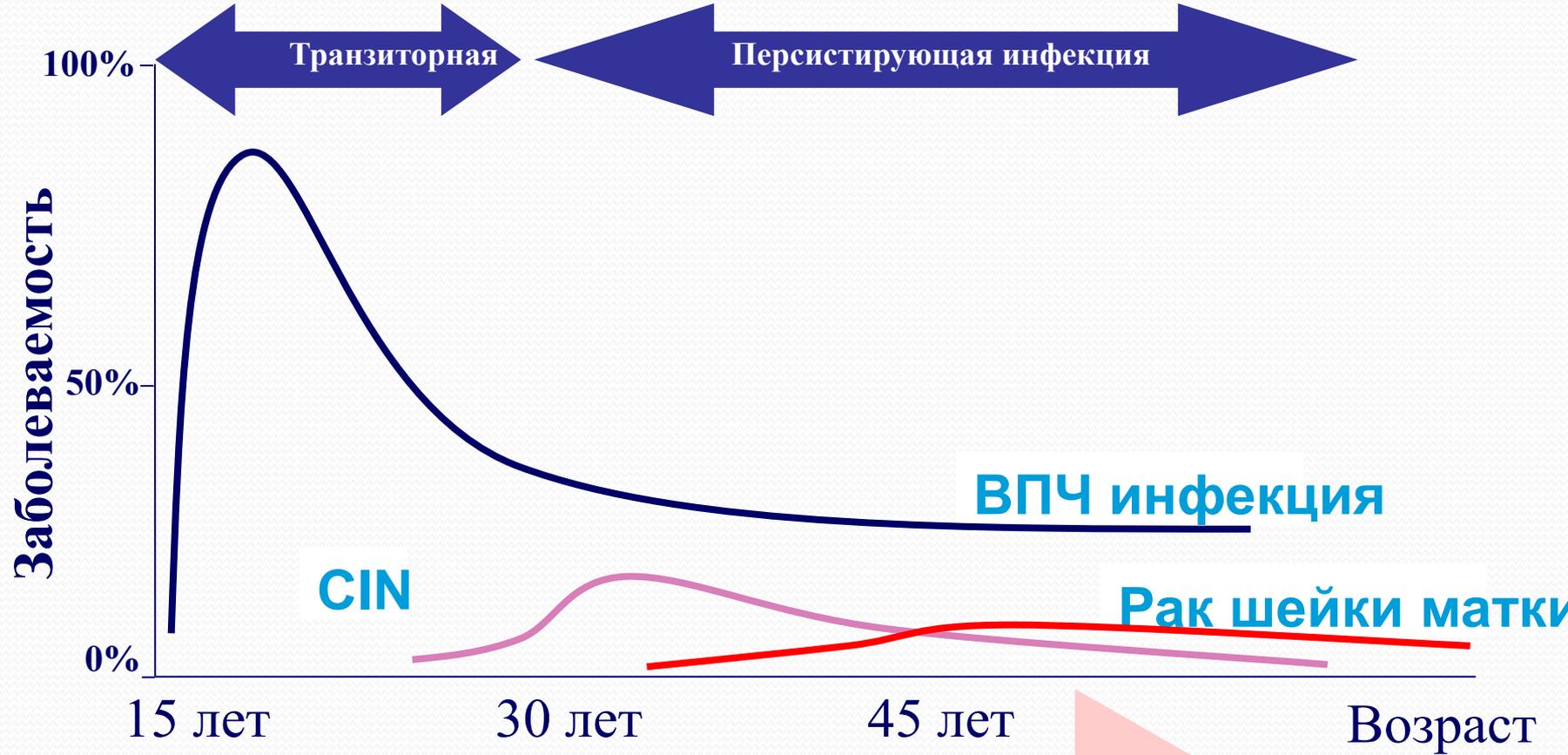
1. эписомальной (вне хромосом клетки)

доброкачественная форма

2. Интросомальной или интегрированной (встраивается в **геном** клетки)

злокачественная форма паразитирования вируса.

ВПЧ инфекция и эпидемиология заболевания



**10-20 лет для развития рака шейки матки
↔ организованный
скрининг**

ВПЧ/HPV – ранний показатель патологических изменений

- От заражения до развития предрака и РШМ, в среднем, проходит 20 лет;
- **Отсутствуют эффективные методы лечения на стадии латентной инфекции;**
- Инфицированные женщины имеют в 300 раз более высокий риск развития рака;
- **Инфекция довольно часто не вызывает никаких жалоб у пациента и не выявляется при осмотре до перехода в стадию инвазивного рака, что не позволяет вовремя выявить их с использованием традиционных методов;**
- **Клинические проявления вируса папилломы человека высокого онкогенного риска могут маскироваться другими заболеваниями уrogenитального тракта.**

