

Значение ВПЧ-тестирования в скрининге рака шейки матки.

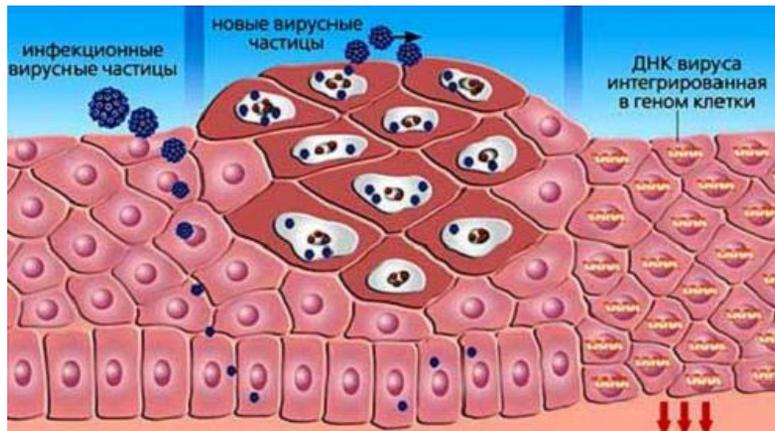
Шипулина Ольга Юрьевна

*к.м.н., руководитель ПММД, зав. Лаборатории Молекулярных Методов (CMD),
 руководитель НГ по разработке новых методов диагностики
 оппортунистических и папилломавирусных инфекций
 ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора*

Научно-практическая конференция «Онкогинекология»
 ФГБУ «НМИЦ АГИП им. акад. В.И. Кулакова» МЗ РФ г. Москва,
 19 октября 2018 года

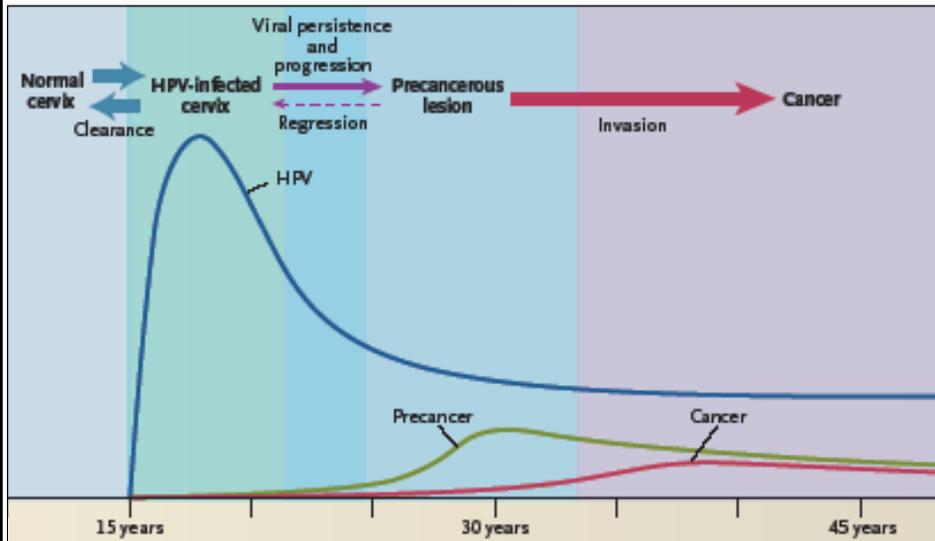
Стадии ВПЧ-инфекции

Латентная инфекция → Продуктивная инфекция → Трансформация клетки



NILM → **L-SIL (HPV, CIN1)** → **H-SIL (CIN2-3)** → **рак**

Возраст и проявления ВПЧ-инфекции



Schiffman M, Castle PE.
N Engl J Med, 2005

Профилактика РШМ

- Первичная – вакцинация
- **Вторичная – цервикальный скрининг**
- Третичная – лечение РШМ

