

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

16.03.2011

Регистрационный № 238-1210

**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ И ЭЛИМИНАЦИИ ГЕНИТАЛЬНОЙ
ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ВЫСОКОГО
КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Учреждение «Гомельский областной клинический онкологический
диспансер»

АВТОРЫ:

Д-р мед. наук, доц. В.Н. Беляковский, канд. мед. наук Е.В. Воропаев,
С.В. Стасенкова, Т.И. Пригожая, А.Н. Волченко

Рак шейки матки (РШМ) занимает второе место в мире среди злокачественных новообразований женской репродуктивной системы и уступает только раку молочной железы. Ежегодно регистрируется около 500 000 случаев заболевания по всему миру. Инфицирование вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) и его длительная персистенция являются ведущими факторами в цервикальном канцерогенезе. ДНК ВПЧ может быть выявлена в соскобах с поверхности шейки матки с использованием различных молекулярно-генетических методов. В практике клиничко-диагностических и научных лабораторий наиболее распространены методы, в основе которых лежит принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР), способной увеличивать количество копий исходного образца в миллионы раз в течение нескольких ч.

В настоящее время для проведения ПЦР разработан и доступен для широкого использования набор оборудования, выпускаемый различными производителями, основным из которого является так называемый термоциклер (амплификатор) или программируемый термостат, обеспечивающий температурный и временной контроль стадий полимеразной цепной реакции в ходе амплификации, или многократного копирования ДНК в условиях *in vitro*.

Диагностика методом ПЦР обладает рядом преимуществ:

1. Высокой специфичностью, которая обусловлена подбором праймеров, комплементарных уникальной нуклеотидной последовательности определяемых геномов/участков геномов.
2. Адекватной чувствительностью, позволяющей диагностировать не только острые, но и персистирующие формы в адекватном количестве материала (выявление даже единичных бактерий или вирусов).
3. Возможностью одновременного тестирования нескольких мишеней в одном образце (мультиплекс-ПЦР).
4. Возможностью быстрого получения результата (при использовании ПЦР в реальном времени в течение 3–4 ч).
5. Возможностью количественной оценки исходной ДНК матрицы.
6. Снижающейся себестоимостью анализа, связанной с постоянным усовершенствованием реакционных смесей и внедрением в процесс диагностики автоматизации и роботизации.

Применение молекулярно-генетического метода на основе ПЦР для детекции ДНК ВПЧ ВКР (ДНК ВПЧ тест) совместно с рутинным цитологическим анализом позволит выделить группы повышенного риска развития рака шейки матки и назначить углубленное исследование. Проведение расширенного гинекологического исследования с использованием сосудистых проб и кольпоскопии дает возможность ранней диагностики вирус-ассоциированной патологии шейки матки и назначения своевременного лечения, целью которого является элиминация генитальной папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска. Применение описанной методики приведет к увеличению результативности рутинных

профилактических смотров и снижению заболеваемости дисплазией и инвазивными формами рака шейки матки.

Эпидемиологические данные

По данным эпидемиологического исследования, проведенного в рамках отдельного инновационного проекта «Разработать и внедрить протокол диагностики и элиминации вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) у здоровых женщин Гомельской области» в 2009–2010 гг., отмечается высокий уровень выявления папилломавирусов высокого канцерогенного риска среди женского населения. ДНК ВПЧ ВКР диагностирована у 35,6% женщин. Наибольшая частота выявления ДНК ВПЧ ВКР отмечается в группе до 24 лет 55,3%.

Проведение углубленного обследования с использованием расширенной кольпоскопии, а также выполнение лечебно-диагностических мероприятий по верификации патологии шейки матки всем женщинам с положительным результатом ДНК ВПЧ теста позволило установить диагноз дисплазии шейки матки I–III степени и преинвазивный рак шейки матки у 91 женщины (8,9% из 1023 обследованных). Причем у 58 человек было выявлено тяжелое поражение эпителия II–III стадии, ДНК ВПЧ ВКР была обнаружена в 93,1%.

Средний возраст женщин с выявленным тяжелым поражением шейки матки (дисплазия II–III степени) составил $30,8 \pm 1,0$ год и не отличался от такового при удовлетворительном результате цитологического исследования ($n=878$) — $32,1 \pm 0,3$ ($p=0,3$), что подтверждает необходимость внедрения алгоритмов раннего выявления вирус-ассоциированных изменений шейки матки с целью профилактики развития рака.

У 7,4% женщин ($n=76$) дисплазия I–III степени установлена вследствие проведения углубленного исследования, назначенного в результате положительного ДНК ВПЧ теста при отсутствии атипических изменений и признаков койлоцитоза и дискерацитоза в эпителиальных клетках по данным цитологического исследования. Цитологическим методом дисплазия диагностирована и верифицирована при гистологическом исследовании лишь у 0,8% женщин (без учета результатов ДНК ВПЧ теста).