РШМ – возможности диагностики

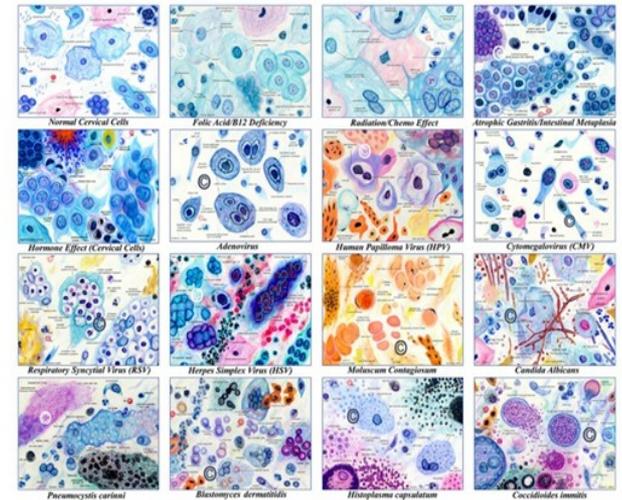
- ✓ Цитологическое исследование
- ✓ Кольпоскопия
- ✓ Гистологическое исследование
- ✓ Молекулярно-биологическое исследование (ПЦР, Digene-тест)
- ✓ Иммуноцитохимические исследования (определение молекулярных маркеров)

Комбинированные методы

- ВПЧ-тестирование и цитология;
- цитология, ВПЧ-тестирование и кольпоскопия;
- Цитология, кольпоскопия с прицельной биопсией шейки матки;
- Цитология и иммуноцитохимия.

Цитологический метод: применение

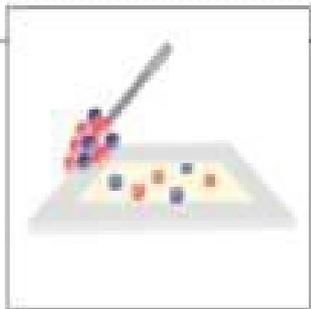
- ✓ Правильное и своевременное диагностирование злокачественных и доброкачественных новообразований;
- ✓ установление (уточнение) диагноза во время операции;
- ✓ формирование групп риска;
- ✓ мониторинг состояния пациента на всех этапах диагностики и лечения;
- ✓ ведущий метод при скрининговых обследованиях населения



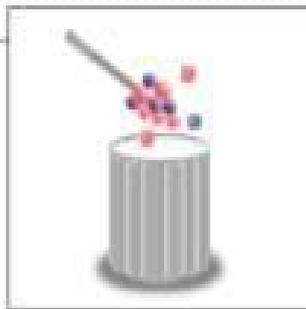
Традиционное взятие мазка



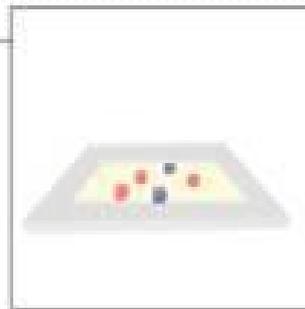
Образец с пораженными клетками (выделено красным)



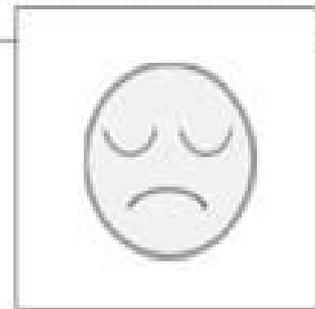
Только часть пораженных клеток попадает на стекло



Порядка 80% клеточного материала выбрасывается



Мазок пересушен или клетки наслаиваются друг на друга



Точный диагноз поставить не возможно



НЕДОСТАТКИ ТРАДИЦИОННОГО ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

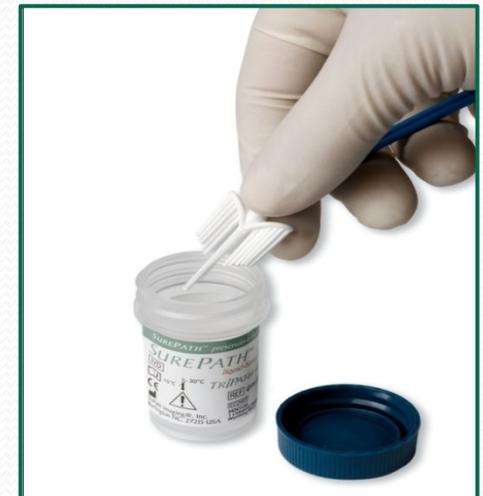
- Большое содержание слизи, элементов воспаления, элементов периферической крови;
- Несоблюдение техники приготовления и окраски препарата;
- **Недостаточное количество клеточного материала в мазке (клетки с патологическими изменениями и клетки с зоны трансформации не попадают со шпателя на предметное стекло);**
- **Нерепрезентативный многослойный препарат (толстый препарат);**
- Неравномерное распределение биологического материала на стекле.

