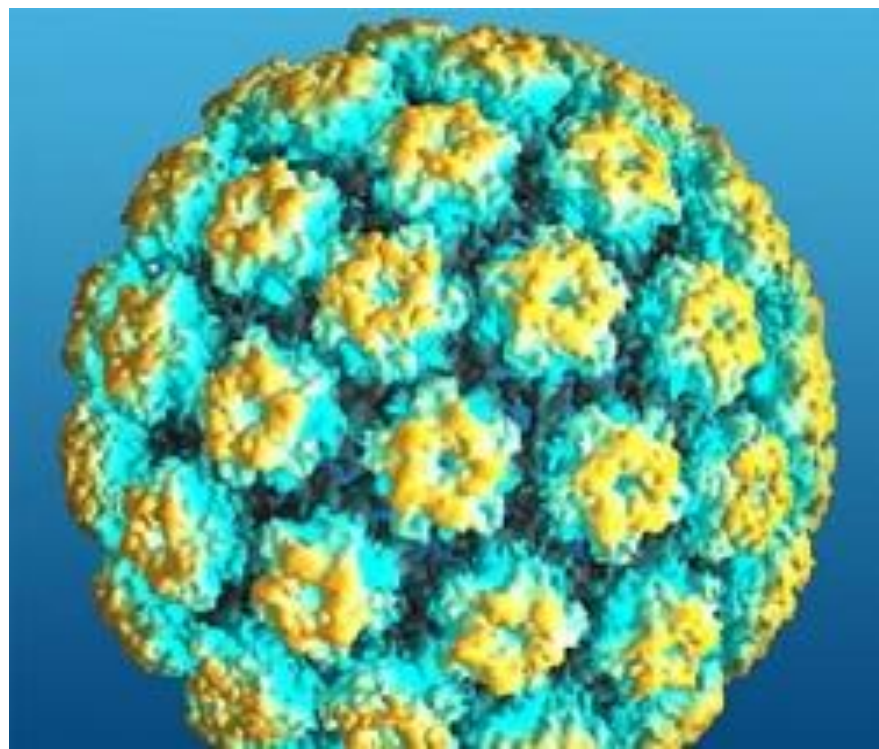


ПЦР в диагностике папилломавирусной инфекции и рака шейки матки



- **Вирус папилломы человека (ВПЧ)** - группа ДНК–содержащих вирусов с двухцепочечной ДНК
- ВПЧ довольно мелкий, его двунитевая кольцевая ДНК заключена в белковую оболочку – капсид
- Более 130 различных типов ВПЧ, из них более 30 могут вызывать различные поражения половых органов
- 2 основных типа ВПЧ: **высокоонкогенного** и **низкоонкогенного** риска:
 - ✓ В первую группу входят вирусы, приводящие к возникновению раковой опухоли
 - ✓ Вторую группу составляют вирусы, вызывающие доброкачественные поражения шейки матки и кондиломы

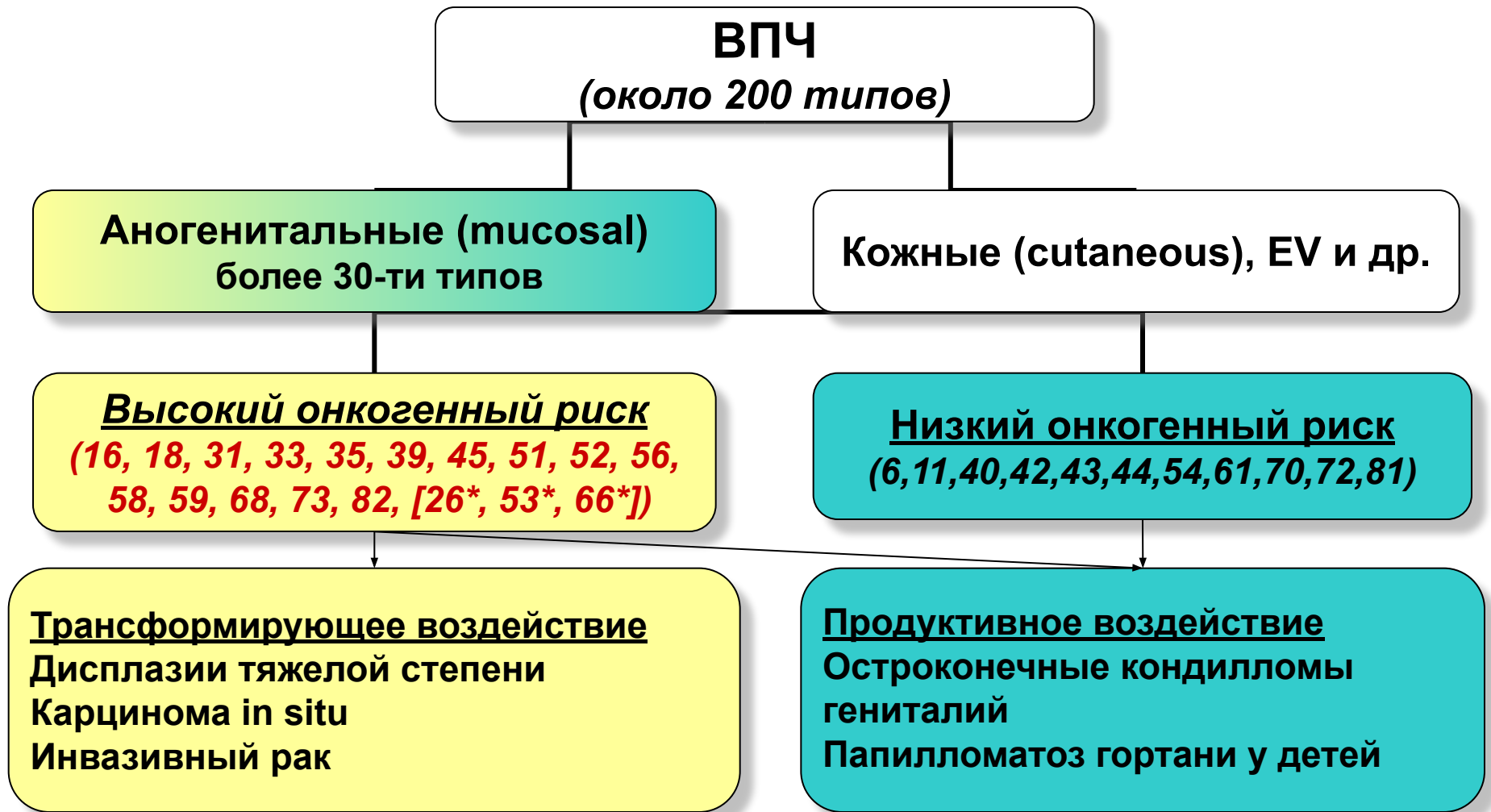
- Вирус папилломы человека (ВПЧ) является основной причиной рака шейки матки (РШМ)¹
- В случаях тяжелой дисплазии и РШМ ВПЧ выявляется почти в **100% случаев**²
- Выявление ВПЧ ассоциировано минимум с **250-кратным** увеличением риска развития тяжелой дисплазии³

1 – Всемирная организация здравоохранения, International Agency for Research on Cancer (IARC WHO)

2 - Walboomers JM, J. Pathology, 1999; Munoz N, N Engl. J Med, 2003

3 – Liaw K-I, J. Natl. Cancer Inst., 1999

Эпидемиологическая классификация ВПЧ



Инфицированность населения

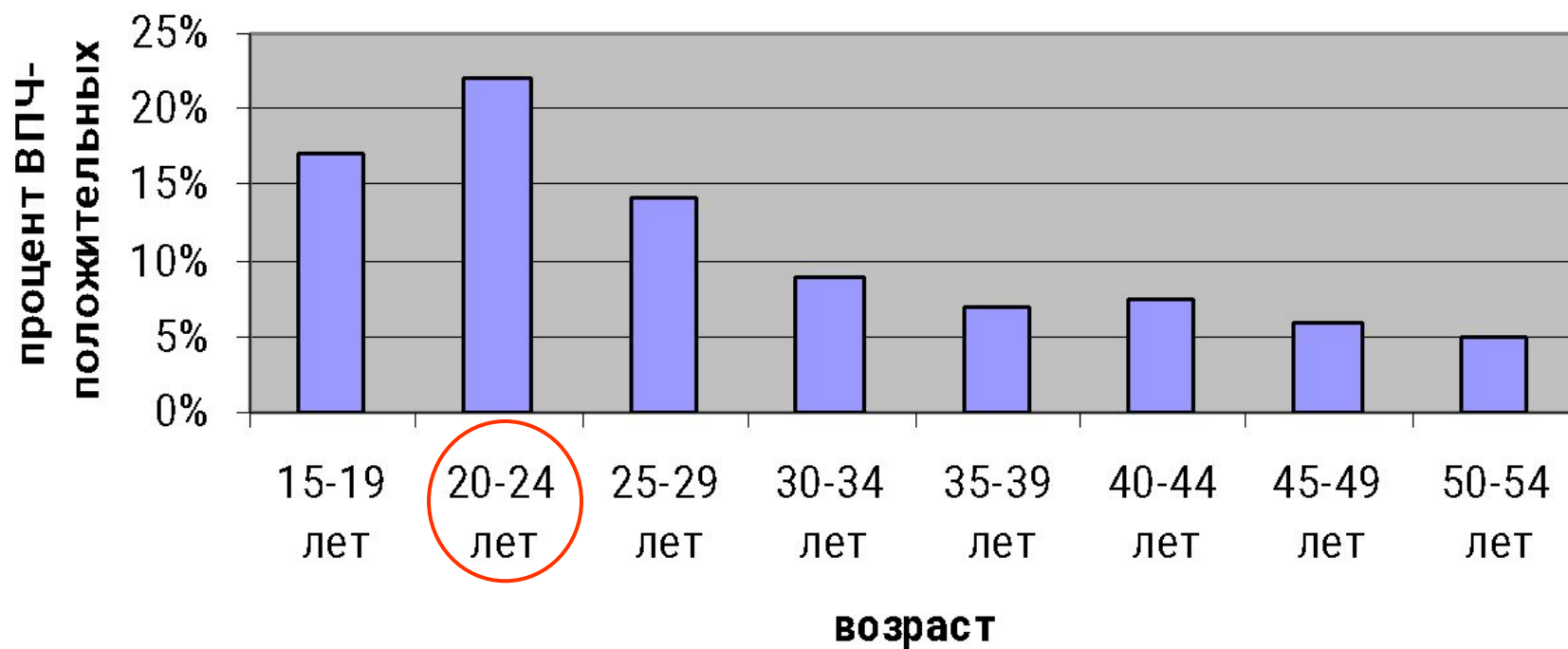
Распространенность ВПЧ обусловлена социально-экономическими, поведенческими, медико-гигиеническими условиями

- Испания – 5%
- Норвегия – 15,4%
- Бразилия – 17,0%
- Гондурас – 40,0%
- Япония – 10,7%

РФ - 15-34% (женщин общей популяции)
- 44,9% (женщин, обследуемых на наличие ЗППП)

Наибольшая частота инфицирования ВПЧ отмечается у женщин более молодого возраста.