Таким образом, эффективность ДНК ВПЧ теста в диагностике дисплазии шейки матки в сравнении с цитологическим методом оказалась в 15 раз выше. Использование теста на ВПЧ и активное ведение фоновой патологии шейки матки в дополнение к цитологическому методу оказалось эффективнее цитологического метода диагностики, применяемого при проведении профилактических осмотров, в 18,2 раза. ДНК ВПЧ тест позволяет определить геном патогена независимо от формы папилломавирусной инфекции: транзитной или интегрированной. Этим и определяется его высокая диагностическая ценность в поиске дисплазий шейки матки, развивающихся, как правило, на фоне персистенции инфекции и интеграции фрагментов ДНК ВПЧ в качестве онкогенов, которые обеспечивают атипическую трансформацию клетки и ее малигнизацию.

Использование данного теста после применения инвазивных методов лечения, ликвидирующих патологические измененные ткани с интегрированными в них ДНК ВПЧ, позволяет диагностировать транзиторные формы ВПЧ, отличить персистенцию вируса от повторного инфицирования и провести адекватное элиминационное лечение, направленное на удаление ВПЧ из организма другими методами.

Полученные данные соответствуют вирусному канцерогенезу рака шейки матки и доказывают целесообразность применения теста на ВПЧ в дополнение к цитологическому методу исследования. В связи с высокой стоимостью ПЦР назначение теста на ВПЧ должно быть рекомендательным.

Для целей первичного скрининга целесообразно использовать наборы реагентов и тест-системы, позволяющие выявить (без типирования) в клиническом материале широкий спектр генотипов папилломавирусов высокого канцерогенного риска (не менее 10) и не выявляющие ДНК ВПЧ низкого канцерогенного риска.

Высокая вирусная нагрузка помимо генотипа вируса является фактором, способствующим персистенции вируса, иницированию и прогрессированию злокачественной трансформации эпителия. В связи с этим для определения вирусной нагрузки с целью прогноза элиминации или прогрессирования инфекции имеет смысл применение тест-систем, позволяющих количественно выявлять вирус.

Результаты дают возможность адекватно обозначить группу повышенного риска развития РШМ и назначить углубленное клиническое исследование целевой группе, что позволяет рекомендовать использование подобных тест-систем для задач рутинного скрининга.

Для контроля, инвазивного хирургического и элиминационного лечения, дифференциальной диагностики персистирующей папилломавирусной инфекции от повторного инфицирования, верификации ВПЧ-отрицательного РШМ целесообразно использовать тест-системы, позволяющие определить ДНК ВПЧ широкого спектра генотипов высокого канцерогенного риска даже в малых концентрациях (без учета клинической значимости).

Осведомленность женщин о наличии более информативного метода профилактики рака шейки матки, чем рутинное цитологическое исследование, как и знание об инфицированности вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска, является мотивацией для регулярного наблюдения и своевременного лечения.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Тест на ВПЧ в дополнение к цитологическому исследованию должен проводиться в первичном скрининге рака шейки матки у женщин:

- подлежащих профилактическим осмотрам
- после сексуального дебюта независимо от возраста
- при смене полового партнера.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ:

- гинекологическое кресло
- одноразовые или стерильные многоразовые гинекологические зеркала
- цитощетки одноразового применения
- герметичные пробирки с транспортной средой для мазков
- обезжиренные стекла для приготовления цитологических мазков
- набор реагентов для фиксации и окраски цитологического мазка (по Папаниколау, Паппенгейму, Лейшману, Романовскому–Гимзе и др.)
- световой микроскоп x100
- оборудование и реагенты, необходимые для молекулярно-генетического исследования методом ПЦР, позволяющего провести все этапы анализа (выделение из клинического материала, амплификацию искомого участка генома и детекцию продуктов амплификации)
- стерильные ватные тампоны
- стерильный пинцет,
- 3–5% раствор уксусной кислоты
- раствор Люголя
- бестеневая лампа
- кольпоскоп
- конхотом
- набор петель для биопсии
- радиоволновой аппарат
- диатермокоагулятор.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Методика забора материала для исследования

После введения гинекологических зеркал во влагалище и открытия шейки проводится осмотр слизистой оболочки и удаление слизи пробки с поверхности шейки матки пинцетом со стерильным тампоном. Затем цитощеткой выполняется соскоб клеточного материала эпителия шейки матки. Собранные с помощью цервикальной щетки клетки помещаются в жидкую консервирующую среду в герметичную пробирку, после использования цитощетка помещается в емкость с рабочим раствором дезинфицирующего средства. Другой щеткой делается забор клеток эпителия из зоны трансформации и из цервикального канала для цитологического исследования. На подготовленном обезжиренном стекле выполняется 2 мазка, которые располагаются на стекле с маркировкой «с» и «е», что соответствует материалу из шейки и эндоцервикса.

