**Современные подходы к диагностике папилломавирусной инфекции гениталий у женщин и их значение для скрининга рака шейки матки**

**C**реди заболеваний, передающихся половым путем, особое значение имеет папилломавирусная инфекция (ПВИ) гениталий, возбудителем которой является вирус папилломы человека (ВПЧ). Это связано с тремя основными аспектами. Во-первых, частота распространения инфекции является высокой. Число инфицированных в мире за последнее десятилетие увеличилось более чем в 10 раз [1]. Во-вторых, ПВИ чрезвычайно сложна для диагностики, особенно ее латентная форма, при которой, несмотря на наличие вирусов, морфологических изменений в ткани не наблюдается [2]. У более 15% женщин обнаружен ВПЧ в шейке матки, хотя клиническая симптоматика заболевания отсутствовала [3]. В-третьих, ВПЧ рассматривается как этиологический фактор в развитии рака шейки матки [4]. Во всем мире рак шейки матки занимает второе место среди злокачественных новообразований у женщин [3, 4].
   Диагностические методы, направленные на выявление ПВИ, могли бы увеличить эффективность первичного и вторичного скрининга рака шейки матки [5]. Особое внимание вызывают современные методы, направленные на диагностику латентной ПВИ и ранних предраковых поражений шейки матки.
   ПВИ подразделяют на клиническую, субклиническую и латентную формы [6]. Клиническая форма ПВИ является причиной соответствующих симптомов у пациентов и видима "невооруженным глазом". Проявлением клинической формы являются генитальные бородавки (остроконечные, плоские или эндофитные кондиломы) [1, 7].
   Субклиническая форма не сопровождается симптомами, но может быть диагноcцирована при кольпоскопии или микроскопическом исследовании ткани [8, 9]. Морфологические изменения шейки матки, вызываемые ВПЧ, представляют собой спектр предраковых поражений, которые, в свою очередь, обозначаются как цервикальная интраэпителиальная неоплазия (cervical intraepithelial neoplasia - CIN) или дисплазия [10], способная прогрессировать в плоскоклеточную карциному. Классификация, предложенная Национальным институтом по изучению рака США (Bethesda system, 1988 г., пересмотрена в 1991 г.), подразделяет плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (squamous intraepithelial lesions - SIL) на две категории: низкой и высокой степени тяжести (low & high grade) [11]. Клеточные элементы, которые трудно поддаются классификации, именуются как атипические клетки плоского эпителия неопределенного значения (atypical squamous cell undetermined significance - ASCUS). Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени тяжести объединяют цитологические изменения, указывающие на слабую дисплазию (CIN I) и ВПЧ-индуцированные морфологические изменения (койлоцитотическая атипия) [11]. SIL высокой степени тяжести включают умеренную дисплазию (CIN II), тяжелую дисплазию и карциному in situ (CIN III). SIL высокой степени тяжести встречаются редко [10]. Хотя SIL высокой степени тяжести более часто прогрессируют в рак по сравнению с SIL низкой степени тяжести, они могут спонтанно регрессировать, даже если были вызваны высокоонкогенными серотипами ВПЧ (16,18 и другими) [12]. Более чем у 25% женщин с SIL низкой степени тяжести наблюдается прогрессия в SIL высокой степени тяжести в течение 4 лет [2]. Следовательно, при субклинической форме ПВИ важно диагносцировать различные морфологические изменения шейки матки.
   Латентная форма не может быть диагносцирована кольпоскопически, цитологически и гистологически [8, 9]. Однако присутствие ВПЧ в биоптатах шейки матки при латентной форме инфекции можно определить по наличию ДНК-вируса [13]. Для этой цели чаще всего применяются следующие методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), Hybrid Capture (метод на основе гибридизации в растворе) [14, 15]. Эти методы позволяют определить серотип вируса, что имеет значение для прогноза дальнейшего развития заболевания.
   Методы диагностики ПВИ могут быть разделены на классические, включая цитологический метод, гистологическое исследование биоптатов, кольпоскопию, определение антител к ВПЧ и современные методы, подразделяющиеся на неамплификационные: (Southern blot, Dot blot, гибридизация in situ, ПЦР) и амплификационные: Hybrid Capture.
   Наиболее значимыми характеристиками диагностического теста для скрининга являются чувствительность, приемлемость, легкость в исполнении, хорошая воспроизводимость, безопасность в использовании и низкая стоимость [10]. В связи с этим не все перечисленные методы получили широкое распространение как в России, так и за рубежом.
   Наиболее полно данным требованиям соответствует цитологическое исследование.