Распространенность ВПЧ высокого риска у женщин разных возрастных групп



Пути передачи ВПЧ

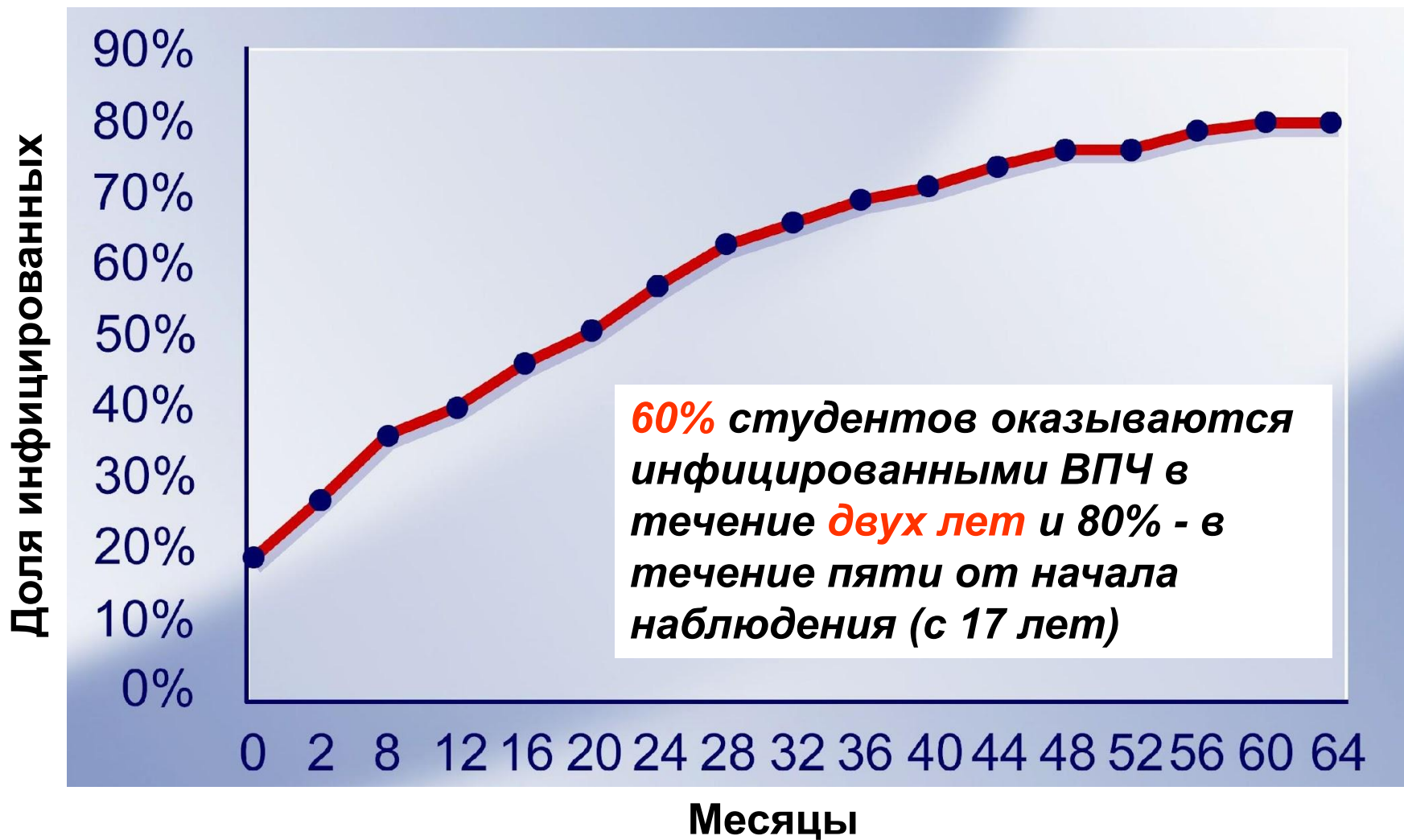
- Непосредственный контакт с инфицированным участком кожи или слизистых
- Генитальные типы ВПЧ передаются только половым путем (не обнаруживаются у девственниц)
- При прохождении через родовые пути ВПЧ передается новорожденному, вызывая у него впоследствии папилломатоз гортани (преимущественно 6 и 11 типы низкого риска)

Инфицирование ВПЧ в зависимости от половой активности

Риск инфицирования ВПЧ среди 100 девственниц, начавших сексуальную активность в период наблюдения (2 года) (S. Kruger, 2001)

Число половых партнеров	Численность группы	% ДНК ВПЧ (+)	OR
1	38	21.1	1.0
2	16	44.8	2.9
>3	11	63.6	6.7

Приобретение “ВПЧ-позитивности”



Winer 2003 Am J Epidem, ASCCP Education Program

Заболевания, ассоциированные с высокоонкогенными типами ВПЧ

1. Рак шейки матки – 100%
2. Рак заднего прохода – 90%
3. Рак влагалища и вульвы – 40%
4. Рак полового члена – 40%
5. Рак ротоглотки – 12%
6. Рак ротовой полости – 3%

*Walboomers JM, J. Pathology, 1999,
Parkin M, 22nd IPV Conference, 2005*

Рак шейки матки

- РШМ занимает **1-е место** среди причин женской смертности в развивающихся странах
- РШМ занимает **2-е место** после рака молочной железы по распространенности среди женщин в мире

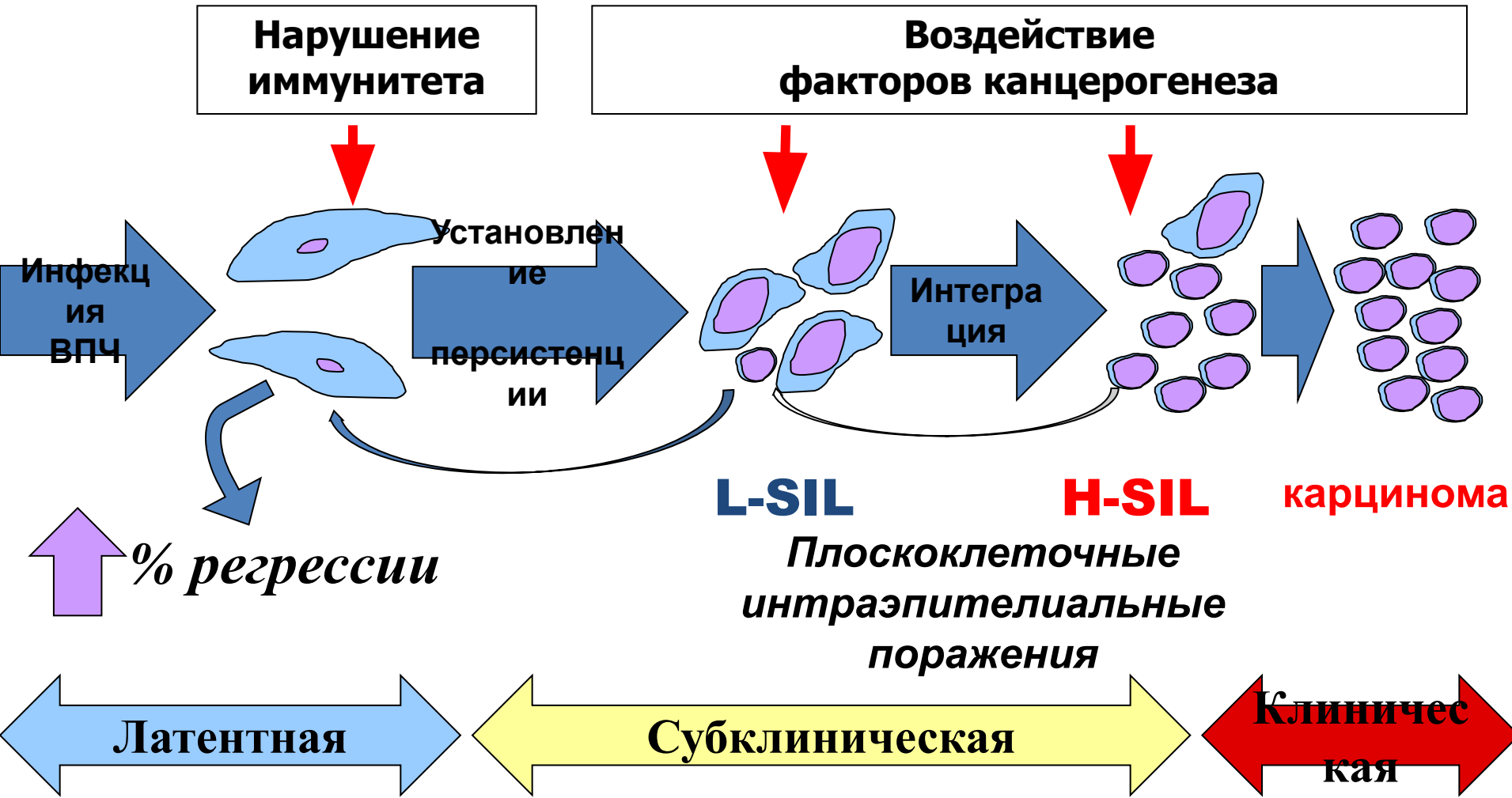
250 тысяч смертей ежегодно

Рак шейки матки

- В **Европе** регистрируется более 25 тысяч новых случаев РШМ и 12 тысяч смертей в год
- В **России** ежегодно регистрируют 12,3 тысячи новых случаев РШМ и более 6 тысяч пациенток ежегодно умирает¹
- За последние 10 лет **средний возраст заболевших снизился** с 58 до 55 лет²
- у женщин до 29 лет **заболеваемость выросла в 2 раза**²

1 – Black RJ, Eur J Cancer, 1997; 2 – Аксель Е.М., Давыдов М.И., 2002. «Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000 году».