Материал для цитологического исследования высыхает и направляется в цитологическую лабораторию. Материал для ПЦР помещается в

морозильную камеру, в которой накапливаются пробирки, затем передается в лабораторию.

Интерпретация полученных результатов обследования

Определение ДНК ВПЧ ВКР может свидетельствовать как о транзиторной форме инфекции, при которой имеются в наличии сами вирусы, так и об интегрированной, т.е. наличии ДНК ВПЧ в генетическом материале эпителиальной клетки. При обеих формах инфекции может развиваться дисплазия, но при транзиторной она может быть преходящей и исчезнуть после элиминации вирусов, при интегрированной патологический процесс необратим. Таким образом, положительный тест на ВПЧ ВКР является основанием для углубленной диагностики.

При цитологическом исследовании в мазках могут определяться атипические изменения многослойного плоского эпителия, характерные для дисплазии I–III степени или рака, а также цитологические маркеры вирусной инфекции койлоциты и дискерациты. Наличие этих изменений также является показанием для углубленной диагностики с использованием расширенной кольпоскопии и морфологического исследования биоптатов шейки матки.

Показания для углубленной диагностики

Расширенная кольпоскопия выполняется:

1. Всем пациенткам с положительным тестом на ВПЧ.
2. Всем пациенткам с цитологической картиной дисплазии шейки матки.

Показания для выполнения биопсии

Прицельная биопсия выполняется при наличии кольпоскопически визуализируемой вирус-ассоциированной патологии шейки матки, как на фоне многослойного плоского эпителия, так и цилиндрического, в зоне трансформации. Биопсия выполняется конхотомом, скальпелем, петлей диатермокоагулятора или радиоволнового аппарата. Обязательным условием биопсии является наличие субэпителиального слоя.

Выскабливание слизистой оболочки цервикального канала выполняется в дополнение к прицельной биопсии. Выскабливание производится ложечкой Фолькмана или кюреткой № 1.

Коническая или круговая биопсия осуществляется с *диагностической и лечебной целью* у инфицированных пациенток:

1. При кольпоскопически визуализируемой вирус-ассоциированной патологии шейки матки, верифицированной гистологически (CIN I–III степени).
2. При наличии зон трансформации, обусловленных:
 - эктопией цилиндрического эпителия с кистами или без
 - эктропионом с кистами или без
 - множественными кистами шейки матки.
3. При дисплазии шейки матки в цервикальном канале.

Коническая или круговая биопсия выполняется у нерожавших женщин на радиоволновых аппаратах, у рожавших с последующей репродуктивной функцией предпочтительно на радиоволновых аппаратах или диатермокоагуляторах в пределах разрывов наружного зева шейки матки.

Соблюдение этих условий не травмирует мышечный слой шейки матки, не вызывает рубцевания шейки матки и не нарушает в последующем период раскрытия шейки матки в родах.

Элиминационное лечение генитальной папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска

Показания для лечения

1. Как *дополнительное* после выполнения конической биопсии шейки матки в период эпителизации (начиная с 10–12 сут после конизации) назначаются интерфероновые свечи эндовагинально в дозировке 1000000 ЕД № 10 ежедневно или через 1 день на ночь. Через 2 мес выполняется тест на ВПЧ.

2. Как *самостоятельное* лечение интерфероновые свечи назначаются *стабильным сексуальным парам*:

- при положительном тесте на ВПЧ после выполнения конической биопсии

- при отсутствии патологии шейки матки и желании пациентки провести элиминационное лечение.

МЕТОДИКА ЭЛИМИНАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА

Интерфероновые свечи в дозировке 1000000 ЕД вводятся эндовагинально в межменструальном периоде через 1 день на ночь. В день сексуального контакта свечи вводятся за 15–20 мин до полового акта. Применение свечей продолжается без перерыва до наступления элиминации вирусов папилломы человека. Тест на ВПЧ для контроля элиминации выполняется 1 раз в 3 мес.

ОГРАНИЧЕНИЯ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА

1. Нецелесообразно назначение элиминационного лечения пациенткам при отсутствии постоянного полового партнера в связи с последующим инфицированием. При желании пациентки проводить данное лечение, ограничений нет.

2. Целесообразно элиминационное лечение при условии только вагинального секса (до наступления элиминации).

3. Показана смена препарата при появлении побочных действий (аллергические проявления).