Современные методики – жидкостная ЦИТОЛОГИЯ

- Быстро, просто, безболезненно
- Качественно: повышение чувствительности цитологического метода до 96%
- Комплексность – несколько исследований из одного образца
- Автоматизация метода

Забор материала на исследование – гинекологическая часть

- ✓ Образцы забираются классической или комбинированной щеточкой, обеспечивающей получение полноценного материала;
- ✓ полноценным материал считается, если в мазке есть клетки плоского эпителия, клетки эндоцервикса и метаплазированные клетки;
- ✓ перенос материала в специальную среду гарантирует, что весь собранный материал попадёт на исследование.



Одна виала – несколько исследований

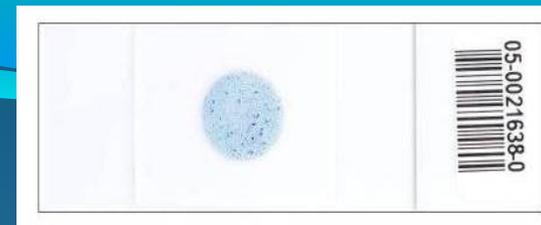
- ✓ **Остаточный образец пациента** может также использоваться для **повторных и дополнительных иммуноцитохимических и ПЦР исследований** (для диагностики ВПЧ-инфекции).
- ✓ **Срок хранения материала** во флаконе – **4 недели** при комнатной температуре и **6 месяцев** в холодильнике.



BD Surepath™

Liquid-based Pap Test

Жидкостная цитология



Контейнер с образцом



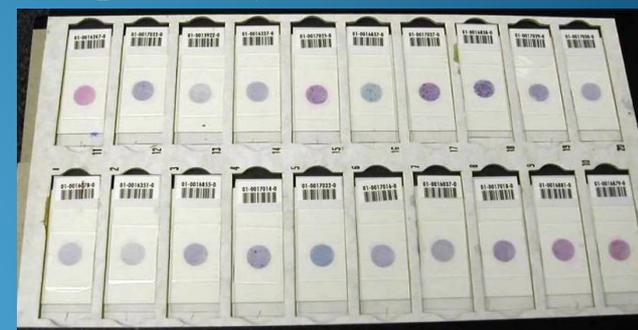
Рандомизация клеточного состава и перенос материала в пробирки



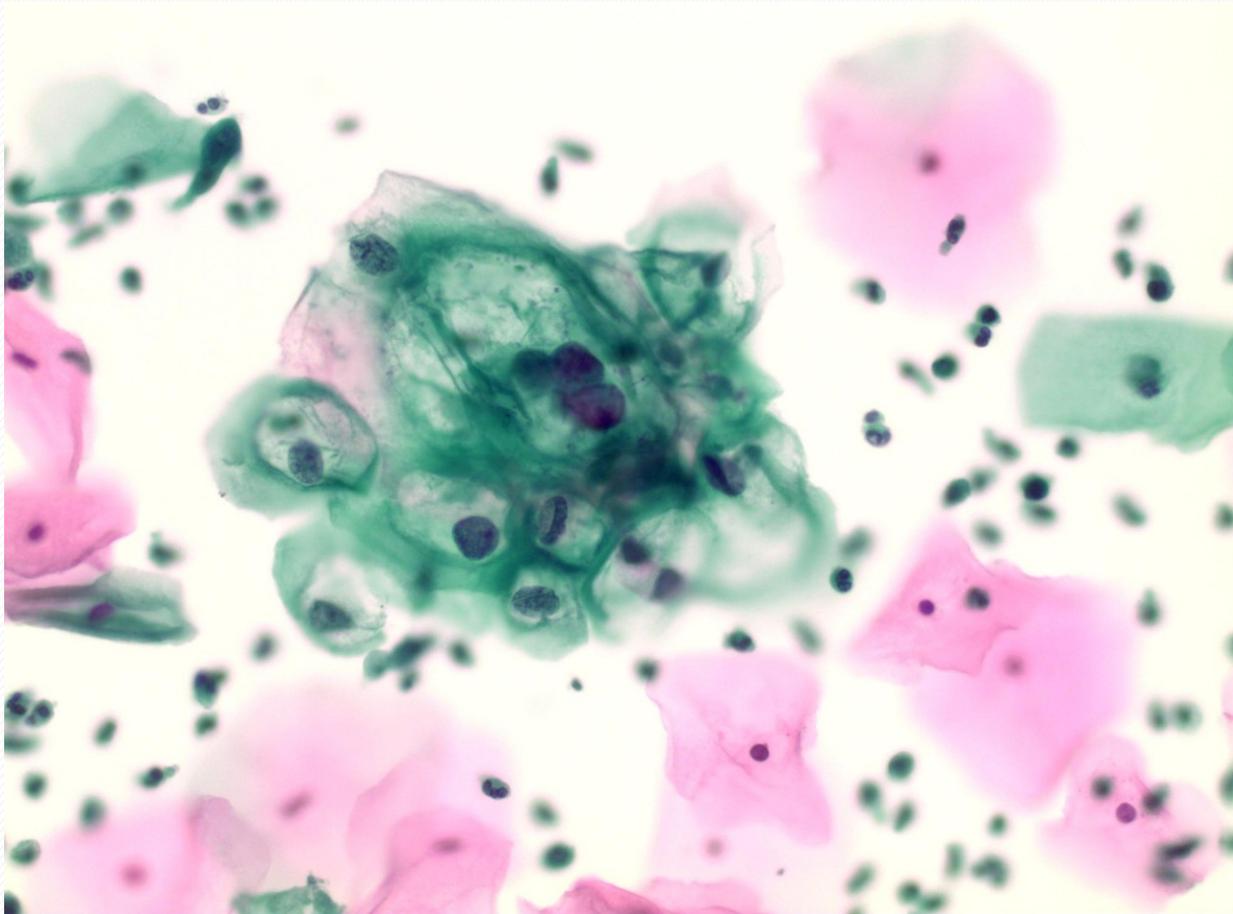
Обогащение клеточного состава по градиенту плотности