Этапы развития рака шейки матки



ВПЧ – основной этиологический агент РШМ

- ВПЧ обнаруживается почти в **100%** случаев РШМ, более чем в 95% случаев обнаруживаются типы ВПЧ высокого канцерогенного риска

Стадии папилломавирусной инфекции, методы диагностики и лечения

<u>Стадии ПВИ</u>	<u>Проявления</u>	<u>Методы диагностики</u>	<u>Лечение</u>
Латентная	Инфекция ВПЧ	<i>Выявление ДНК ВПЧ</i>	Нет, попытки применять иммуномодул-ры
Субклини- ческая	кондиломы Дисплазии Карцинома in situ	Кольпоскопия, цитология, гистология, <i>Выявл. ДНК ВПЧ</i>	Удаление пораженного <u>эпителия</u>
Клиническая	Инвазивный рак	Осмотр врача, кольпоскопия, гистология, <i>Выявл. ДНК ВПЧ</i>	Удаление пораженного <u>органа</u> , лечение отдаленных последствий

**Нужно ли выявлять вирус
или достаточно
использовать другие
методы, непосредственно
выявляющие предраковые
изменения?**

Ключевые вопросы о ВПЧ-тестировании

- **«Для чего нужны ВПЧ-тесты?»**
Задачи молекулярной диагностики папилломавирусной инфекции
- **«Как трактовать результат ВПЧ-теста?»**
Рекомендованные алгоритмы диагностики
- **«Какие ВПЧ-тесты использовать?»**
Современные требования к ВПЧ-тестам
- **«Как правильно получать и обрабатывать материал для ВПЧ-тестирования?»**

Классическая схема выявления онкологической патологии шейки матки

Цитология (РАР)



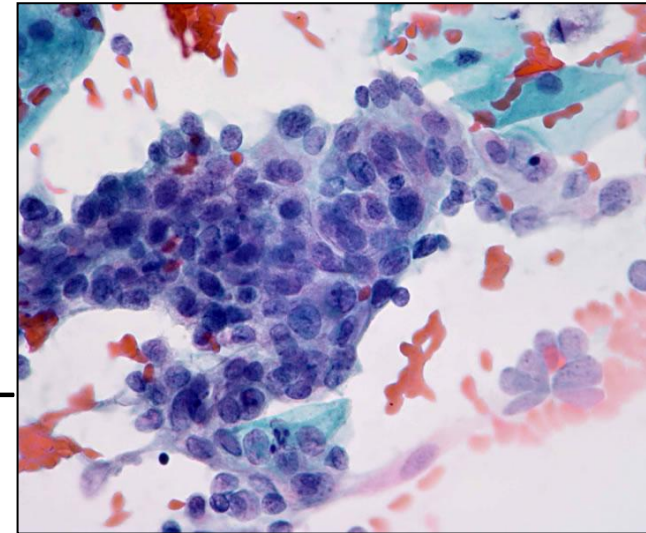
Кольпоскопия +
гистология

Метод
первичного
скрининга

Вторичные
(подтверждающие)
методы

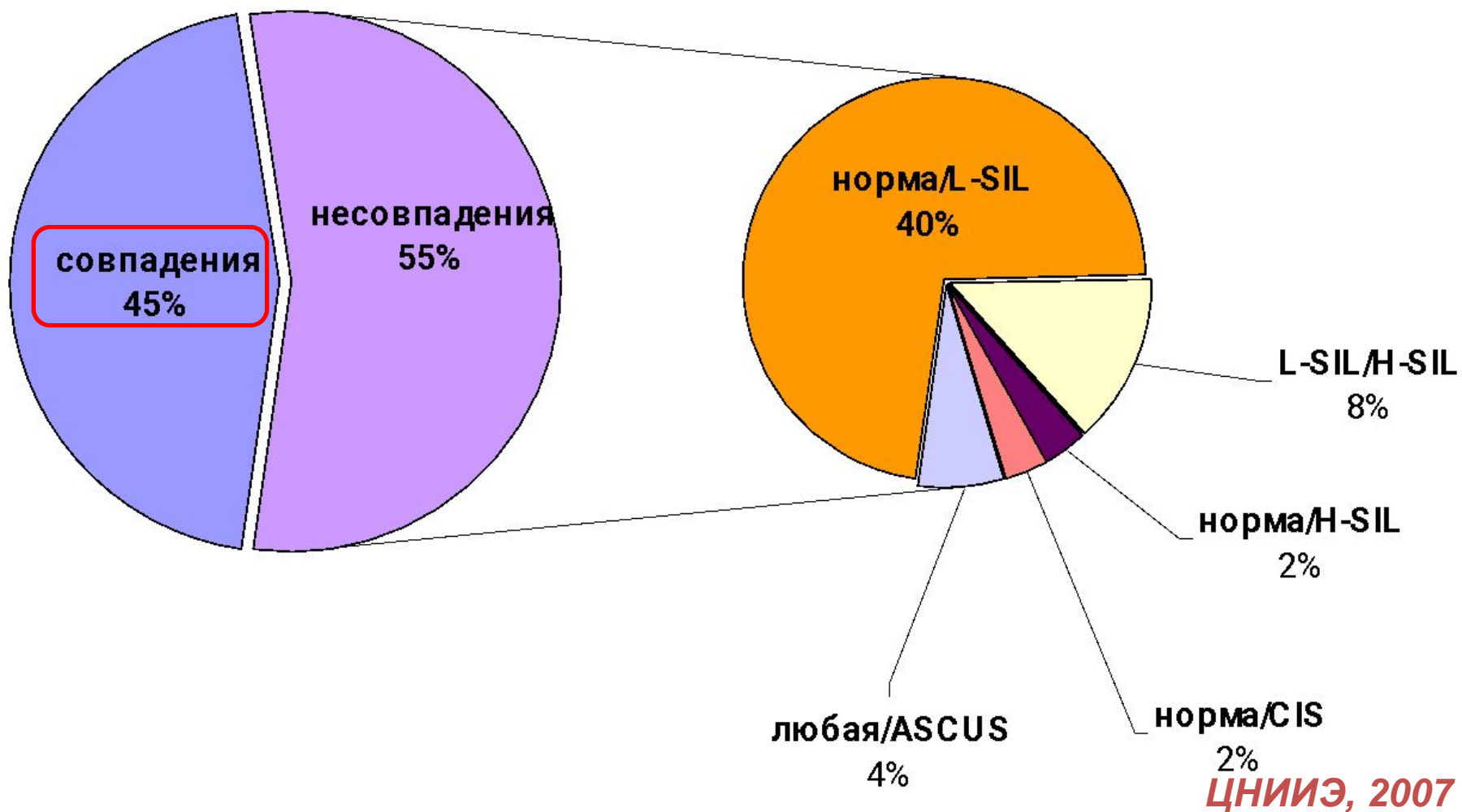
Цитология

- Простота исполнения – *нет*
- Объективность трактовки – *нет*
- Стандартизированность – *нет*
- Воспроизводимость – *от 11% до 80% между лабораториями*
- Доля сомнительных результатов, требующих повторных исследований – *до 15% (ASCUS, ASC-H)*
- **Чувствительность ~40%-70%**
- **Предиктивность отрицательного результата – *низкая, требуются частые повторы исследования – не реже раза в год***



McCrorry D., 2002; Wright T., 2004

Воспроизводимость цитологии



ЦНИИЭ, 2007

Ошибки дополнительных скрининговых методов: *кольпоскопическое обследование*

- Кольпоскопическое обследование (без дополнительных методов) может выявить дисплазию эпителия шейки матки только в **2/3** случаев
- Около **50%** результатов кольпоскопических исследований могут являться ложноположительными
- Около **25%** тяжелых поражений эпителия при кольпоскопическом исследовании классифицируются как легкие
- Низкая чувствительность при контроле лечения дисплазии
- Врач должен провести не менее 200 кольпоскопий под наблюдением высоко квалифицированного врача-кольпоскописта, чтобы начать самостоятельный кольпоскопический осмотр шейки матки

Buxton, 1991; Skehan, 1990; Denny, 1995, Березовская Е.П.

Ошибки дополнительных скрининговых методов: *гистологическое исследование*

- Ложноотрицательные результаты **гистологических** исследований биопсийного материала (взятого в процессе кольпоскопического исследования) могут достигать **15%**

Buxton, 1991; Skehan, 1990; Denny, 1995

Альтернативная схема выявления онкологической патологии шейки матки

ВПЧ-тест + Цитология



Кольпоскопия +
гистология

Методы
первичного
скрининга

Вторичные
(подтверждающие)
методы

Для женщин старше 25-30 лет

American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer

Debbie Saslow, PhD¹; Diane Solomon, MD²; Herschel W. Lawson, MD³; Maureen Killackey, MD⁴; Shalini L. Kulasingam, PhD⁵; Joanna Cain, MD⁶; Francisco A. R. Garcia, MD, MPH⁷; Ann T. Moriarty, MD⁸; Alan G. Waxman, MD, MPH⁹; David C. Wilbur, MD¹⁰; Nicolas Wentzensen, MD, PhD, MS¹¹; Levi S. Downs, Jr, MD¹²; Mark Spitzer, MD¹³; Anna-Barbara Moscicki, MD¹⁴; Eduardo L. Franco, DrPH¹⁵; Mark H. Stoler, MD¹⁶; Mark Schiffman, MD¹⁷; Philip E. Castle, PhD, MPH^{18,*}; Evan R. Myers, MD, MPH^{19,*}; the ACS-ASCCP-ASCP Cervical Cancer Guideline Committee²⁰

An update to the American Cancer Society (ACS) guideline regarding screening for the early detection of cervical precancerous lesions and cancer is presented. The guidelines are based on a systematic evidence review, contributions from 6 working groups, and a recent symposium cosponsored by the ACS, the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and the American Society for Clinical Pathology, which was attended by 25 organizations. The new screening recommendations address age-appropriate screening strategies, including the use of cytology and high-risk human papillomavirus (HPV) testing, follow-up (eg, the management of screen positives and screening intervals for screen negatives) of women after screening, the age at which to exit screening, future considerations regarding HPV testing alone as a primary screening approach, and screening strategies for women vaccinated against HPV16 and HPV18 infections. CA Cancer J Clin 2012;62:147-172. © 2012 American Cancer Society.