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК ВПЧ ВКР ТЕСТА И ДОСТИЖЕНИЯ ЭЛИМИНАЦИИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА В СКРИНИНГЕ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

В Республике Беларусь папилломавирусная инфекция (ПВИ) до настоящего времени не включена в перечень заболеваний, подлежащих обязательному государственному учету и регистрации, также отсутствует система эпидемиологического надзора за ВПЧ (как для сифилиса, гонореи, хламидийной инфекции и др.), что связано со стертой клинической картины латентной инфекции и невозможностью рутинного определения вируса другими методами, кроме молекулярно-генетических.

Широкое распространение папилломавирусов высокого канцерогенного риска в популяции обуславливает рост заболеваемости РШМ среди женского населения. По данным Белорусского канцер-регистра, в стране наблюдается рост заболеваемости РШМ (с 15,7 впервые выявленных случаев на 100 тыс. женского населения в 2000 г. до 18,5 случаев, зарегистрированных в 2008 г.), причем увеличение заболеваемости отмечается в основном в группе женщин детородного возраста. В 2009 г. показатель заболеваемости впервые установленным РШМ составил 18,1 случаев на 100 тыс. населения.

В настоящее время описано более 200 типов, подтипов и вариантов ВПЧ, из которых только около 40 классифицированы как аногенитальные. Среди многочисленных генотипов ВПЧ онкогенным потенциалом обладают ВПЧ высокого онкогенного риска (ВКР), к которым на сегодняшний день относятся 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 генотипы. С последними связано 95,3% случаев заболеваний РШМ, а также развитие бовеноидного папулеза. Следует отметить, что в ряде случаев исцеление от вируса происходит без лечения, что вероятно, может быть связано с внутренними резервами и силой защитных реакций организма. В то же время доказано, что РШМ однозначно не встречается при отсутствии ВПЧ. Существующие на рынке лабораторной диагностики нашей страны тест-системы на основе метода ПЦР позволяют выявлять одновременно 12 генотипов ВПЧ ВКР, что соответствует 94% чувствительности. По нашим данным, при использовании этих тест-систем только менее 1% цервикальных неоплазий являются ВПЧ отрицательными.

Несмотря на достижения в области молекулярной биологии и разработку высокочувствительных и специфичных методов выявления ВПЧ основным скрининговым методом до сих пор остается цитологический, направленный на выявление уже развившихся ВПЧ ассоциированных проявлений. Потери в обнаружении предопухоловой патологии при использовании цитологического метода у женщин молодого возраста составляют 30–35% и связаны с недостаточной чувствительностью метода.

Обзор исследований, проведенных с целью оценки диагностических характеристик цитологического исследования и теста на ВПЧ, показал, что чувствительность ДНК ВПЧ-тестирования (88–100%) значительно

превышает таковую цитологического исследования (68–86%). В США с 2003 г. тест на ВПЧ рекомендован в дополнение к цитологическому исследованию. В Европе вопрос о применении теста на ВПЧ в первичном скрининге находится в стадии активного обсуждения. В России в настоящее время завершаются масштабные государственные испытания программы цервикального скрининга, в основе которого лежит использование ДНК ВПЧ тестов. Таким образом, разработка совершенных профилактических скрининговых программ является актуальной задачей современной профилактической медицины и находится в контексте современных взглядов на скрининг РШМ.

Задачами лечения папилломавирусной инфекции и ассоциированной с ней патологии шейки матки служат не только устранение атипических изменений в эпителии, но и достижение элиминации инфекции, прерывание ее передачи. Однако в наиболее широко используемых схемах лечения вирус-ассоциированной патологии шейки матки эти задачи не достигнуты, так как не служат цели элиминации вируса из организма. Основные методы лечения ПВИ: электрокоагуляция и конизация, крио-, лазеро-, радиодеструкция, фотодинамическая терапия экзофитных образований и атипически измененного эпителия, позволяют удалить очаг поражения. Эффективность этих методов, по разным данным, колеблется от 45 до 97%, а частота рецидивирования — от 15 до 50%, что связывается с сопутствующей папилломавирусной инфекцией.

В последние годы широко исследуются препараты, действующие на репликацию, транскрипцию и трансформацию ДНК ВПЧ. В этом ряду необходимо отметить интерфероны, особенно интерферон альфа-2а, обладающий противовирусной, противоопухолевой и иммуномоделирующей активностью. Механизм противовирусного действия связан с ингибированием репликации ДНК ВПЧ, нарушением синтеза белков, что приводит к нарушению сборки вирусных частиц. Кроме того, интерферон альфа-2а повышает фагоцитарную активность макрофагов и усиливает специфическое цитотоксическое действие лимфоцитов на инфицированные ВПЧ клетки. Использование интерферонов способствует не только снижению рецидивов при лечении вирус-ассоциированной патологии шейки матки, но вызывает элиминацию ВПЧ из организма.