

Разнообразие современных методов детекции и типирования вируса папилломы человека

Н.В.Стуров, В.В.Суровцев, С.В.Авдошина,
А.Н.Сенягин, О.А.Лесная, Е.В.Митина
РУДН, Москва

Рак шейки матки – один из самых распространенных видов рака. Инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) – доказанная причина возникновения рака шейки матки, к тому же накапливается все больше доказательств, что онкогенные типы ВПЧ вызывают большую часть рака и предраковых заболеваний полового члена, вульвы, влагалища, анального канала и ротоглотки, в то время как не онкогенные типы ВПЧ могут быть причиной генитальных бородавок и рецидивирующего респираторного папилломатоза. С каждым днем появляются все новые многообещающие методики детекции и типирования ВПЧ: масс-спектрометрия с высокоэффективным обогащением с помощью наноматериалов, секвенирование нового поколения, CRISPR/Cas9 и другие. Тем не менее на сегодняшний день количественная ПЦР все еще выигрывает у новейших методов поскольку обладает следующими преимуществами: относительно проста в применении, существует много надежных, проверенных и зарегистрированных методик для ее проведения, это относительно дешевый метод (недорогие реагенты и приборы), большое количество лабораторий оснащены приборами и обученным персоналом для проведения ПЦР в реальном времени. И все это сочетается с высокой чувствительностью и специфичностью.

Ключевые слова: рак шейки матки, вирус папилломы человека, ВПЧ высокого риска, ПЦР в реальном времени.

A Variety of Modern Methods for Detection and Typing of Human Papillomavirus

N.V.Sturov, V.V.Surovtsev, S.V.Avdoshina,
A.N.Senyagin, O.A.Lesnaya, E.V.Mitina
RUDN University, Moscow

Cervical cancer is one of the most common types of cancer. Human papillomavirus (HPV) infection is a proven cause of cervical cancer, and there is growing evidence that oncogenic HPV types causes most cervical, penile, vulvar, vaginal, anal, and oropharyngeal cancers and precancerous conditions, whereas nononcogenic, low-risk HPV infection causes genital warts and recurrent respiratory papillomatosis. New promising methods for detection and typing of HPV appear daily: mass spectrometry genotyping of human papillomavirus based on nanomaterials high-efficiency selective en-

richment, next-generation sequencing, CRISPR / Cas9, and others. Nevertheless, currently quantitative PCR is still better than the newest methods because of the following advantages: it is relatively easy to use, there are many reliable, tested, and registered methods based on it, it is a relatively cheap method (inexpensive reagents and instruments), a large number of laboratories is equipped with instrumentation and trained personnel for real-time PCR. It is all combined with high sensitivity and specificity of this method.

Keywords: cervical cancer, human papillomavirus, high-risk HPV, real-time PCR.

Рак шейки матки – четвертый по распространенности вид рака у женщин по всему миру, и на седьмом месте среди всех видов рака у обоих полов [1]. Только в 2018 г. по данным ВОЗ, было зафиксировано 678 000 новых случаев рака шейки матки [2]. Инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) – доказанная причина возникновения рака шейки матки, к тому же накапливается все больше доказательств, что онкогенные типы ВПЧ вызывают большую часть рака и предраковых заболеваний полового члена, вульвы, влагалища, анального канала и ротоглотки [3], в то время как не онкогенные типы ВПЧ могут быть причиной генитальных бородавок и рецидивирующего респираторного папилломатоза.

На сегодняшний день известно более 100 типов ВПЧ, сорок из которых могут инфицировать урогенитальный тракт и передаваться при половых контактах [4]. Большинство сексуально активных людей инфицируются каким-либо типом ВПЧ хотя бы раз в жизни [5, 6]. Часто ВПЧ-инфекция каким-либо типом протекает бессимптомно. Среди упомянутых 40 типов только 15 относят к ВПЧ высокого риска, это: -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 и -82 типы [7]. Совместно 16 и 18 тип ВПЧ являются причиной возникновения 70% случаев рака шейки матки по всему миру [8]. Помимо того, что диагностика ВПЧ улучшает чувствительность первичного и вторичного скрининга присутствия рака шейки матки, она может быть применима в ряде различных ситуаций, таких как: а) диагностика инфицирования высокоонкогенными типами ВПЧ, б) дифференцирование цитологических отклонений низкой степени на основе рисков, связанных с типом ВПЧ, в) последующее наблюдение после лечения выраженной интраэпителиальной неоплазии, г) эпидемиологический надзор на региональном или государственном уровне для предоставления исходных и последующих данных для общемирового планирования здравоохранения [9–11]. Клинически подтверждено, что дифференцирование неоплазии шейки матки низкой степени путем диагностики ВПЧ более чувствительно к выявлению основных предраковых поражений шейки матки с помощью гистологии, чем повторные анализы жидкостной цитологии [12]. Клинические показания к применению тестов на ВПЧ должны учитывать историю ВПЧ-инфекции и самого заболевания, а также множество типов, которые могут присутствовать у пациента.