Цитология — каждые **3** года с 21 до 29 лет

ВПЧ-тест + цитология — каждые **5** лет с 30 до 65 возраста

Тест на ДНК ВПЧ и скрининг

Совместное применение цитологических исследований и тестов на ДНК ВПЧ позволяет значительно **повысить эффективность скрининга:**

- Повышение чувствительности до **99-100%**¹
- Удлинение сроков повторного исследования с 1-3 до **5-7** лет²
- Значительное снижение затрат³

1 – Petry KU, BJC(2003)

2 – ASC Guideline, Saslow D., CA Cancer J Clin (2002);
IARC Handbook of Cancer, Vol.10, (2005)

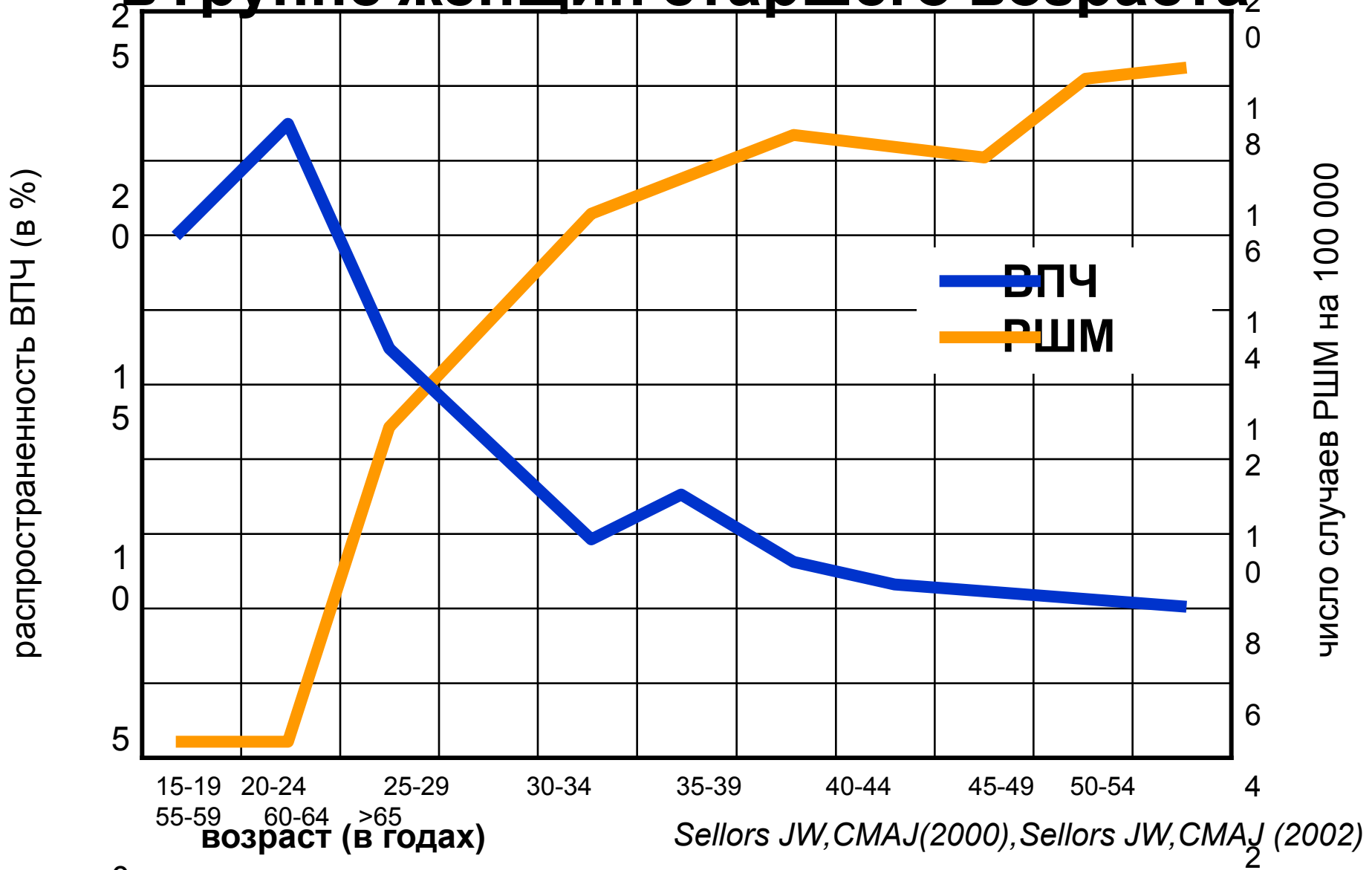
3 – Kim JJ, JAMA (2002); Mandelblatt JS, JAMA (2002)

**Будет ли ВПЧ-тест достаточно
специфичен, если 4 из 5
инфицированных женщин
спонтанно излечиваются в
течение 12 месяцев?**

**(высокий процент транзиторной инфекции
в первые 9-15 месяцев)**

Диагностическая ценность ВПЧ-теста ВЫШЕ

в группе женщин старшего возраста



Необходимым условием проведения ВПЧ-тестирования является введение возрастных ограничений

- Начиная с 25-30 летнего возраста
- Через 7-10 лет после вступления в половую жизнь

Диагностические характеристики ВПЧ теста и цитологии

	HPV тест	Цитология
Чувствительность	88-98%	51-86%
Специфичность	83-94%	92-99%

Типы ВПЧ низкого онкогенного риска

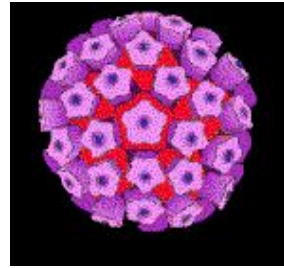
Оказывают только продуктивное воздействие – инфекция относительно безопасна

- На **латентной стадии** инфекции выявление вируса **не оправдано**, так как:
 - высока вероятность самостоятельного излечения
 - отсутствует эффективная терапия латентной инфекции
- На стадии **клинических проявлений** инфекции может потребоваться дифференциальная диагностика с «непапилломавирусными» заболеваниями
- Существует риск передачи вируса ребенку при прохождении через родовые пути с последующим развитием папилломатоза гортани

Задачи молекулярной диагностики ВПЧ низкого онкогенного риска

- Дифференциальная диагностика с заболеваниями не папилломавирусной этиологии (наряду с высокоонкогенными ВПЧ)
- Определение группы риска по развитию папилломатоза гортани у детей (более 95% генотипы 6 и 11)

Ключевые вопросы о ВПЧ-тестировании

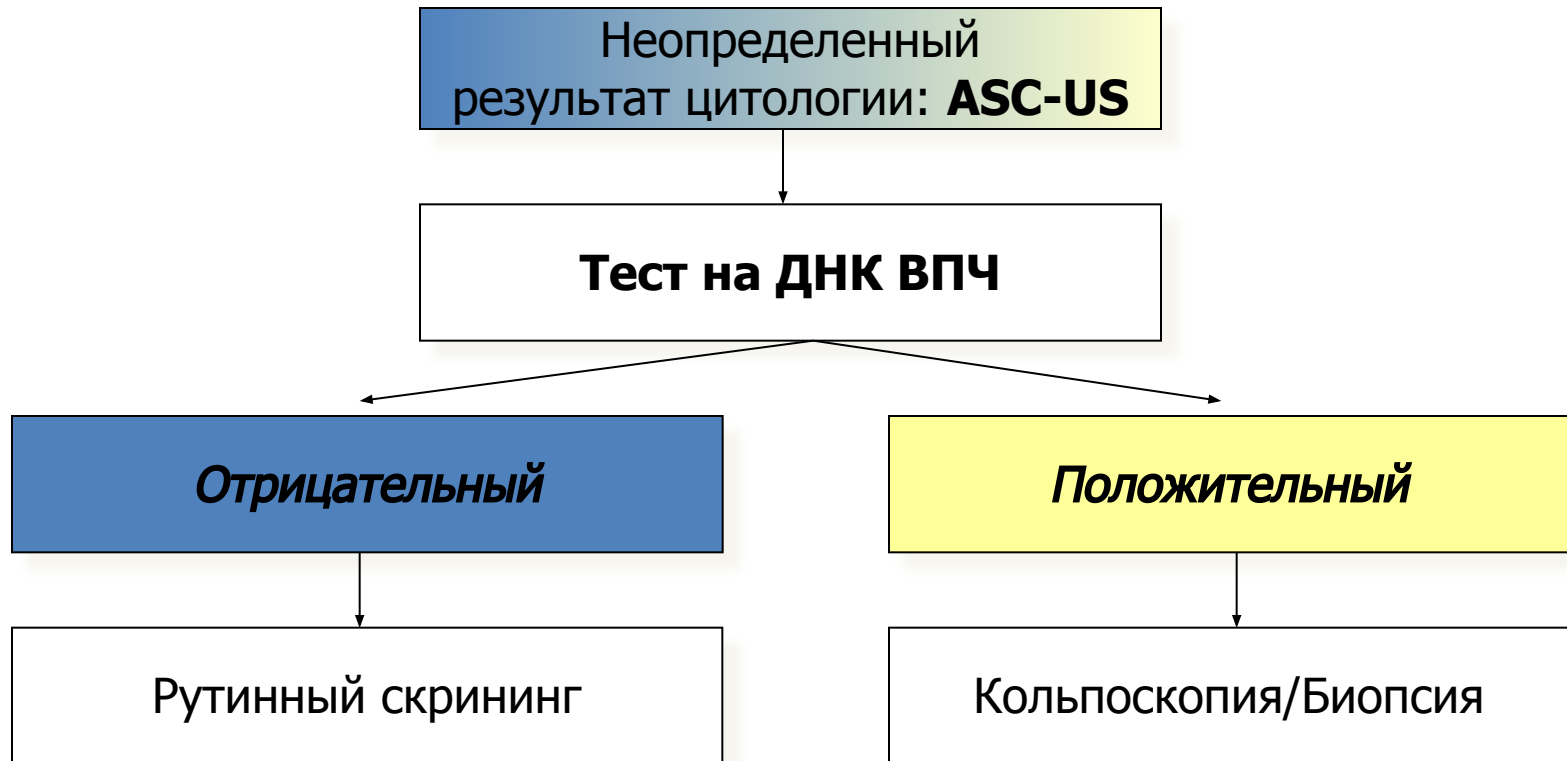


- *«Для чего нужны ВПЧ-тесты?»*
Задачи молекулярной диагностики папилломавирусной инфекции
- **«Как трактовать результат ВПЧ-теста?»**
Рекомендованные алгоритмы диагностики

Тест на ДНК ВПЧ рекомендован...