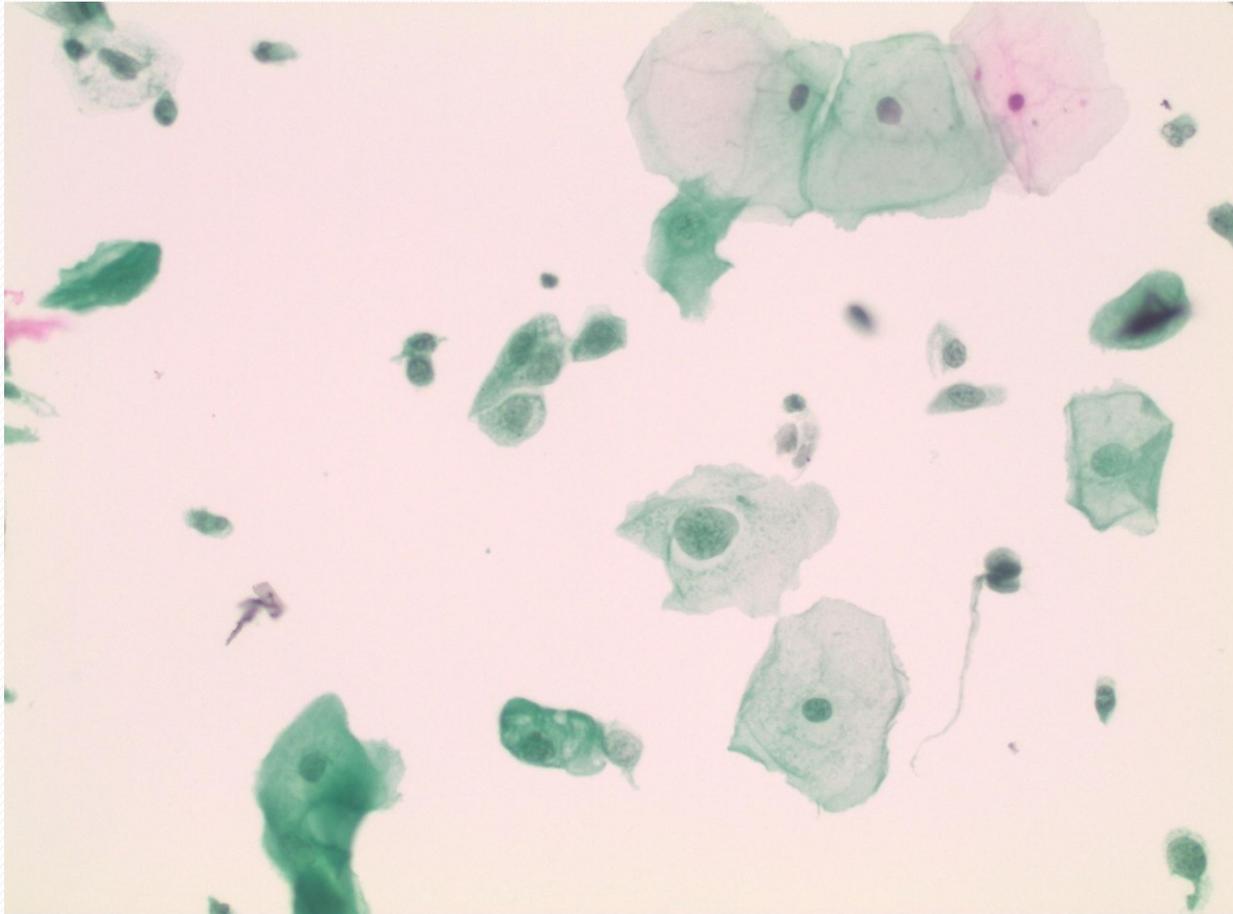
Автоматизированное нанесение монослоя клеток на предметное стекло и окрашивание препарата