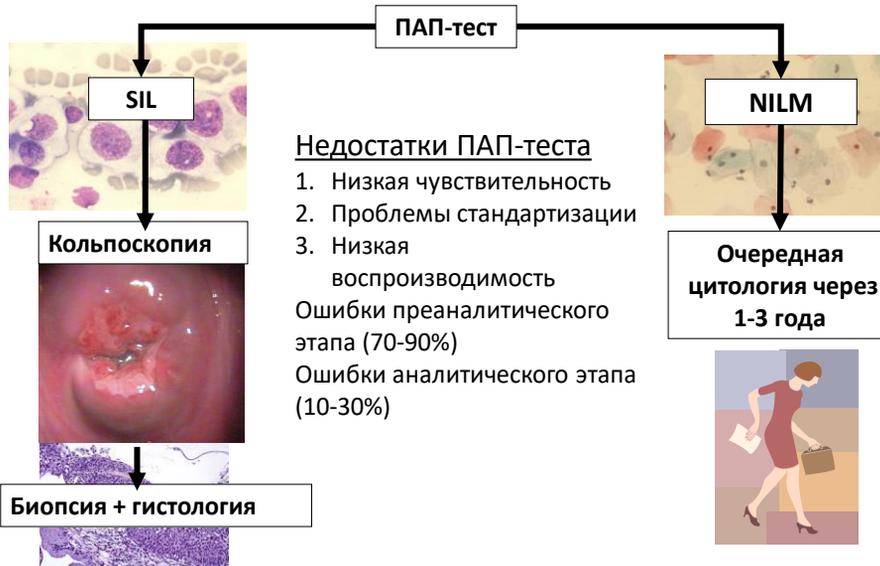
Цервикальный скрининг в профилактике РШМ

Проведение тотального обследования женского населения при помощи **простого унифицированного** метода

- организованный скрининг,
- в рамках **диспансеризации** или профилактических осмотров
- оппортунистический скрининг



Традиционный цервикальный цитологический скрининг



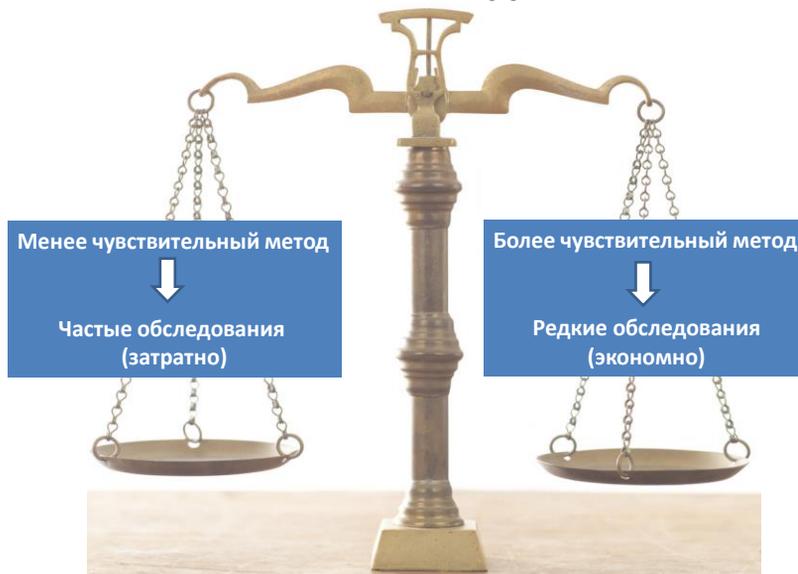
Цель скрининга онкопатологии шейки матки

- **Снизить заболеваемость РШМ** -
выявление и лечение Н-SIL (CIN2/CIN3)
- **Снизить смертность от РШМ** -
выявление РШМ на ранней стадии

Скрининговый тест должен обладать:

- **высокой чувствительностью** –
не пропускать Н-SIL
- **высокой специфичностью** –
сократить объем пациенток направленных на кольпоскопию

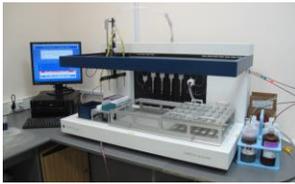
Чувствительность метода и частота обследования