   **Цитологическое исследование.** За рубежом используется окрашивание мазков по Папаниколау (Pap-мазки) [8]. Это исследование позволило существенно снизить уровень развития рака шейки матки, особенно в развитых странах [16, 17]. В нашей стране распространено окрашивание мазков по методу Романовского - Гимза [8]. Использование этого цитологического анализа в скрининговых целях требует углубленного изучения.
   Критерием ПВИ при цитологическом исследовании шеечных мазков является наличие в них койлоцитов (клетки с обширной зоной просветления вокруг ядра) и дискератоцитов (клетки с увеличенным темным пикнотическим ядром из поверхностных ороговевающих слоев многослойного плоского эпителия) [9, 11].
   Однако не следует забывать о следующих существенных недостатках цитологического исследования: 1) анализ позволяет диагносцировать только клиническую и субклиническую формы инфекции; 2) cуществует возможность появления ложноотрицательных результатов при наличии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени тяжести (в мазок попадают чаще всего поверхностные клетки плоского эпителия, а койлоцитоатипия может наблюдаться в более глубоких слоях многослойного плоского эпителия); 3) чувствительность цитологических методов для обнаружения поражений шейки матки варьирует от 50 до 80%, что может быть отчасти компенсировано повторением теста через короткие промежутки времени [6, 10].
   **Кольпоскопия.** При определении в цитологическом мазке дискариотических клеток необходимо кольпоскопическое исследование с целью подтверждения или исключения существования предракового поражения [11].
   Остроконечные кондиломы имеют характерную кольпоскопическую картину. Поражение представляет собой белесые эпителиальные образования с пальцеобразными выростами, придающими им неправильную форму. Наиболее важным диагностическим критерием служит наличие правильной капиллярной сети в выростах, которая выявляется после обработки места поражения 3% раствором уксусной кислоты [6, 9].
   Кольпоскопия рассматривается как наиболее чувствительный клинический метод определения субклинической формы ПВИ [11]. При субклинической форме ПВИ шейки матки атипическая зона трансформации характеризуется такими кольпоскопическими картинами, как ацето-белые поражения, мозаика, пунктация или лейкоплакия [9]. Субклиническая форма ПВИ может быть дифференцирована от интраэпителиальной неоплазии по следующим критериям: поражения могут иметь блестящий белый цвет, сморщенную поверхность, маленькие межкапиллярные расстояния, четкую границу между очагом поражения и прилежащими тканями, атипические сосуды [9, 11]. Однако даже для опытного кольпоскописта дифференциальная диагностика субклинической формой ПВИ и CIN I может быть затруднительной. Принято считать, что одним из признаков плоских кондилом является неравномерное поглощение эпителием водного раствора Люголя, что отличает его от атипического эпителия, не содержащего гликоген [1].
   По данным G. Gross и R.Barrasso [11], кольпоскопию можно рассматривать не как диагностический метод, а как исследование, позволяющее оценить размеры поражения и его локализацию на границе плоского и цилиндрического эпителия, реже использовать диагностическую конизацию и исключить инвазивный рак. Кроме того, кольпоскопия используется для проведения диагностических биопсий в области стыка многослойного плоского и цилиндрического эпителия, т.е. в наиболее труднодоступных для обзора местах шейки матки.
   Проведение кольпоскопически ориентированной биопсии позволяет увеличить точность диагностики предраковых состояний шейки матки на 25% [11].
   **Гистологическое исследование.** При гистологическом исследовании поражения шейки матки редко бывают однородными и могут наблюдаться все степени диспластических изменений [11]. Субклиническая форма ПВИ сопровождается такими морфологическими особенностями, как акантоз, гиперплазия клеток базального и парабазального слоя многослойного плоского эпителия, пара- или гиперкератоз, клеточные элементы с койлоцитотической атипией [9]. Данные критерии характеризуются разнообразием в отношении диагностики субклинической формы ПВИ. Об этом свидетельствуют данные об отсутствии единого мнения при исследовании биоптированной ткани [7].
   При возникновении морфологических признаков малигнизации установлено, что изменения, характерные для ПВИ, уменьшаются (например, койлоцитоз, продукция капсидного антигена), в то время как патология ДНК (анэуплоидия) и количество патологических митозов нарастает [11].
   **Определение антител ВПЧ.** Выявление того факта, что вирус папилломы быка (который можно сохранить в культуре ткани) имеет общие антигенные свойства с ВПЧ, привело к возможности использования широкого спектра антител для подтверждения присутствия вирусных протеинов в мазках и биоптатах шейки матки [17].
