

УДК: 616-006.52-071:575.22

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СКРИНИНГОВОМ ИССЛЕДОВАНИИ В НИКОЛАЕВСКОЙ ОБЛАСТИ

Верко Н.П.¹, Литвиненко А.В.², Верба И.Н.², Шишко Е.Ю.³

¹*Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского, Украина*

²*Медицинский центр «VALEO», Николаев, Украина*

³*Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Украина*

E-mail: venapo@rambler.ru

В работе проанализирована частота встречаемости различных генотипов вируса папилломы человека у пациенток Николаевской области, определяемых методом полимеразной цепной реакции. Установлена достаточно высокая частота встречаемости вируса папилломы человека в клинических образцах. Наибольшую частоту имеют генотипы 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, сравнительно низкие показатели частоты встречаемости зарегистрированы для высококанцерогенного типа 16. Частота встречаемости различных генотипов папилломавирусной инфекции зависит от возраста и группы крови пациенток.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, полимеразная цепная реакция, Николаевская область, генотип.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мире отмечается общий рост инфицированности вирусом папилломы человека (ВПЧ), и папилломавирус рассматривается как основной этиологический фактор развития рака шейки матки [1]. Распространенность различных типов ВПЧ неодинакова в разных странах и даже регионах. Во многих странах проводятся организованные скрининговые исследования распространенности различных типов ВПЧ в популяции. В основе таких исследований лежит использование современных молекулярно-биологических методов, позволяющих установить факт инфицирования и провести генотипирование ВПЧ. Наиболее чувствительным из молекулярных методов исследования в настоящее время признана полимеразная цепная реакция (ПЦР) с типоспецифическими и видоспецифическими праймерами, позволяющая выявить вирусные последовательности в геноме пораженных клеток в 95-100% случаев [2]. Благодаря использованию полимеразной цепной реакции в настоящее время идентифицировано более 100 типов ВПЧ, подробно описаны более 70 типов, твердо установлен факт, что определенные типы ВПЧ могут инфицировать строго определенный вид эпителия и вызывать характерные изменения [1, 3]. Такие мероприятия позволили значительно улучшить эффективность диагностики папилломавирусной инфекции, снизить частоту онкологических заболеваний, а также оценить эффективность применения профилактических вакцин против ВПЧ-инфекции. В Украине такие исследования не проводились в виду отсутствия дорогостоящего оборудования и надежных тест-систем для генотипирования. В настоящее время в некоторых регионах Украины, в

частности в Николаевской области, появилось оборудование для проведения ПЦР-анализа и специальные тест-системы, позволяющие типировать вирусы папилломы человека высокого и низкого канцерогенного риска.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение частоты встречаемости различных генотипов вируса папилломы человека у пациенток Николаевской области методом полимеразной цепной реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено у 3328 пациенток в возрасте от 17 до 58 лет, проходивших обследование в медицинском центре «VALEO» (г. Николаев) в 2008-2010 г и получивших направление в лабораторию медицинского центра для уточнения диагноза или этиологии воспалительного процесса. Материалом для ПЦР-исследования служили соскобы из урогенитального тракта женщин. На первом этапе ПЦР-исследования проводили экстракцию ДНК из исследуемого материала. Для экстракции ДНК использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». На втором этапе проводили ПЦР-амплификацию. Для проведения реакции амплификации ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска использовали комплект реагентов «ПЦР-комплект», рассчитанный на выявление (без определения генотипа) ДНК ВПЧ 11 типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, с отдельным определением ДНК ВПЧ 16 типа. ПЦР-амплификацию проводили в автоматическом режиме на термоциклере «Терцик МС 202». Для ПЦР-амплификации использовали две смеси праймеров и зондов. ПЦР-смесь-1-FER ВПЧ-1 - для амплификации и детекции ДНК ВПЧ 16, 31, 35, 39 и 59 генотипов. Детекция 31,35, 39 и 59 генотипов осуществлялась по каналу FAM (канал «Специфика» в детекторе «Джин»), детекция 16 генотипа осуществлялась отдельно по каналу HEX/JOE (канал «ВК» в детекторе «Джин»). Детекция 18, 33, 45, 52, 58 и 67 генотипов осуществлялась по каналу FAM (Канал «Специфика» в детекторе «Джин»), детекция сигнала внутреннего контроля осуществлялась отдельно по каналу HEX/JOE (канал «ВК» в детекторе «Джин»). Для проведения анализа осуществлялась амплификация ДНК с ПЦР-смесями-1-FER ВПЧ-1 и ВПЧ-2. Результат считался положительным, если положительный сигнал регистрировался хотя бы с одной из ПЦР-смесей.