Пути совершенствования цервикального скрининга

Совершенствование ПАП-теста:

- Жидкостная цитология
- Автоматизация подготовки/окраски
- Автоматизация аналитического этапа

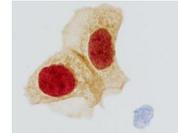


Внедрение молекулярных тестов:

- ВПЧ-тесты



- Клеточные маркеры (P16/Ki67)



ВПЧ-тестирование в скрининге онкологической патологии шейки матки

Испытания ВПЧ-тестов в скрининговых исследованиях

Исследование (страна)	N	возраст	годы	материал	ВПЧ тест	Срав- нение
• POBASCAM (Нидерланды)	44102	29 - 61	янв 1999 сент 2002	CS	GP5+/6+ PCR EIA	CC
• ARTISTIC (Англия)	24510	20 - 64	июль 2001 сент 2003	LBC	PCR AmpliCor	LBC
• Финляндия	54207	25 - 65	янв 2003 дек 2005	CS	HC2	CC
• NTCC (Италия)	47369	25 - 60	март 2004 дек 2004	CS, LBC	HC2	CC, LBC
• CCCaST (Канада)	9667	30 - 69	окт 2002 окт 2004	CS	HC2	CC
• SATCH (сельская Индия)	5603	25 -	янв 2005 июль 2007	CS	HC2	CC, VIA

CS – цервикальный соскоб
 LBC – жидкостная цитология
 CC – традиционная цитология
 HC2 – Дайжен тест
 VIA – визуализация после обработки 2% уксусной кислотой

Чувствительность и специфичность

	Чувствительность	Специфичность
ПАП-тест	53%	97%
ВПЧ-тест	96%	92%

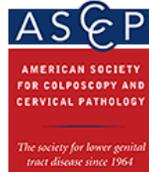
Mairand MH et al. Int J Cancer, 2006

С 2003 года ВПЧ-тест рекомендован для:

- ✓ ... менеджмента женщин с ASC-US
- ✓ ... мониторинга терапии CIN2+
- ✓ ... как первичный скрининговый метод совместно с цитологией для женщин старше 30 лет «cotesting».
- ✓ ... на первом этапе скрининга перед цитологическим исследованием для женщин старше 30 лет (возможность самостоятельного забора материала – self-sampling)
- ✓ ... разрешения дискордантных результатов цитологии и гистологии