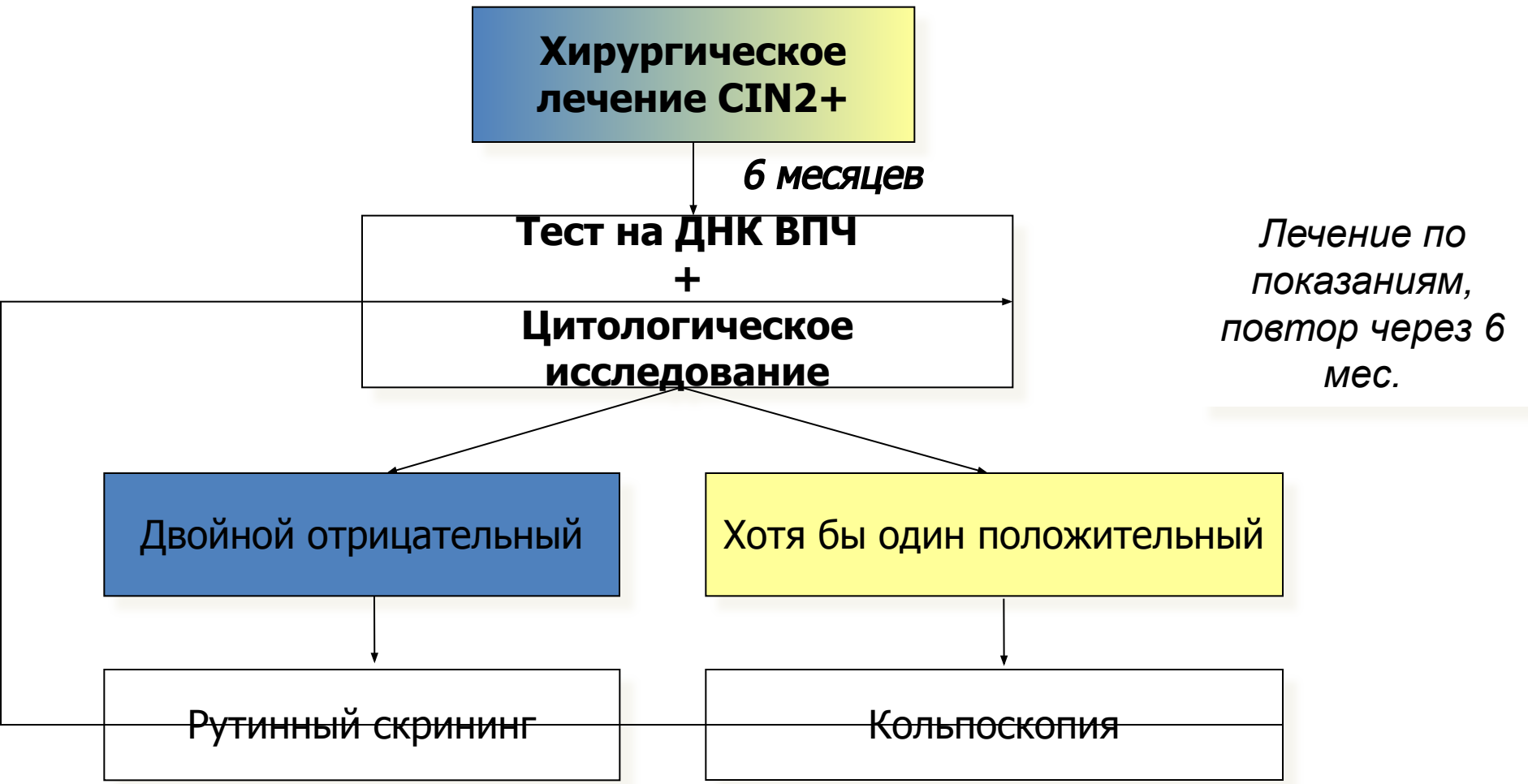
- ✓ ... менеджмент женщин с изменениями неопределенной значимости (ASC-US ASC-H)
- ✓ ... разрешения дискордантных результатов цитологии и кольпоскопии
- ✓ ... для мониторинга терапии CIN2+
- ✓ ... как первичный скрининговый метод совместно с цитологией для женщин старше 25-35 лет
- ✓ ... на первом этапе скрининга перед цитологическим исследованием для стран, где плохо организованы программы цервикального цитологического скрининга для женщин старше 25-35 лет

Алгоритм ведения пациенток с ASC-US с применением теста на ДНК ВПЧ



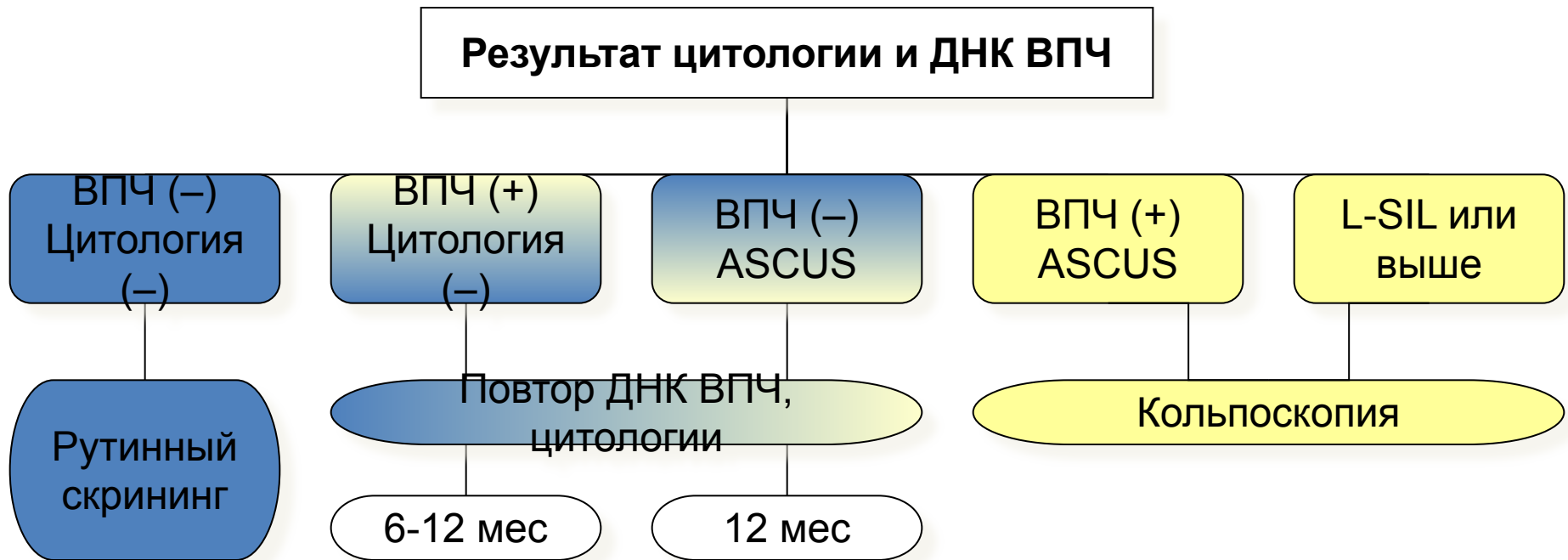
ASCCP Guidance, Wright TC, 2001

Мониторинг терапии CIN2+ с применением теста на ДНК ВПЧ



ASCCP Guidance, Wright TC, 2001

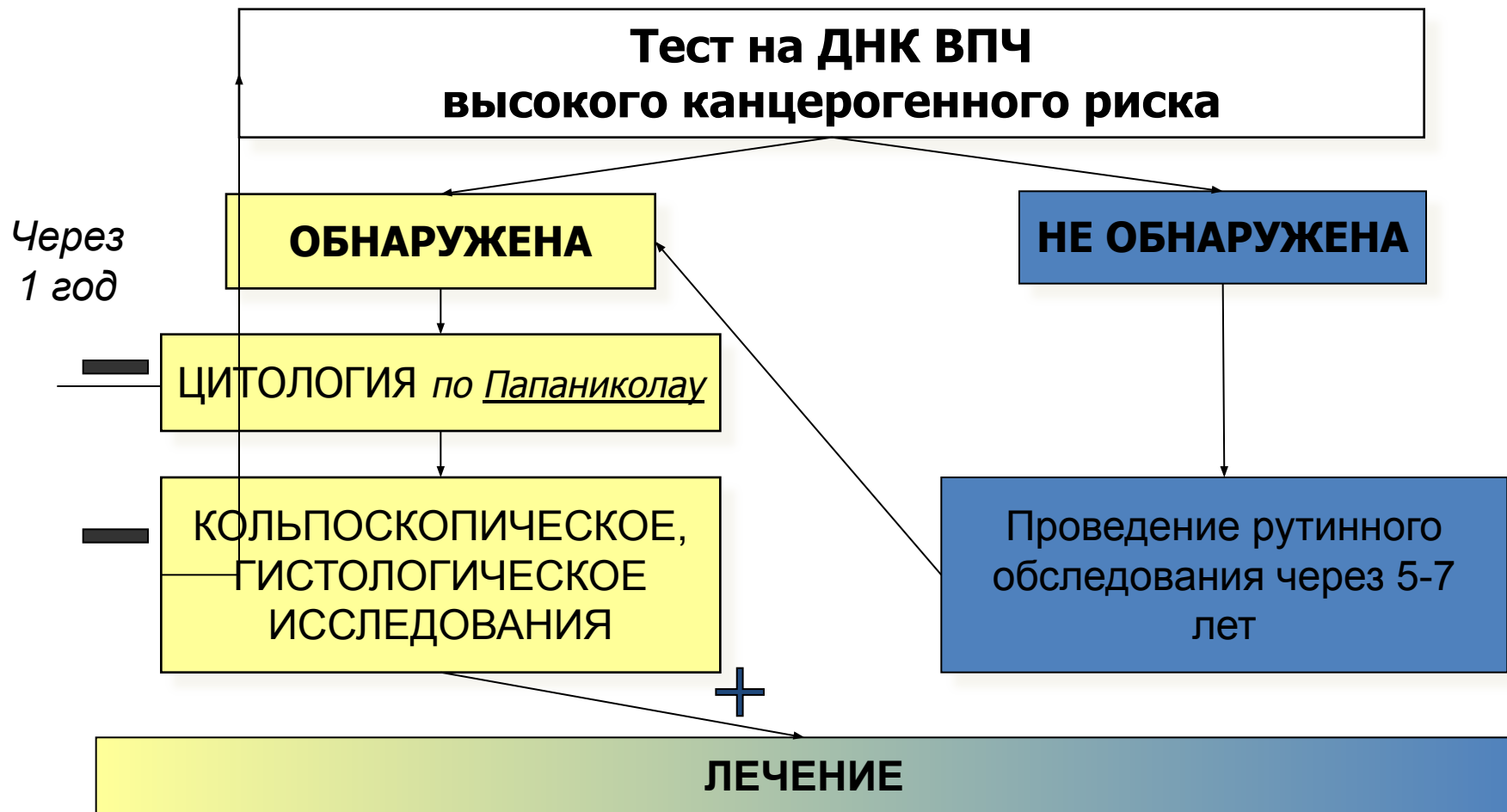
Руководство ASCCP по использованию ВПЧ-теста в дополнение к цитологии