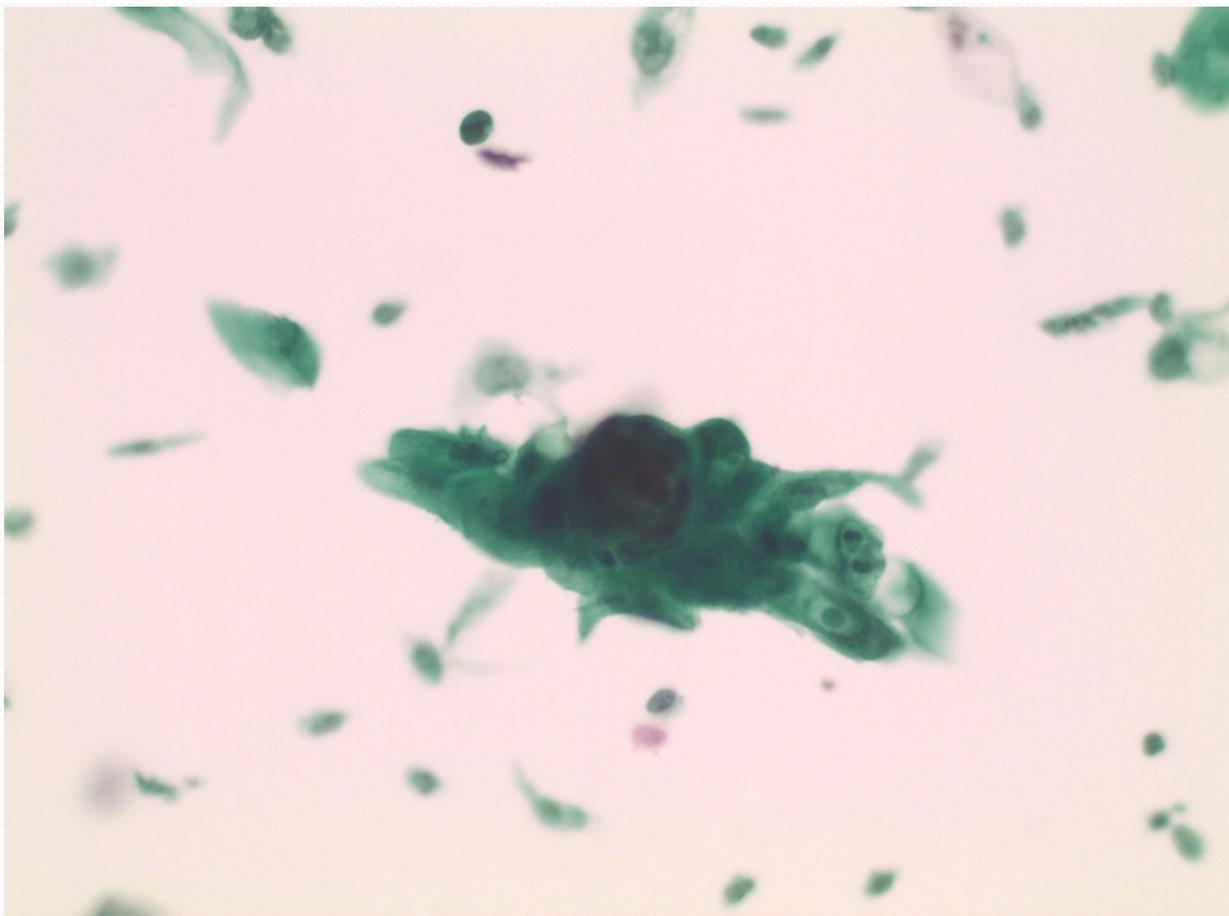
Койлоциты, LSIL



HSIL (1-2) на фоне HPV



HSIL (2-3)



Жидкостная цитология по технологии BD SurePath - составляющие успеха

- Отбор материала в жидкую среду с помощью специального инструмента
- Автоматизированная пробоподготовка – стандартизация препаратов по количеству клеток и качеству монослоя
- Автоматизированная окраска по Папаниколау
- Кадры – специалисты, обученные интерпретации жидкостной