   Исследования, проведенные в последние годы, позволили определить антитела к определенным серотипам ВПЧ, а также серореактивные области внутри соответствующих протеинов [18]. При клинической форме ПВИ были выявлены антитела к ВПЧ типа 11 в сыворотках пациентов с генитальными бородавками и папилломами гортани. Для ВПЧ типов 6, 11, 16, 18 и 33, поражающих половые органы, были идентифицированы серореактивные области внутри L1 и L2 протеинов [17, 19]. Кроме того, выявлялись серореактивные области в протеинах Е4 и Е7 ВПЧ [19].
   **Обнаружение ДНК ВПЧ (молекулярно-биологические методы).** В наши дни в основном используют два основных теста: ПЦР и метод Hybrid Capture [16, 20]. Технология метода Hybrid Capture была разработана фирмой "Digene" (США), поэтому его иногда называют "Digene-тест". Он заключается в ДНК гибридизации в растворе с последующей сорбцией на полистероловой планшете [20]. С применением этих тестов стало возможным определение более чем 70 различных типов ВПЧ, но для клиники перспективным является выявление только канцерогенных типов [3]. Устаревшие тесты, такие как Southern blot и Dot blot, используются крайне редко [21].
**Оценка клинического применения скрининговых диагностических методов**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследования | Число пациентов с диспластическими изменениями шейки матки/ общее число пациентов | Метод  | % чувствительности теста  | Показания мазков |
| J. Cox и соавт. (1995) [23] | 15/217 | Кольпоскопия | 100 | ASCUS |
| Рар-мазок | 73 |
| Гибридизация | 93 |
| Рар+Гибридизация | 100 |
| T. Wright и соавт. (1995) [14] | 50/398 | Кольпоскопия | 100 | ASCUS или SIL |
| Рар-мазок | 80 |
| Гибридизация | 78 |
| Рар+Гибридизация | 96 |
| K. Hatch и соавт. (1995) [24] | 126/311 | Кольпоскопия | 100 | SIL |
| Рар-мазок | 75 |
| Гибридизация | 74 |
| Рар+Гибридизация | 91 |
| S.Hall и соавт.(1996) [25] | 15/75 | Кольпоскопия | 100 | ASCUS или SIL |
| Рар-мазок | 87 |
| Гибридизация | 93 |
| Рар+Гибридизация | 100 |
| A. Ferenczy и соавт. (1996) [15] | 47/364 | Кольпоскопия | 100 | ASCUS или SIL |
| Рар-мазок | 87 |
| Гибридизация | 77 |
| Рар+Гибридизация | 95 |

   ДНК ВПЧ может быть определена после увеличения числа генов вирусной последовательности путем ПЦР [20]. Метод, основанный на ПЦР, в настоящее время является наиболее широко применяемым и обнаруживает от 10 до 100 копий генома ВПЧ. Одним из условий, определяющим эффективность данного метода, является подбор оптимальных нуклеотидных праймеров, что связано с определенными трудностями в нашей стране. Продукты ПЦР определяются с типоспецифическими зондами, использованием Dot blot гибридизации, Southern blot гибридизации или ТИФА (твердофазный иммуноферментный анализ) на полиэстероловых планшетах [20].
   Чувствительность методов, основанных на ПЦР (например, обратно транскриптазная полимеразная реакция), настолько велика, что позволяет определить Е6 и Е7 онкогенные транскрипты ВПЧ типа 16 даже в тех соскобах шейки матки, в которых не определялись диспластические изменения эпителия [22].
   Современная, так называемая сэндвич-гибридизация в растворе на основе ИФА (иммуноферментный анализ) становится все более доступной (тест Hybrid Capture). Этот тест способен различить наличие ВПЧ серотипов "низкого риска" и "высокого риска" малигнизации [14]. Гибридизация in situ может проводиться с увеличения или без такового числа генов вирусной ДНК. Данный метод позволяет определить место вирусного генома в инфицированных клетках и топографическую локализацию вируса [14, 21]. Однако подобные биологические тест-системы являются дорогостоящими.
   Представленные диагностические методы имеют как очевидные преимущества, так и недостатки. Исходя из этого, наиболее адекватными для скрининга являются три теста: цитологический, кольпоскопический и ВПЧ-тестирование методом гибридизации [10]. Многие авторы рекомендуют комбинировать данные методы в зависимости от клинической ситуации [5, 10]. ВПЧ-тестирование само по себе может рассматриваться как альтернативный тест при установлении стратегии первичного скрининга [10]. J. Cox и соавт. [23] предлагают использовать ВПЧ-тестирование в комбинации с цитологическим тестом при первичном скрининге с целью снижения риска потери поражений типа SIL высокой степени тяжести и рака. Таким образом, концепция первичного скрининга заключается в следующем:
   • использование только цитологической диагностики для женщин моложе 30 лет,
   • ВПЧ-тестирование и цитологическое исследование шеечных мазков у женщин старше 30 лет.