Для женщин старше 30 лет

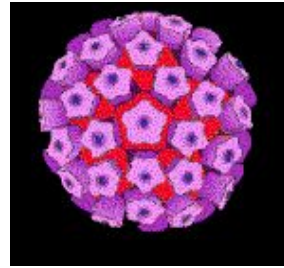
American Society of Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) Interim Guidance on the use of HPV DNA testing as an adjunct to cervical cytology. Wright TC, Obstetr Gynecol 2004; 103: 304-9

Схема скринингового обследования на основе ВПЧ-теста



J. Cuzick, 2003, 2006

Ключевые вопросы о ВПЧ-тестировании

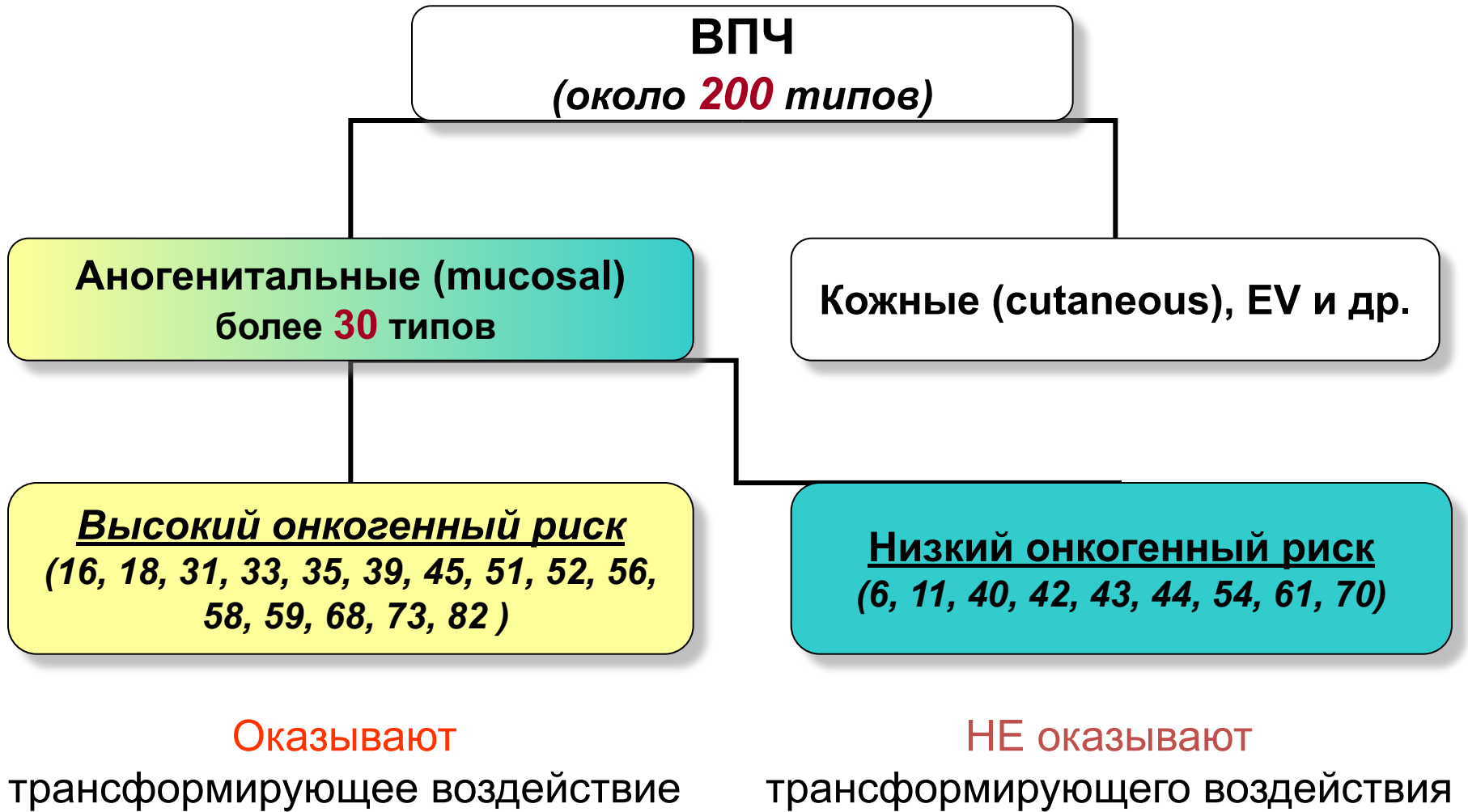


- *«Для чего нужны ВПЧ-тесты?»*
Задачи молекулярной диагностики папилломавирусной инфекции
- *«Как трактовать результат ВПЧ-теста?»*
Рекомендованные алгоритмы диагностики
- **«Какие ВПЧ-тесты использовать?»**
Современные требования к ВПЧ-тестам

Требования к ВПЧ-тестированию

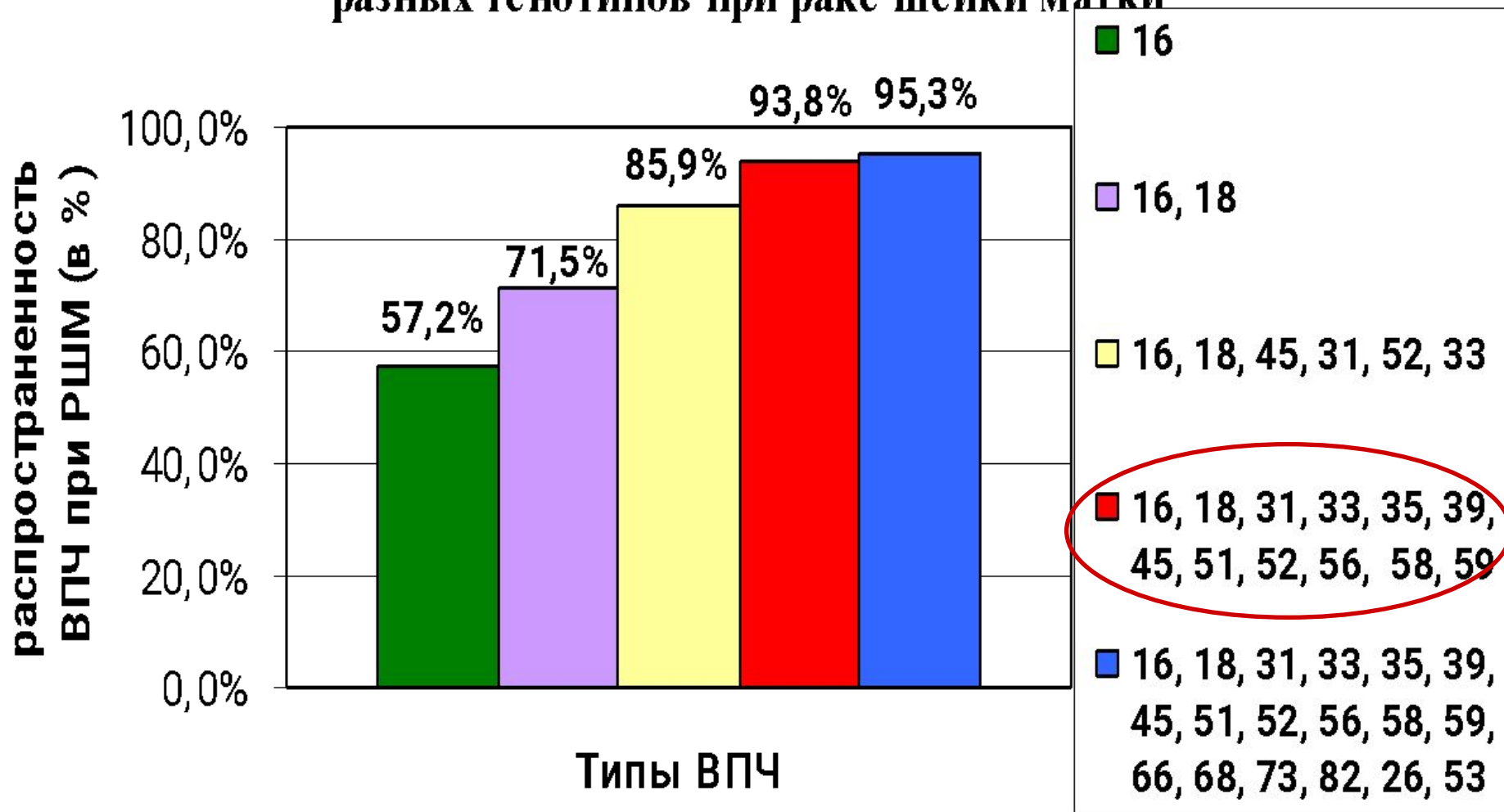
1. Введение возрастных ограничений
2. Четкое дифференцирование типов высокого и низкого онкогенного риска
3. Выявление **широкого спектра** типов высокоонкогенных ВПЧ (более 10 генотипов)
4. Ведение порогов клинической значимости **количества** вируса
5. Клиническая валидация теста