Продукты ПЦР-амплификации анализировали путем гибридационно-флуоресцентной детекции по «конечной точке» с помощью мультиканального роторного флуориметра «АЛА- ¼». Анализатор предназначен для оценки результатов ПЦР при использовании тест-систем, основанных на принципах флуоресцентной детекции.

Результаты ПЦР интерпретировали по следующим критериям с обозначением группы выявляемых ВПЧ-генотипов: не обнаружен ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР); обнаружен один или несколько ВПЧ ВКР (без типа 16) – группа ВПЧ 10; обнаружен наиболее канцерогенный ВПЧ типа 16 – группа Т16; обнаружен один или несколько ВПЧ ВКР в том числе 16 типа – группа ВПЧ 10+Т16.

Все пациентки с положительным ПЦР – результатом на ВПЧ были распределены на группы по возрастному признаку: I группа – 17-25 лет, II группа – 26-35 лет; III группа – 36-45 лет, IV группа - 46-58 лет.

Полученные результаты были обработаны с использованием программ: АЛА 1 Setup.exe., Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов генотипирования вируса папилломы человека показал, что частота встречаемости генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска достаточно высокая среди женского населения Николаевской области – 30% клинических образцов имели положительный ПЦР-результат. Наиболее высокой она была в 2009г, когда удельный вес общего количества положительных результатов ПЦР-анализа на ВПЧ составил 42%. Анализируя частоту встречаемости различных генотипов ВПЧ (табл. 1) обнаружили, что наиболее высокой она была для 10 выявляемых ВПЧ-генотипов (группа генотипов ВПЧ10) на протяжении анализируемых лет. Сравнительно низкие показатели частоты встречаемости зарегистрированы для типа 16 и комбинации генотипов (группа ВПЧ10+Т16). В 2008г и 2010г на долю ВПЧ10+Т16 приходилось 9% и 8% соответственно. Высококанцерогенный тип 16 выявлялся в 11% и 10% случаев в 2008г и 2010г. Самые низкие значения встречаемости данных генотипов зарегистрированы в 2008г. и 2010г.

Таблица 1
Количество образцов, в которых выявлены ДНК различных типов ВПЧ

года		Типы ВПЧ			
		ВПЧ10	ВПЧ10+Т16	Т16	Всего
2008	Абс.	184	22	27	233
	%	78,9	9,4	11,6	
2009	Абс.	486	78	107	671
	%	72,4	11,6	16	
2010	Абс.	82	9	10	101
	%	81,1	8,9	9,9	

В результате исследования выявлена зависимость между частотой встречаемости различных генотипов ВПЧ и возрастом пациенток (рис. 1). Чем моложе контингент обследуемых, тем выше частота встречаемости у них одного или нескольких из 10 ВПЧ-генотипов (группа ВПЧ10). Так, в возрастной группе 17-25 лет удельный вес генотипов ВПЧ10 составил: в 2008г 92%, в 2009г 80%, в 2010г 92%. С возрастом частота встречаемости генотипов ВПЧ10 несколько снижалась, однако, в возрастной группе 26-35 лет количество положительных результатов ПЦР-анализа на ВПЧ10 оставалось также высоким. В динамике частоты встречаемости высококанцерогенного ВПЧ-генотипа 16, напротив, с возрастом отмечался прогрессивный рост. Максимальные значения положительных результатов ПЦР-анализа на генотип 16 зарегистрированы в возрастных группах 36-45 лет и 46-58 лет. Так, в 2008г в возрастной группе пациенток 17-25 лет количество положительных результатов ПЦР-анализа на тип 16 составляло менее

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА...