На сегодняшний день методики на основе амплификации сигнала от ДНК ВПЧ детектируют несколько типов ВПЧ высокого риска, они стандартизованы, коммерчески доступны и разрешены для клинического использования. Методы амплификации нуклеиновых кислот идеальны для эпидемиологических задач, они минимизируют шанс неверно оценить статус ВПЧ-инфекции и позволяют детектировать наличие ВПЧ даже при низкой вирусной нагрузке. ПЦР – наи-

более распространенный метод типирования ВПЧ, особенно в случае использования универсальных праймеров, гибридованных на носителе [13]. С каждым днем появляются все новые многообещающие методы детекции ВПЧ: масс-спектрометрия с высокоэффективным обогащением с помощью наноматериалов, секвенирование нового поколения, CRISPR/Cas9 и другие. Многим методикам, основанным на этих методах, еще предстоит пройти проверку в клинических исследованиях и получить разрешение на использование в клинической практике.

Потенциальные возможности использования методики выявления ВПЧ были разделены на 3 типа клинического применения: для разрешения неоднозначных результатов цитологического исследования, для первичного скрининга как самостоятельный тест, так и в паре с цитологическим исследованием, и в последующем лечебной цервикальной интраэпителиальной неоплазии [14]. Помимо клинического применения, детекция ВПЧ имеет научную ценность: исследования по эпидемиологии и распространению ВПЧ-инфекции, мониторинг процесса аногенитальных предраковых заболеваний, выявление эффективности вакцинации (несмотря на то, что вакцинация уже рекомендована девочкам 9–14 лет [15]).

Рассмотрим несколько новых и традиционных методик детекции и типирования ВПЧ.

CRISPR/Cas9

Несмотря на то что система CRISPR/Cas9 нашла широкое применение в редактировании и регуляции генов, она до сих пор достаточно редко используется для диагностики нуклеиновых кислот. Благодаря высокой специфичности вносимых ДНК-разрывов, система CRISPR/Cas9 может быть чувствительна даже к однонуклеотидным заменам [16]. Один из новейших методов CRISPR/Cas9 (CRISPR – сгруппированные короткие палиндромные повторы) был использован для создания методики stPCR3.0, детектирующей наличие ВПЧ высокого риска 16 и 18 типов. Методика stPCR3.0 является синтезом ПЦР в реальном времени и CRISPR/Cas9 [17]. На первом этапе при изотермальных условиях происходит взаимодействие ДНК ВПЧ и комплексом, состоящим из специфической направляющей РНК (singleguide RNA, sgРНК) и белком Cas9. Комплекс распознает специфическую последовательность вирусной ДНК и вносит разрывы. На втором этапе происходит обычная ПЦР в реальном времени, которая амплифицирует разрезанный фрагмент ДНК. Благодаря тому, что первый этап занимает мало времени, то общая продолжительность процедуры примерно равна продолжительности обычной количественной ПЦР, то есть около двух часов. Данная методика была протестирована на генно-инженерных конструктах, содержащих гены ВПЧ, а также на клинических образцах. К недостаткам этой методики можно отнести ее новизну (нет такого большого накопленного опыта ее использования по сравнению с устоявшимися методиками), высокую стоимость, а также отсутствие разрешения на применение в клинической практике.

Количественная ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени или количественная ПЦР позволяет не только выявлять различные типы ВПЧ, но и определять вирусную нагрузку. Количественная оценка ДНК ВПЧ в образце может быть полезна при выяснении клинической картины [18]. ПЦР в реальном времени – один из самых быстрых методов, поскольку детекция результатов производится одновременно с амплификацией, к тому же это одна из самых

безопасных методик в отношении контаминационной опасности, так как сама реакция и детекция результатов происходят в одной и той же пробирке. К плюсам ПЦР в реальном времени так же можно отнести длительный период ее использования, коммерческую доступность реагентов и приборов, а также широкий спектр доступных методик, позволяющих выявлять не только самые распространенные типы ВПЧ высокого риска (16 и 18 типы), но и такие как -31, -33, -35, -39, -45, -51 и другие. К надежным методикам выявления 16 и 18 типа можно отнести методики Cobas® HPV Test, Abbott Real Time High Risk HPV test, Hybrid Capture 2 HPV DNA Test, к методикам, позволяющим выявлять не только 16 и 18 типы ВПЧ, можно отнести, такие как MeltPro® HPV Test или Ампли Прайм® ВПЧ ВКР14 генотип, а также Ампли Прайм® ВПЧ ВКР14, разрабатываемые в рамках реализации комплексного проекта при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации/Минобрнауки России по договору №03.G25.31.0226 от 03.03.2017 г.