Классификация ВПЧ

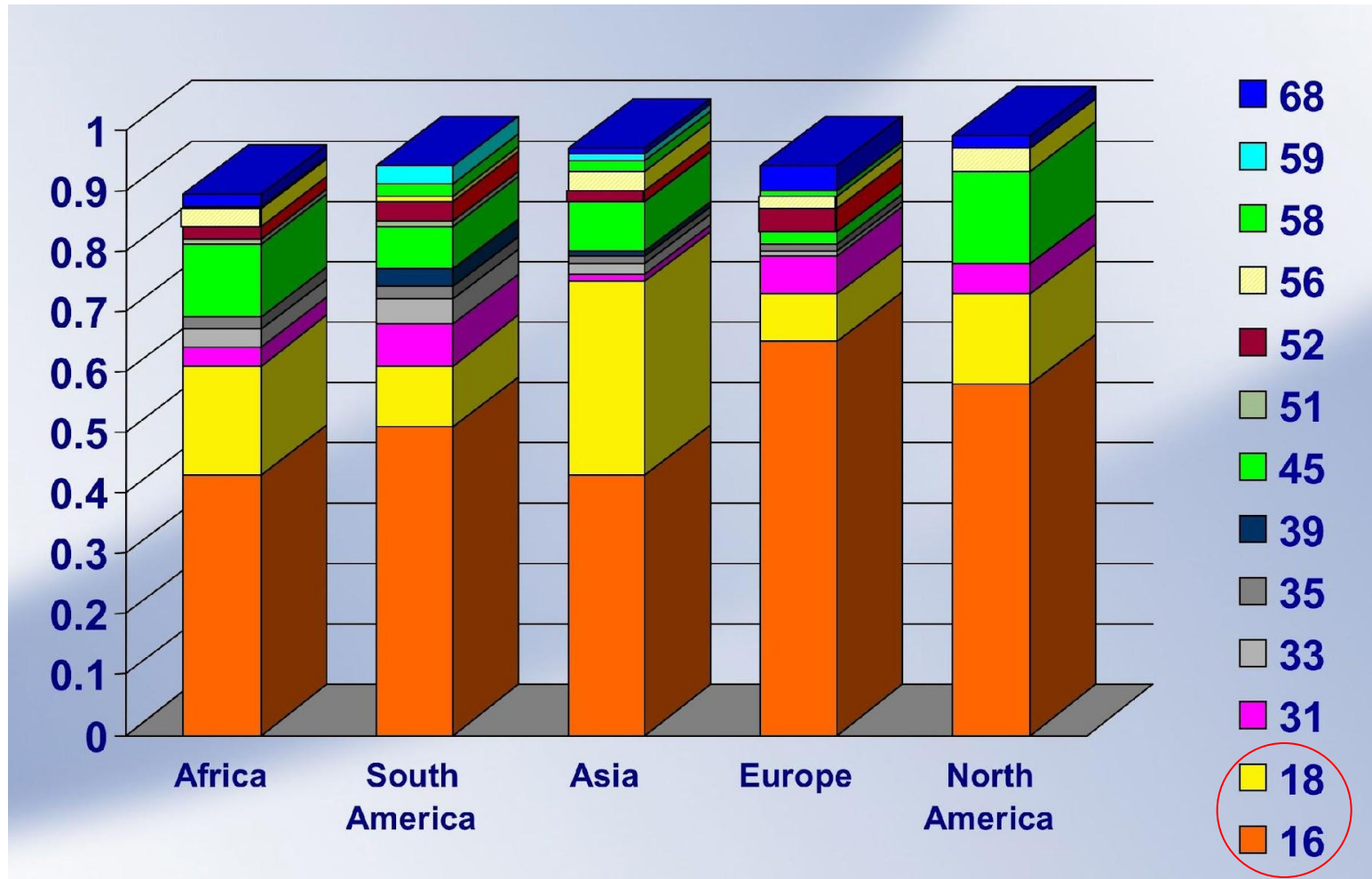


Какие типы необходимо выявлять?

Кумулятивный показатель распространенности ВПЧ разных генотипов при раке шейки матки

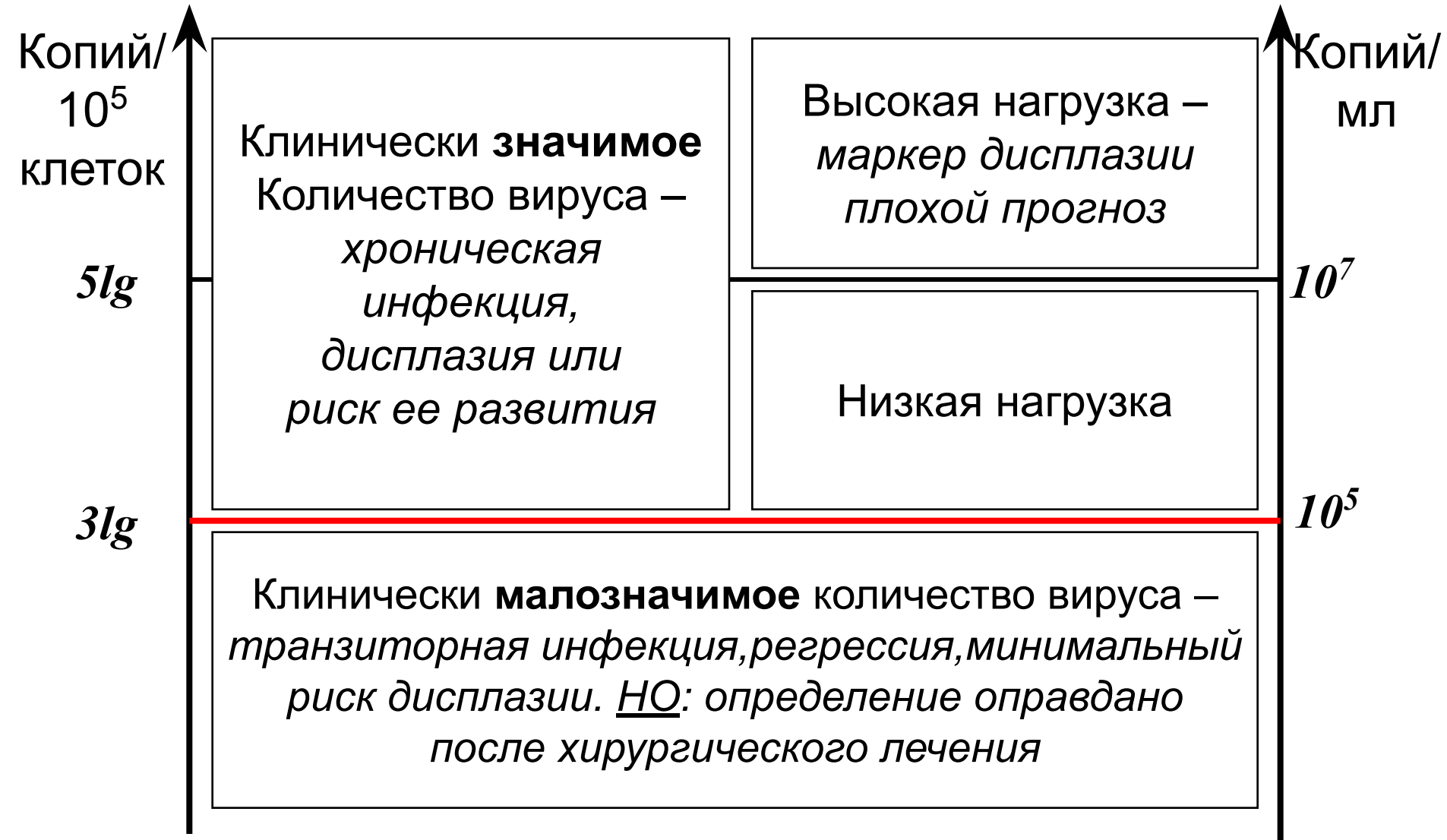


Различные генотипы ВПЧ в РШМ



ASCCP Education Program

Вирусная нагрузка в диагностике ВПЧ-инфекции



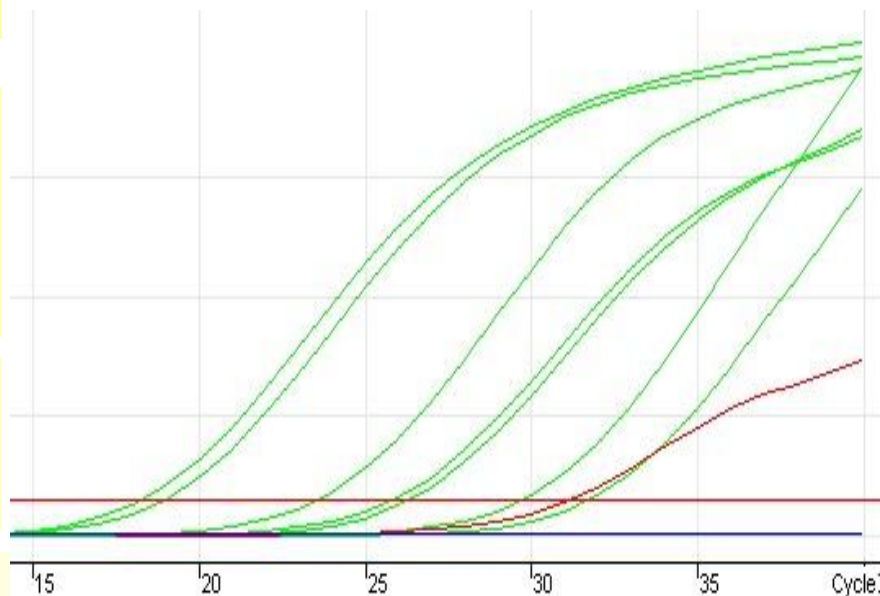
Методика количественного определения ДНК ВПЧ (ПЦР в реальном времени)

Несколько генотипов ВПЧ
высокого риска: разные
панели

Одновременно измеряется
количество ВПЧ и клеток
человека в образце

Нормализация количества
ВПЧ на количество клеток

Диапазон измерений от 10^3
до 10^9 ДНК ВПЧ в мл



Необходимость генотипирования

- Большая вероятность персистентной инфекции при инфицировании несколькими генотипами ВПЧ
- Возможность отличить персистирующую инфекцию от реинфекции

Динамический маркер ВПЧ-инфекции

- *Снижение вирусной нагрузки* более чем на 1 lg за 6 месяцев может являться отражением:
 - транзиторного течения инфекции
 - после хирургического лечения CIN2+ – благоприятного прогноза излечения

Сравнение ПЦР «Real-time» и *Digene*[®] HPV Test

Параметр	Digene [®] Test («гибридный захват»)	ПЦР «Real-time»
Измерение концентрации	Примерная оценка по <u>условной шкале</u>	Измерение <u>реального</u> числа копий вируса в образце
Порог измерений	>10 ⁵ копий/мл, <u>только</u> клинически значимые количества ВПЧ	>10 ³ копий/мл, выявляет и <u>дифференцирует</u> значимые и незначимые количества
Нормализация на клетки человека	Не проводится, нет контроля качества взятия материала	Проводится
Перекрестные реакции на типы низкого риска	Есть	Отсутствуют