IARC WHO



AMERICAN SOCIETY
FOR COLPOSCOPY AND
CERVICAL PATHOLOGY

The society for lower genital
tract disease since 1964



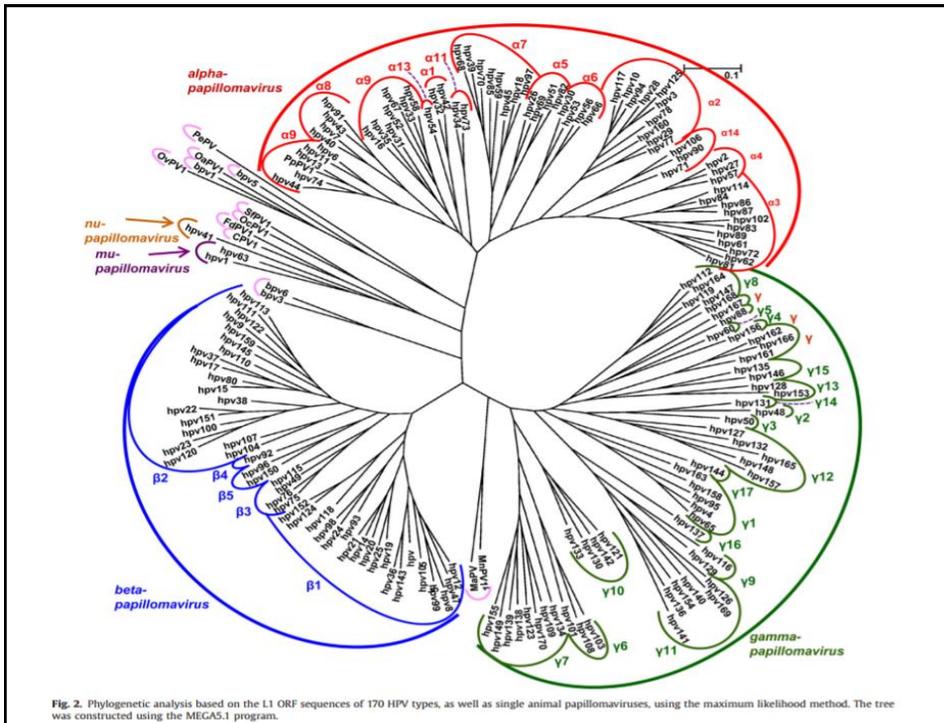
EUROGIN



European Society for Infectious Diseases
in Obstetrics and Gynaecology

Возможности ВПЧ-тестирования в скрининге и диагностике

- **Генотипирование ВПЧ**
- **Определение «вирусной нагрузки»**
- Выявление интеграция ДНК ВПЧ в клеточный геном
- Определение экспрессии вирусных белков
- Определение субтипов ВПЧ (секвенирование, NGS)



Классификация типов ВПЧ группы α по степени онкогенного риска

categories is extremely challenging, especially for weakly carcinogenic and rare HPV types

- 12 типов ВПЧ высокого канцерогенного риска

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

Рассматриваются как канцерогенные (class I) - типы высокого риска (hr-HPV), как предполагает Международное Агентство по изучению рака (International Agency for Research on Cancer (IARC-2009 hr-HPV types).

- **68** рассматривается как скорее всего (**probably**) канцерогенный
- И 12 типов – как возможно (**possibly**) канцерогенные: **26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97.**

Эпидемиологическая и филогенетическая классификация генитальных типов ВПЧ

Риск	Эпидемиологические группы	
	Высокого риска	Возможного / Низкого
Высоко вероятного риска	(A9) 16, 31, 35, 33, 52, 58, (A7) 18, 39, 45, 59, (A6) 56 (A5) 51	67 68*, 70, 85, 97 30, 53, 66* 26, 69, 82
Мало вероятного риска		(A8) 40, 43, 91 (A10) 6, 11, 44, 74 (A11) 34, 73** (A13) 54 (A3) 61, 62, 72, 89 (A1) 34, 42

* - включены в ВПЧ-тесты Roshe, Abbott, ** был найден в раке

*X. Bosch, 2003, IARC 2009, *2012, Ethel-Michele de Villiers, 2013*

Внедрение ВПЧ-теста в США: одобрено FDA и рекомендовано ASCCP

2000 год	ВПЧ-тест (HC2) одобрен для менеджмента пациенток с ASC-US
2003 год	ВПЧ-тест одобрен для использования совместно с ПАП-тестом («cotesting») для женщин с 30 лет, обсуждается увеличение интервала скрининга
2012 год	Новое совместное руководство по скринингу ASC+ASCCP+ASCP: ВПЧ-тест + ПАП-тест («cotesting») предпочтительней (с 30 лет), интервал скрининга увеличен до 5 лет, рекомендован ВПЧ-тест с отдельным выявлением 16 и 18 типов
апрель 2014 год	ВПЧ-тест (the Cobas HPV test) одобрен FDA для первичного скрининга как самостоятельный тест (с 25 лет) Это было основано на результатах исследования ATHENA, в который вошли более 40 000 женщин.