Секвенирование нового поколения (next-generationsequencing, NGS)

NGS – очень мощный диагностический инструмент, который с недавнего времени стали использовать для типирования ВПЧ. Надо отметить, что с помощью NGS удается типировать и детектировать наличие ВПЧ с высокой точностью, повторяемостью и чувствительностью, даже если в образце находится несколько типов ВПЧ [19]. Большим преимуществом NGS является то, что методика позволяет анализировать пулированные образцы, благодаря предварительному баркодированию и последующему биоинформатическому анализу [11]. Более того, NGS позволяет детектировать неизвестные и не охарактеризованные типы ВПЧ после прочтения их ДНК-последовательности [20, 21]. Но для таких манипуляций биоинформатический анализ результатов NGS должен быть достаточно надежным и обладать возможностью поиска и отсева химерных последовательностей (образовавшихся из двух участков ДНК-последовательностей, изначально принадлежавших двум разным типам вируса или какой-либо другой молекуле ДНК). Таким образом NGS совместно с баркодированием показывает высокую чувствительность при детекции ВПЧ в нескольких образцах и даже в разных типах образцов, расширяя области применения этой методики. NGS продемонстрировал возможность детекции и типирования ВИЧ в клинических образцах, а также предоставил большое количество данных, которые могут быть использованы в диагностических, прогностических или стратификационных инструментах в клинической практике [22].

На сегодняшний день разрабатывается большое количество разнообразных NGS методик для детекции и типирования ВПЧ. Они отличаются широким разнообразием праймеров, различными NGS-платформами и множеством биоинформатических программ. Еще одним плюсом NGS является то, что этим инструментом можно детектировать небольшие вариации или даже однонуклеотидные замены. NGS-методики были использованы для эпидемиологических исследований, для программ эпидемиологического надзора за вакцинацией против ВПЧ и за мониторингом вирусных мутаций [19, 22].

К минусам применения NGS для детекции и типирования ВПЧ можно отнести то, что многие методики находятся еще только на стадии разработки и не зарегистрированы для нашей страны, реагенты и себестоимость проведения NGS остается такой же высокой, для

одного запуска NGS необходимо одновременно набрать достаточно большое количество образцов для анализа, что недоступно для маленьких лабораторий и, наконец, очень небольшой процент лабораторий на сегодняшний день оснащен приборами для проведения секвенирования нового поколения.

Масс-спектрометрия с высокоэффективным обогащением с помощью наноматериалов

Новизна данного метода состоит в селективном обогащении олигонуклеотидов нано-алмазами, модифицированными спермином (SP-NDs), для последующего MALDI-TOF анализа ВПЧ [23]. Эффективность данного метода (SP-NDs) была продемонстрирована при экстракции и обогащении олигонуклеотидов из растворов додецил сульфата натрия (SDS) и мочи. Показано, что SP-NDs может селективно экстрагировать ДНК-олигонуклеотиды ВПЧ из смеси, обработанной ферментами после проведенного ПЦР – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) анализа. Далее полученные молекулы могут быть проанализированы на MALDI-TOF спектрометре напрямую без дополнительных очисток. И уже по результатам спектрометрии устанавливается генотип ВПЧ. С помощью SP-NDs 16 и 18 типы ВПЧ могут детектироваться в клинических образцах. Несмотря на сложность описания, в практике это простой, высокоселективный и надежный метод для детекции ВПЧ в клинических образцах. Благодаря описанной методике по обогащению, экстракции и очистке ДНК, MALDI-TOF совместно с ПЦР может стать более быстрым, чувствительным, высокопроизводительным и многообещающим методом для анализа метилирования ДНК, однонуклеотидных замен и других модификаций.