Молекулярно-биологические методы диагностики папилломавирусной инфекции

- **Digene-тест** - обнаружение ДНК методом гибридной ловушки (Hybrid Capture).
 - Метод был разработан фирмой "Digene" (США)
 - Это высокоспецифичный количественный метод . Чувствительность метода 5000 копий ДНК ВПЧ в мл.
 - Типирование возможно только двух групп ВПЧ: высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) и низкого онкогенного риска (6, 11, 42, 43, 44).
- **ПЦР-РВ** - ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени
 - Качественный вариант – выявление и типирование до **14** типов ВПЧ
 - Количественный вариант – одновременное типирование и определение вирусной нагрузки **21** типа ВПЧ

Критерии оценки вирусной нагрузки

Количество ДНК-копий ВПЧ на 10^5 клеток

Менее 10^3

Минимальный риск
развития дисплазии
РШМ

От 10^3 до 10^5
клинически значимый
уровень

Маркер
персистирующей
ВПЧ-инфекции

Более 10^5
порог
прогрессии

Риск развиться
дисплазии и РШМ

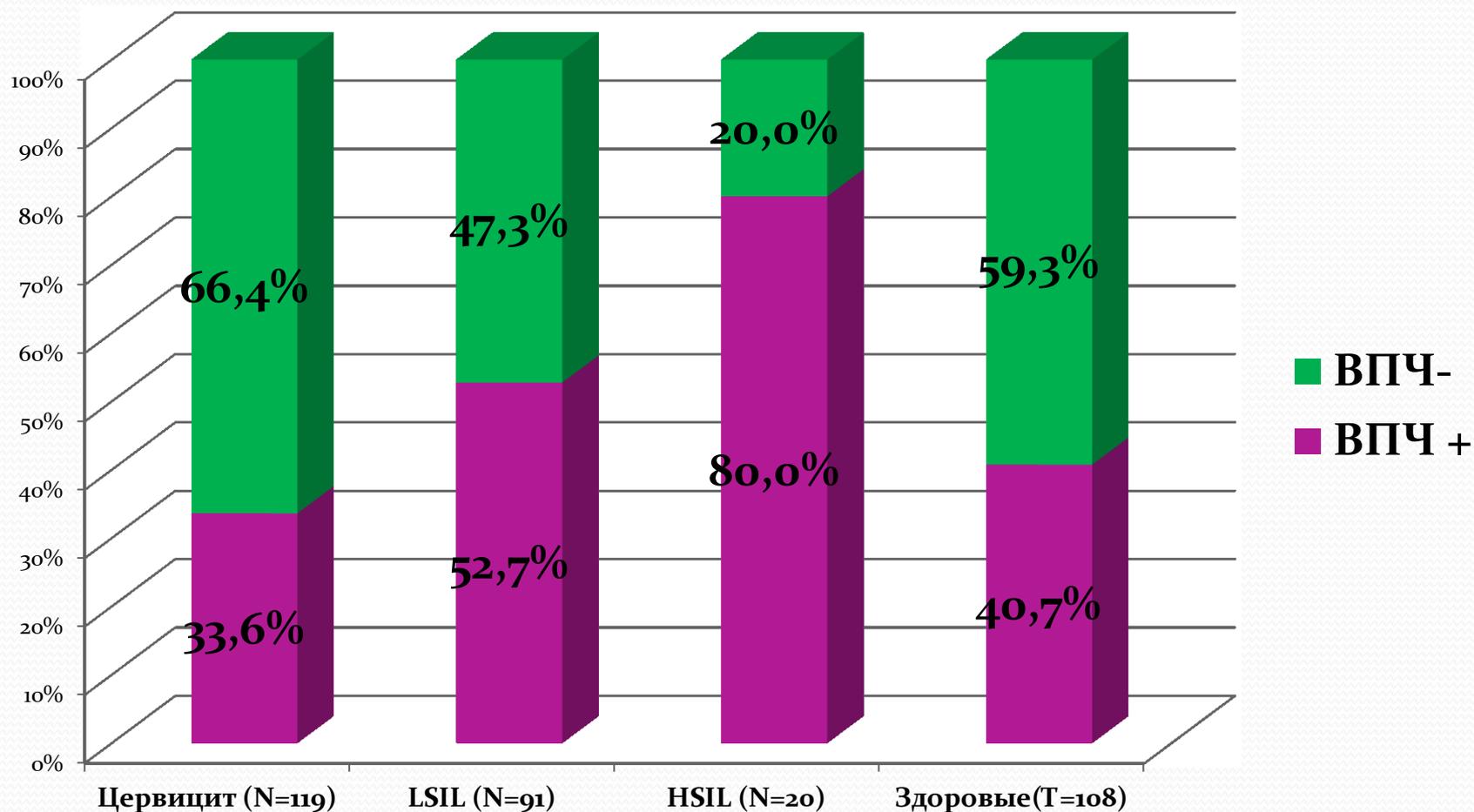
Группы обследованных женщин



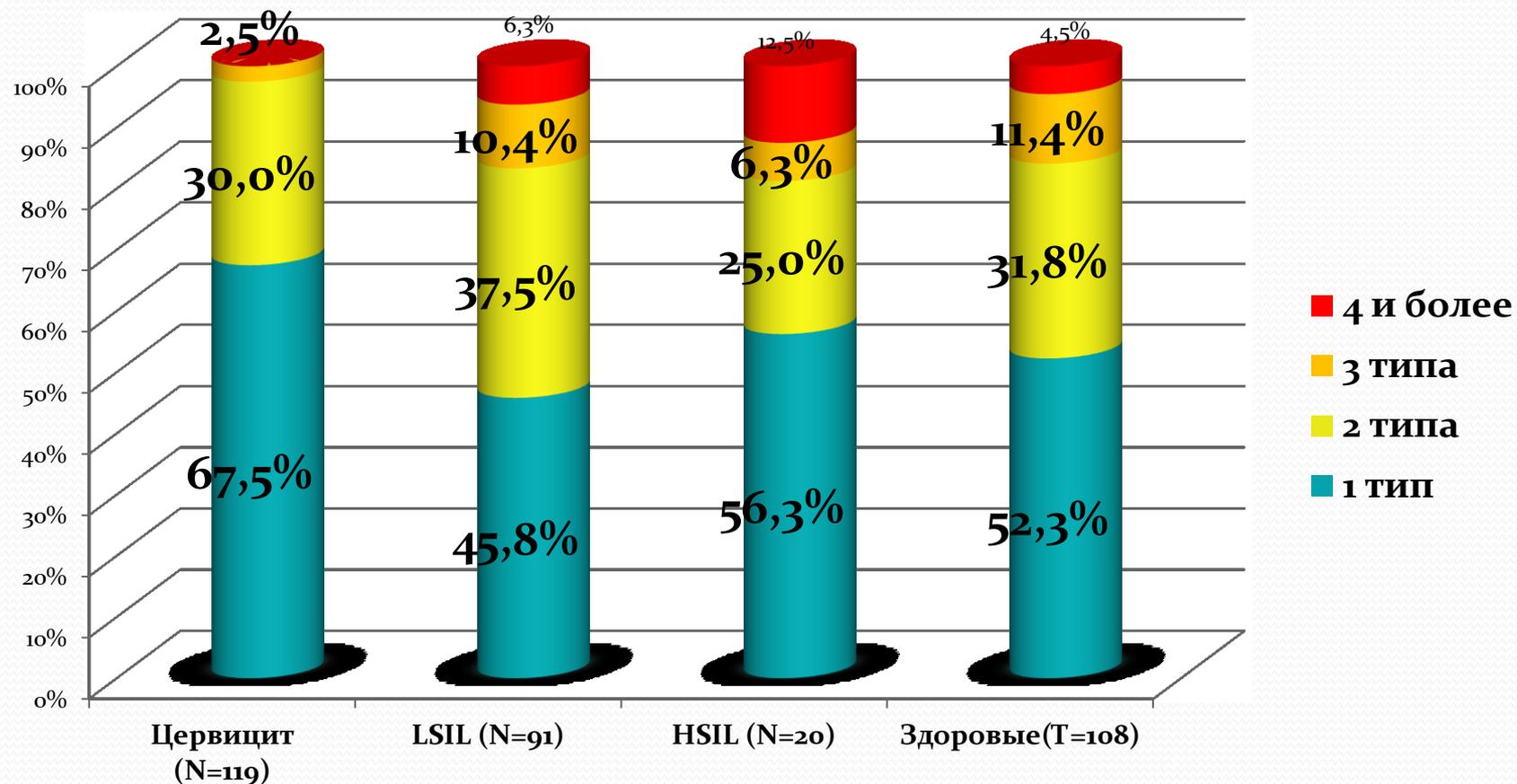
Методы

- Провели одновременное типирование и определение вирусной нагрузки 18-и типов ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), и 3-х типов ВПЧ низкого онкогенного риска (6, 11, 44) методом ПЦР-РВ («HPV квант-21»), НПФ «ДНК-Технология», Москва)
- Обработка числовых данных и графическое изображение полученных данных – Microsoft Office Excel 2007