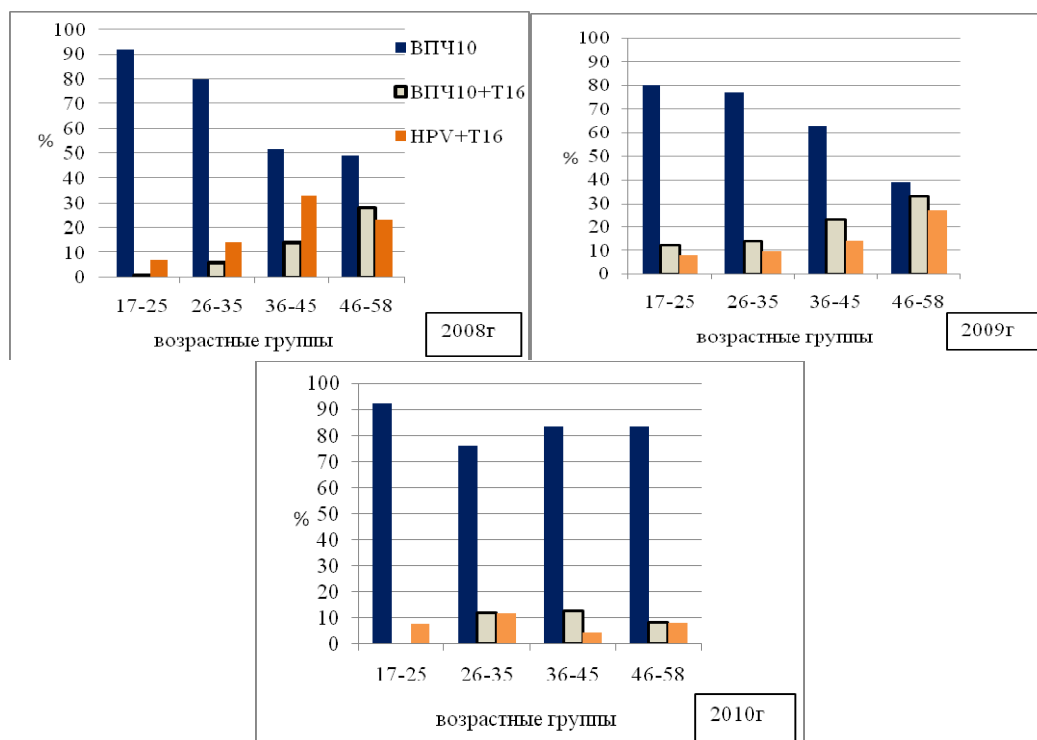


Рис.3. Частота встречаемости ВПЧ-генотипов у пациенток различных возрастных групп (2008 г, 2009 г, 2010 г).

1%, а в возрастной группе 46-58 лет генотип 16 встречался уже в 28% случаев. В 2009г в возрастной группе пациенток 17-25 лет доля генотипа 16 составила 12% от общего количества положительных результатов ПЦР-анализа на ВПЧ, в группе 36-45 лет уже 23%. Аналогичная тенденция отмечалась и в 2010г. Среди пациенток возрастной группы 17-25 лет генотип 16 не встречался вообще, а в группе 36-45 лет его встречаемость достигала 12,5% от общего числа положительных результатов ПЦР-анализа на ВПЧ. В работе также обнаружено, что с возрастом пациенток повышалось инфицирование множественными генотипами ВПЧ, то есть повышалась частота встречаемости одного или нескольких тестируемых ВПЧ-генотипов, в том числе генотипа 16 (группа ВПЧ 10+Т16). Такая тенденция отмечалась на протяжении всех лет исследования. В 2008г частота выявления генотипов ВПЧ 10+Т16 составила в группе 17-25 лет 7%, а в группе 36-45 лет она достигала 33%. В 2009г возрастная динамика частоты выявления генотипов ВПЧ10+Т16 изменялась от 8% в группе 17-25 лет до 27% в возрастной группе 46-58 лет.

Сравнительно одинаковая возрастная тенденция в частоте встречаемости ВПЧ – генотипов 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 и высококанцерогенного типа 16 указывает на возможность, с одной стороны, снижения элиминации вируса с возрастом и, с другой стороны, повышение с возрастом вероятности инфицирования сразу несколькими генотипами, преимущественно одной филогенетической группы.

Родственные с ВПЧ-16 штаммы 31, 33, 35, 52. Результаты нашего исследования согласуются с результатами других исследований по этой проблематике. Несмотря на то, что с возрастом снижается частота первичного инфицирования ВПЧ, в то же время возрастает вероятность персистенции инфекции и риск быть инфицированным филогенетически родственным типом ВПЧ [4, 5]. Так, при инфекции ВПЧ типа 16 часто обнаруживают и другие штаммы этого вируса, как высокой, так и низкой степени онкогенности. Чем дольше обнаруживается присутствие одного или нескольких онкогенных генотипов ВПЧ в организме женщины, тем выше риск развития РШМ, так как решающее значение для развития этой формы рака имеет персистенция вирусного генома [6].

При анализе удельного веса общего количества выявляемых генотипов ВПЧ для каждой возрастной группы установлено, что максимум встречаемости генотипов ВПЧ приходился на 17-25 лет (391 положительный результат) и 26-35 лет (384 положительных результата). В возрастных группах 36-45 лет и 46-58 лет общее количество положительных результатов ПЦР-анализа на ВПЧ примерно в 3 раза меньше (101 и 122 соответственно) по сравнению с пациентками более молодого возраста. Высокий уровень инфицирования ВПЧ в молодом возрасте связывают с наиболее значимыми факторами риска: раннее начало половой жизни и наличие многочисленных половых партнеров, наличие других инфекций, вредных привычек [7].