   Такая политика определяется тем фактом, что у женщин моложе 30 лет более 70% поражений, вызванных ВПЧ, регрессируют спонтанно, тогда как у женщин среднего возраста, в связи с персистенцией вируса, поражения регрессируют значительно реже [10].
   При проведении вторичного скрининга, помимо цитологического исследования, особую роль играет кольпоскопия. Это связано с возможностью кольпоскопического определения различных стадий субклинической ПВИ, в том числе поражений SIL низкой степени тяжести. При этом применение ВПЧ-тестирования позволяет идентифицировать женщин с SIL низкой степени тяжести, которые имеют риск развития поражений более высокой степени тяжести [10, 21].
   Клиническое применение скрининговых диагностических методов может быть рассмотрено на основе пяти исследований, проведенных в США в 1995 - 1996 гг. [21]. Для исследования были отобраны пациентки с атипическими клетками плоского эпителия неопределенного значения (ASCUS) или плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями (SIL) низкой степени тяжести, подтвержденными цитологически. Обобщенные результаты исследования представлены в таблице. Особое внимание было обращено на чувствительность тестов при CIN, которые подтверждались кольпоскопически.
   Как видно из таблицы, чувствительность Рар-мазков эквивалентна чувствительности гибридизации в растворе. При этом одни исследования показывают преимущество Рар-мазков, другие - метода гибридизации. Во всех исследованиях комбинация Рар-теста и гибридизации в растворе была эффективнее, чем использование каждого метода отдельно. Их комбинированная чувствительность была более 95%, что весьма важно для скрининга рака шейки матки. Хотя кольпоскопия является наиболее чувствительным методом, для определения диспластических поражений требуется на 30% больше повторных кольпоскопических исследований, чем при других методах [14, 15, 23 - 25].
   Таким образом, доступность амплификационных методов диагностики ВПЧ позволила оценить потенциальную роль ВПЧ-тестирования в клинической практике. Эта оценка заключается в возможности прогнозирования процесса течения ПВИ вследствие идентификации низко- и высокоонкогенных серотипов ВПЧ.
   Современные подходы к диагностике папилломавирусной инфекции гениталий основаны на комбинации классических методов: цитологического и кольпоскопического исследований и современного ВПЧ-тестирования методом гибридизации в растворе, что позволяет существенно увеличить эффективность первичного и вторичного скрининга рака шейки матки.

**Литература:**

   1. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция гениталий. Клиника и лечение. Заболевания шейки матки. Клинические лекции. М. 1997; 46-51.
   2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Vol. 64. Lyon: IARC, 1995.
   3. Franco EL, Villa LL, Richardson H, Rohan TE, Ferenczy A. Epidemiology of Cervical Human Papillomavirus Infection. In: Franco E. & Mosonego J., editors. New Developments in Cervical Cancer Screening and prevention. Oxford: Blackwell Science. 1997:14-22.
   4. Critchlow CW, Koutsky LA. Epidemiology of human papillomavirus infection. In: Mindel A., editor. Genital warts. Human papillomavirus infection. London. Edward Arnold. 1995:53-81.
   5. De Wolf CJM.: Organization and Resalts of Cervical Canser Screening in Europe Over the Past 20 Years. In: Franco E. & Mosonego J., editors. New Developments in Cervical Cancer Screening and prevention. Oxford: Blackwell Science. 1997:209-19.
   6. Краснопольский В.И., Радзинский В.Е., Буянова С.Н., Манухин И.Б., Кондриков Н.И. Патология влагалища и шейки матки. М.: Медицина, 1997,128-35.
   7. Головина Л.И. Кольпоскопическая и цитологическая оценка плоских кондилом и их связи с интраэпителиальной неоплазией шейки матки. Дисс. на соиск. уч. ст. канд. мед. наук - С-П. 1994.
   8. Прилепская В.Н. Возрастные особенности шейки матки. Современные методы диагностики патологии шейки матки. Акуш. и гин.1998;6:51-4.
   9. Прилепская В.Н., Роговская С.И., Межевитинова Е.А. Кольпоскопия. Практическое руководство. М. 1997.
   10. Coutlee F, Mayrand MH, Provencher D. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. J. Cl & Diagn Virol 1997;8:123-41.
   11. Gross GE. & Barrasso R. Humman Papilloma Virus Infection. A Clinical Atlas.1997