Point-Counterpoint: Cervical Cancer Screening Should Be Done by Primary Human Papillomavirus Testing with Genotyping and Reflex Cytology for Women over the Age of 25 Years
Mark H. Stoler, R. Marshall Austin, Chengquan Zhao
Journal of Clinical Microbiology, September 2015 Volume 53 Number 9

Группа	Рекомендуемый скрининговый метод	Рекомендации по дальнейшему ведению	Комментарий
<21 года	Не участвуют		ВПЧ – тест не рекомендуется использовать для скрининга и разрешения ASC-US
21 – 29 лет	Только цитология каждые 3 года	ASC-US + ВПЧ pos; LSIL и выше - кольпоскопия NILM; ASC-US + ВПЧ neg – повтор исследования через 3 года	ВПЧ тест не рекомендуется для скрининга в этой группе (только для разрешения неясных результатов цитологии)
30 - 65 лет	Совместное тестирование ВПЧ и цитология (предпочтительно)	ASC-US + ВПЧ pos; LSIL и выше – кольпоскопия NILM + ВПЧ pos: <u>Опция 1</u> – повтор исследования через 12 месяцев <u>Опция 2</u> – если выявлены 16 или 16/18 - направление на кольпоскопию Если ВПЧ 16/18 neg – повтор исследования через 12 мес NILM + ВПЧ neg, ASC-US + ВПЧ neg - следующее исследование через 5 лет	
	Только цитология каждые 3 года (приемлемо)	ASC-US + ВПЧ pos; LSIL и выше – кольпоскопия NILM; ASC-US + ВПЧ neg – следующее исследование через 3 года	

ACS, ASCCP, & ASCP 2012 guidelines update 19

Рекомендации по скринингу для женщин 30-69 лет (ВПЧ-тест и ПАП-тест одновременно - предпочтительный метод скрининга)

ВПЧ и цитология совместно каждые 5 лет (предпочтительно)	ASC-US + ВПЧ pos; LSIL и выше – согласно руководству ASCCP
	NILM+ВПЧ pos: <u>Опция 1:</u> повтор исследования через 12 месяцев; <u>Опция 2:</u> Если выявлены ВПЧ 16 или 16/18 – кольпоскопия
	ВПЧ 16/18 neg – повтор исследований через 12 месяцев
	NILM+ВПЧ neg, ASC-US + ВПЧ neg – следующее исследование через 5 лет

Доказательная база – исследование ATHENA

- Обследование 47000 женщин в возрасте от 21 года
- В исследовании ATHENA тест **cobas®** HPV Test выявил 92% случаев \geq CIN3 в общей популяции по сравнению с 53%, выявленными цитологией¹
- Примерно одна из 7 женщин с нормальным результатом цитологии (NILM) и положительным по ВПЧ 16 имеет заболевание шейки матки высокой степени тяжести, пропущенное при цитологическом исследовании²

Абсолютный риск \geq CIN2 в зависимости от статуса по ВПЧ-ВП в исследовании ATHENA (когорта NILM)



1 - ATHENA = Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics, 2- Wright TC Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL; ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) Study Group. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:578-586. NILM = negative for intraepithelial lesion or malignancy.

18

ВПЧ-тест в первичном скрининге (с 25 лет): результаты исследования ATHENA

Gynecologic Oncology 136 (2015) 189–197



Contents lists available at ScienceDirect

Gynecologic Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yygyno



Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test[☆]



Thomas C. Wright^{a,*}, Mark H. Stoler^b, Catherine M. Behrens^c, Abha Sharma^c, Guili Zhang^c, Teresa L. Wright^d

^a Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University, New York, NY, USA

^b Department of Pathology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

^c Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA

^d Genentech, South San Francisco, CA, USA

- Первичный ВПЧ-скрининг с сортировкой 16/18 генотипа повышает чувствительность выявления CIN3+ на 28% по сравнению с ПАП-тестом.
- ПАП-тест «пропустил» 50% CIN3+ у женщин 25-29 лет.

Новый алгоритм скрининга на основе ВПЧ-теста с отдельным выявлением 16 и 18 типов (с 25 лет)

КЛЮЧЕВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АТНЕНА



Одобрена FDA стратегия скрининга, основанная на генотипировании ВПЧ16/18 и последующим цитологическим исследованием для других типов ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР)

Thomas C Wright, Jr. MD and Catherine M Behrens, MD, PhD

1 Department of Pathology and Cell Biology Columbia University (Emeritus), New York, NY, USA.
2 Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA.