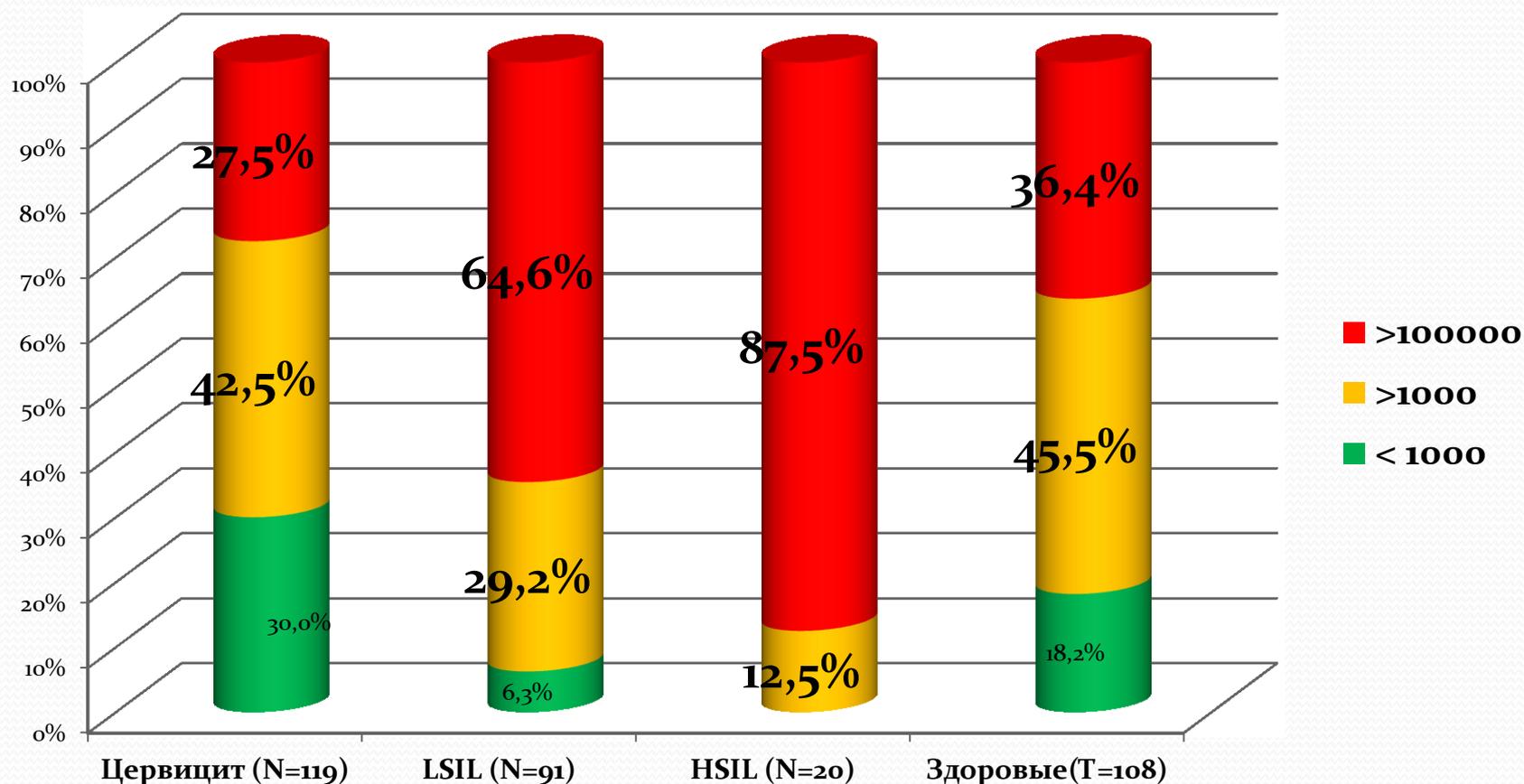
Частота выявления ВПЧ методом ПЦР-РВ у пациенток с патологией шейки матки и у здоровых женщин



Количество одновременно выявляемых видов ВПЧ у пациенток с патологией шейки матки и у здоровых женщин



Вирусная нагрузка в зависимости от цитологической картины у пациенток с патологией шейки матки и у здоровых женщин



Выводы

- У пациенток с LSIL и HSIL статистически значимо чаще выявляли ВПЧ 16 типа.
- ВПЧ ВКР в клинически значимом количестве выявили 95% пациенток с LSIL и HSIL, причем в большинстве случаев вирусная нагрузка превышала порог прогрессии.
- ВПЧ 16 типа доминировал при выявлении вируса в количестве, превышающем порог прогрессии. Что подтверждает значимость этого типа вируса в развитии патологии ШМ

Комплексное лабораторное обследование пациенток с патологией шейки матки

- Цитологическое исследование в соответствии с мировыми стандартами– жидкостная цитология по технологии **BDSurePath**
- ВПЧ-тестирование с определением вирусной нагрузки
- Выявление облигатно патогенных возбудителей ИППП (хламидии, гонококки, ВПГ)
- Определение дополнительных маркеров онкогенеза в **BD ProExC** и в **CINtec**
- Оценка микробиоценоза влагалища методом ПЦР

Спасибо за внимание!