Заключение

Научно-технический прогресс не стоит на месте, каждый день появляются новые методы, приборы, технологии, совершенствуются уже традиционные, комбинируются привычные методы с появлением новых более современных и практичных. Кажется, что новые методы появляются быстрее, чем мир успевает освоить и внедрить методики предыдущего поколения. Детектирование и типирование ВПЧ – не исключение. В статье рассмотрен ряд новых современных методик, некоторые из них более высокопроизводительные и точные, чем привычная ПЦР в реальном времени. Тем не менее на сегодняшний день количественная ПЦР все еще выигрывает у новейших методов, поскольку обладает следующими преимуществами: относительна проста в применении, существует много надежных, проверенных и зарегистрированных методик для ее проведения, это относительно дешевый метод (недорогие реагенты и приборы), большое количество лабораторий оснащены приборами и обученным персоналом для проведения ПЦР в реальном времени. И все это сочетается с высокой чувствительностью и специфичностью.

Литература

1. IARC WHO GLOBOCAN 2012: All Cancers (Excluding Non-melanoma Skin Cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
2. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
3. Cogliano V., Baan R., Straif K. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncology* 2005; 6: 204.
4. De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zurHausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324: 17–27.
5. Satterwhite C.L., Tortrone E., Meites E. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis* 2013; 40: 187–93.
6. Myers E.R., McCrory D.C., Nanda K. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 1158–1171.
7. Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 518–527.
8. Li N., Franceschi S., Howell-Jones R., Snijders P.J., Clifford G.M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011; 128: 927–35.
9. Abreu A.L., Souza R.P., Gimenes F., Consolaro M.E. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology*. 2012; 9: 262.
10. Arbyn M., Verdoordt F., Snijders P.J. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014; 15 (2): 172–183.
11. GradTssimo A., Burk R.D. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17(4):379-391.
12. Kelly R.S., Patrick J., Kitchener H.C., Moss S.M.. Group NHSI. HPV testing as a triage for borderline or mild dyskaryosis on cervical cytology: results from the Sentinel Sites study. *Br J Cancer*. 2011; 105 (7): 983–988.
13. Coutlée F. Mayrand M.H., Roger M., Franco E.L. Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids. *Public Health Genomics*. 2009; 12 (5–6): 308–18.
14. Wright T.C.J., Massad L.S., Dunton C.J., Spitzer M., Wilkinson E.J., Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis*. 2007; 11: 201–222.
15. Markowitz L.E., Dunne E.F., Saraiya M. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2014; 63 (No. RR-05).
16. Liu W., Yu H., Zhou X., Xing D. In vitro Evaluation of CRISPR/Cas9 Function by an Electrochemiluminescent Assay. *Anal. Chem*. 2016; 88: 8369–8374.
17. Zhang B., Xia Q., Wang Q., Xia X., Wang J. Detecting and typing target DNA with a novel CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique. *Anal Biochem*. 2018; 561–562: 37–46.
18. Gravitt P.E., Coutle F., Iftner T., Sellors J. Quint WG V: New Technologies in cervical cancer screening. *Vaccine*. 2008; 26: Suppl 10: K42–K52.
19. Arroyo L.S., Smelov V., Bzhalava D., Eklund C., Hultin E., Dillner J. Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping. *J Clin Virol*. 2013; 58 (2): 437–442.
20. Ekstrom J., Bzhalava D., Svenback D., Forslund O., Dillner J. High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int J Cancer*. 2011; 129 (11): 2643–2650.
21. Jelen M.M., Chen Z., Kocjan B.J. Global Genomic Diversity of Human Papillomavirus 11 Based on 433 Isolates and 78 Complete Genome Sequences. *J Virol*. 2016; 90 (11): 5503–5513.
22. Mirabello L., Yeager M., Cullen M. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *J Natl Cancer Inst*. 2016; 108 (9).
23. Zhu L., Yin L., Xue J., Wang Z., Nie Z. Mass Spectrometry Genotyping of Human Papillomavirus Based on High-Efficiency Selective Enrichment of Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018.

Сведения об авторах:

Стуров Николай Владимирович – к.м.н., доцент, заведующий кафедрой общей врачебной практики РУДН, Москва

Суровцев Виктор Васильевич – заместитель директора по инновационной деятельности медицинского института РУДН, научный сотрудник медицинского института РУДН, Москва

Авдошина Светлана Владимировна – к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики имени академика В.С. Моисеева РУДН, Москва

Сенягин Александр Николаевич – аспирант кафедры микробиологии и вирусологии РУДН, Москва

Лесная Олеся Анатольевна – ассистент кафедры общей врачебной практики РУДН, Москва

Митина Екатерина Владимировна – ассистент общей врачебной практики РУДН, Москва