В настоящее время эритроцитарные антигены рассматриваются как генетические маркеры многих заболеваний. В настоящей работе была проанализирована частота встречаемости различных генотипов ВПЧ у пациенток с разной группой крови. Большинство носительниц различных ВПЧ-генотипов имели II (А) группу крови. Наименьшая частота встречаемости ВПЧ-генотипов зарегистрирована у пациенток с IV (АВ) группой крови. У пациенток со II группой крови количество ВПЧ-положительных случаев составило 374, тогда как на долю инфицированных с IV группой крови приходилось 67 ВПЧ-положительных случаев. Промежуточное положение занимали обследуемые с I и III группами крови, на долю которых приходилось 302 и 113 ВПЧ-положительных случаев соответственно. Детальный анализ частоты встречаемости различных ВПЧ-генотипов по группам крови показал, что наибольшую частоту встречаемости у лиц с различной группой крови имели генотипы группы ВПЧ10. Генотип 16 и его комбинация с другими из 10 выявляемых ВПЧ-генотипов в разной степени встречались у пациенток с разными группами крови. Высокая частота встречаемости генотипа 16 отмечалась у обследуемых со II группой крови. Пациентки с I группой крови в основном являлись носительницами нескольких генотипов ВПЧ, в том числе типа 16.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости вируса папилломы человека в клинических образцах пациенток Николаевской области достаточно высокая – 30% обследуемых являются носительницами ВПЧ.
2. Наибольшую частоту встречаемости имеют генотипы группы ВПЧ10. Сравнительно низкие показатели частоты встречаемости зарегистрированы для типа 16 и комбинации генотипов (группа ВПЧ10+Т16).

3. Частота встречаемости различных ВПЧ-генотипов зависит от возраста пациенток. В возрастной группе 17-25 лет максимальна частота встречаемости генотипов группы ВПЧ10, с возрастом повышается частота встречаемости высококанцерогенного ВПЧ-генотипа 16.
4. С возрастом повышается вероятность инфицирования сразу несколькими генотипами, преимущественно одной филогенетической группы – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67.
5. Большинство носительниц различных ВПЧ-генотипов имеют А(II) группу крови, наименьшую частоту встречаемости ВПЧ-генотипов - пациентки с АВ (IV) группой крови.

Список литературы

1. Дмитриев Г.А. Папилломавирусная инфекция / Г.А. Дмитриев, О.А. Биткина – М. : Медицинская книга, 2006. – 80 с.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак – М. : Мир, 2002. – 589 с.
3. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки / В.И. Киселев, О.И. Киселев – М., 2003. – 90 с.
4. De Villiers E.M. Human pathogenetic papillomavirus types / E.M. De Villiers // Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, 1994. – Vol. 186. – P. 1–13.
5. Zur Hausen H. Human pathogenetic papillomaviruses / H. Zur Hausen // Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, 1994. – Vol. 186. – P. 131–157.
6. Бохман Я.В. Рак шейки матки / Я.В. Бохман, У.К. Лютра – Кишнев, 1991. – 180 с.
7. Двойрин В.В. Статистика злокачественных новообразований в России и некоторых странах СНГ / Двойрин В.В., Аксель М.Е., Трапезников Н.Н. – М., 1995. – 76 с.

Верко Н.П. Генотипування вірусу папіломи людини при скринінговому дослідженні в Миколаївській області / Н.П. Верко, А.В. Литвиненко, І.М. Верба, О.Ю. Шишко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 3. – С. 50-55.

У роботі проаналізовано частота зустрічальності різних генотипів вірусу папіломи людини у пацієнток Миколаївській області методом полімеразної ланцюгової реакції. Встановлена досить висока частота зустрічальності вірусу папіломи людини в клінічних зразках – 30% клінічних зразків мали позитивний ПЛР-результат. Найбільшу частоту мали генотипи 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, порівняно низькі показники частоти зустрічальності зареєстровані для висококанцерогенного типу 16. Частота зустрічальності різних генотипів папіломавірусної інфекції залежить від віку та групи крові пацієнток.

Ключові слова: вірус папіломи людини, полімеразна ланцюгова реакція, Миколаївська область, генотип.

Verko N.P. The dispersive analysis of indicators of heart rate variability conditions under the influence of controlled breath with individually fitted frequency / N.P. Verko, A.V. Litvinenko, I.N. Verba, E.Y. Shishko // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 3. – P. 50-55.

Quite high frequency of human papillomavirus in clinical samples – 30% of clinical specimens had positive PCR result. The greatest frequency of genotypes were 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, a relatively low frequency of occurrence reported for type 16. The frequency of different genotypes of human papillomavirus infection depends on age and blood group of patients

Keywords: human papillomavirus, polymerase chain reaction, Mykolaiv region, genotype.

Поступила в редакцію 02.10.2010 г.