Алгоритм использования ВПЧ-тестов зависит от задачи

- ✓ Как самостоятельный тест при первичном скрининге
- ✓ В сочетании с цитологическим исследованием при профилактических осмотрах (диспансеризации)
- ✓ Диагностика патологий шейки матки
- ✓ Разрешение дискордантных результатов цитологии и кольпоскопии
- ✓ Мониторинг терапии предраковых заболеваний CIN2+

Готовность лабораторий качественно выполнять ВПЧ-тест

Качество выполнения исследований оценивается косвенно по количеству ошибок и зависит от:

- ✓ Качества выбранной тест-системы
- ✓ Оборудования
- ✓ Квалификации персонала
- ✓ Организации лаборатории

Качество выполнения лабораторных исследований должно постоянно контролироваться:

- ✓ Внутренний лабораторный контроль качества
- ✓ Внешний лабораторный контроль качества

Готовность медперсонала правильно использовать ВПЧ-тест

Преаналитический этап:

- ✓ Необходимым условием проведения ВПЧ-тестирования в скрининге является введение возрастных ограничений
- ✓ Качество взятия клинического материала

Постаналитический этап:

- ✓ Интерпретировать результаты и разъяснить пациентке их значение
- ✓ Направлять на консультацию к специалисту (гинекологу) при положительном результате
- ✓ Назначать необходимые дополнительные исследования согласно рекомендованному алгоритму

Качество взятия клинического материала

- ВПЧ – внутриклеточный агент. Только наличие достаточного количества клеток в образце обеспечивает **достоверность результатов выявления ВПЧ**. Контроль качества взятия образца используется во всех современных ВПЧ-тестах основанных на МАНК:

Amplicor HPV test, Cobas TaqMan HPV (Roche)

HPV Real-Time PCR (Abbott)

BD HPV test (BD)

PreTect HPV-Proofer (NorChip)

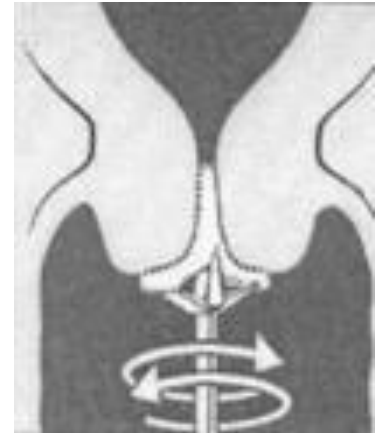
APTIMA (Gen-Probe)

А также во всех ВПЧ-тестах:

АмплиСенс (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии)

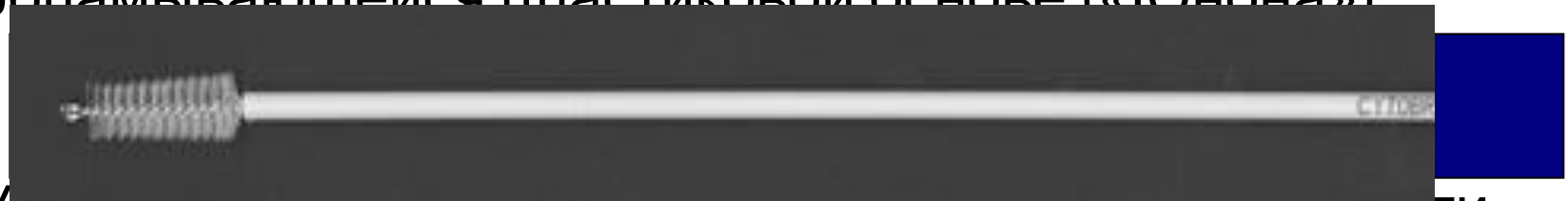
Локализация поражений ВПЧ высокого онкогенного риска

- Материал (соскоб эпителиальных клеток) берется из цервикального канала и зоны трансформации шейки матки – точно также, как и для онкоцитологии



От чего зависит качество взятия материала для ВПЧ-теста?

- Использовать только рекомендованные одноразовые инструменты
- Цервикальная цитощетка (эндо-цервикс) на легко обламывающейся пластиковой основе («Юнона»)



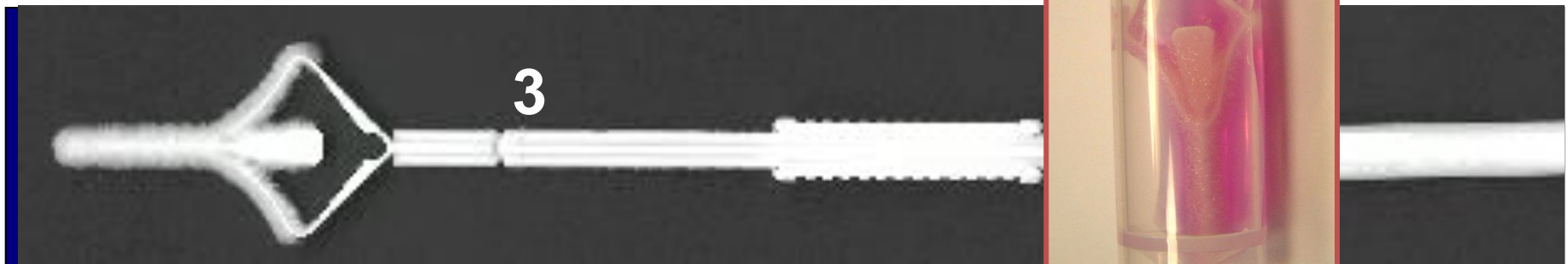
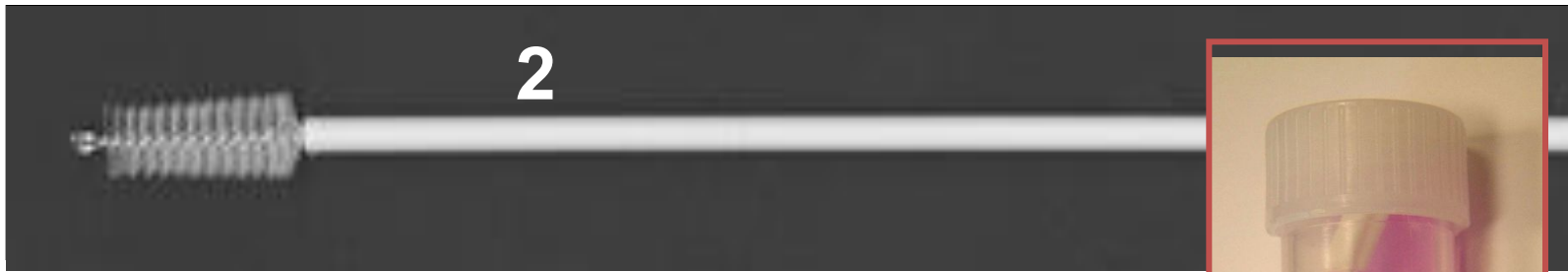
- Удалить слизь и выделения влажной салфеткой с поверхности шейки матки
- Использовать транспортные среды, рекомендованные производителем ВПЧ-теста
- Если оставлять рабочую часть цитощетки в транспортной среде – обламывать, не обрезать
- Категорически **запрещается** обрезать цитощетку ножницами (!!!)



Инструментарий



1. Цервикальная цитощетка и 15 мл среды для жидкостной цитологии
2. Эндоцервикальная цитощетка с насечкой в 0,5 мл транспортной среды
3. Экто/эндоцервикальная цитощетка в 2 мл транспортной среды



Анализ причин получения недостовверных результатов ВПЧ-теста

Доля неадекватных образцов
(с недостаточным количеством клеток),
полученных от женщин зависит от
способа взятия материала:



- 0% - использование комбинированной цитощетки к набору для жидкостной цитологии
- 3-5% - **правильное** использование цервикальной цитощетки
- 15-20% - неправильное использование цервикальной цитощетки
- 5-15% - **правильное** использование универсального зонда
- 20-25% - неправильное использование универсального зонда

Цервикальный скрининг в России

- В рамках профилактических осмотров
- Региональные скрининговые программы

■ **Опportunистический скрининг**

Приказ №103 Комитета здравоохранения г.Москвы от 05.03.2002 (используется ВПЧ-тест, но охват населения небольшой) утвердил подпрограмму «Целевая диспансеризация женского населения по выявлению заболеваний шейки матки» - скрининг женщин 35-69 лет с 3-х летним интервалом

На основе цитологического метода – низкая чувствительность
Низкий охват целевой группы

Проблема организованного скрининга в странах Западной Европы

- Значительная доля женщин не участвуют в скрининге, несмотря на приглашения по телефону, отказываются посещать смотровой кабинет для взятия цервикального мазка
- Женщины, не участвующие в скрининге составляют группу повышенного риска развития рака шейки матки
- Одним из решений этой проблемы может стать использование «самостоятельных мазков» для тестирования на ВПЧ

HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening: cohort study (BMJ, 2010)

Murat Go.k, research fellow,1 Danie.lle A M Heideman, molecular biologist,1 Folkert J van Kemenade, surgical pathologist,1 Johannes Berkhof, medical statistician,2 Lawrence Rozendaal, surgical pathologist,1 Johan W M Spruyt, gynaecologist,3 Feja Voorhorst, gynaecologist,1 Jeroen AMBelie.n, senior researcher,1 Milena Babovic., manager of regional screening organisation,4 Peter J F Snijders, medical biologist ,1 Chris J LMMeijer, surgical Pathologist1, Amsterdam, Netherlands

Папилломавирусная инфекция у мужчин

- Распространенность ВПЧ среди мужчин примерно равна распространенности среди женщин
- Спонтанная элиминация вируса - 80-90%
- Онкологические заболевания репродуктивной системы мужчин не ассоциированы с ВПЧ на 100%
- Папилломавирусная инфекция у гетеросексуальных мужчин, не относит их к группе риска развития карциномы

Папилломавирусная инфекция у MSM

- Высокая вероятность инфицирования высокоонкогенными ВПЧ эпителия заднего прохода (зона трансформации)
- Рак заднего прохода ассоциирован с ВПЧ более чем на 90%
- Наличие персистентной ВПЧ-инфекции относит пациента к группе риска

ВПЧ-тестирование у мужчин

- **Не рекомендуется** проводить ВПЧ-тестирование у гетеросексуальных мужчин в рамках диспансеризации, том числе при обследовании супружеских пар
- **Рекомендуется** проведение ВПЧ-тестирования у MSM с целью определения группы риска рака заднего прохода
- Рекомендуется для **дифференциальной диагностики** с заболеваниями непапилломавирусной природы при наличии клинической картины

***Благодарю за
внимание***