ВПЧ-тест

- Более чувствителен в выявлении CIN3
 - Более долгосрочная прогностическая ценность
 - Предотвращает большее число случаев РШМ,
- НО! Вследствие более низкой специфичности
- Необходим триаж ВПЧ-положительных женщин

Триаж ВПЧ-положительных

(хорошо апробированы, широко применяются)

ПАП-тест (жидкостная цитология)

- Считается валидированным методом, но необходимо дополнительное помещение и оборудование, а также хорошо обученные специалисты

Клеточные маркеры прогрессии - Двойная экспрессия онкобелков p16/Ki67

- Оборудование, наборы и специалисты

Генотипирование ВПЧ

- Выделение более онкогенных типов - **16, 18**, 45, 31, 33 – какие типы включить?
- Как отличить транзиторную инфекцию от персистентной

Первичный ВПЧ-тест

в сценарии неорганизованного скрининга

- Мексика (2008-2010)

35-65 лет, интервал 5 лет, триаж: ПАП-тест

- Турция (2014)

30-65 лет, интервал 5 лет, триаж: ПАП-тест + генотипирование

- Аргентина (2011-2016)

30-64 лет, интервал 3 года, внедрение «самостоятельного мазка»

Первичный ВПЧ-тест

в сценарии организованного скрининга

- **Нидерланды**

Утвержден – 2011, введен – 2017,

Возраст: 30, 35, 40, 50, 60 лет, Тriage: ПАП-тест

«самостоятельный мазок» для не-участников

- **Италия**

Утвержден – 2013, апробация – 2014, введен – 2018,

Возраст: с 30/35 лет, Тriage: ПАП-тест

- **Швеция**

Введен - 2017, интервал 3 года (30-49 лет), 7 лет (50-64 лет),

Тriage: ПАП-тест

- **Германия – организованная программа**

С 35 лет – ВПЧ-ПАП ко-тестирование

Великобритания – 25-65 лет, пилотные исследования

Первичный ВПЧ-тест

(Австралия, Новая Зеландия, Китай)

- **Австралия – с 2017 года**

ВПЧ-тест с частичным генотипированием 16 и 18 (± 45) типов

Возраст: с 25 до 70/74 лет, Интервал – 5 лет, Тriage: ПАП-тест

- **Новая Зеландия – пилотный проект**

ВПЧ-тест с частичным генотипированием 16 и 18 (± 45) типов

Возраст: с 25 до 74 лет, Интервал – 5 лет, Тriage: ПАП-тест

- **Китай – пилотный проект**

careHPV – быстрее и дешевле, чем HC2 (Digene HPV-test),

Возраст: с 35 до 59 лет, Интервал – 5 лет,

Тriage: ПАП-тест

Современные требования к ВПЧ-тестам для скрининга

1. Выявление **ТОЛЬКО** типов высокого онкогенного риска
- **не выявлять 6, 11, 44 и т.д.**
2. Выявление **ШИРОКОГО СПЕКТРА** типов ВПЧ высокого онкогенного риска - от 12 до 14 типов (IARC)
- **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66*, 68**
3. Возможность выделять наиболее онкогенные типы (**16, 18/45**)
4. Возможность оценивать адекватность клинического образца (количество клеточных геномов).
5. Ведение порога клинически значимого (релевантного) *количества* вируса
- **1 pg = 10⁵ копий ДНК ВПЧ в 1 мл (для Digene HPV-test)**
- **3,0 Ig на 10⁵ клеточных геномов (для ВПЧ-тестов АмплиСенс)**
6. Возможность использования для **жидкостных** образцов.
- 7. Клиническая валидация теста.**

Необходимость генотипирования:

- Выявление новой и персистирующей инфекции;
- Разные типы обладают разной способностью к трансформации и персистенции:

В частности, ВПЧ 39, 59, 66 и 68 типов обладают меньшей способностью к трансформации клеток;

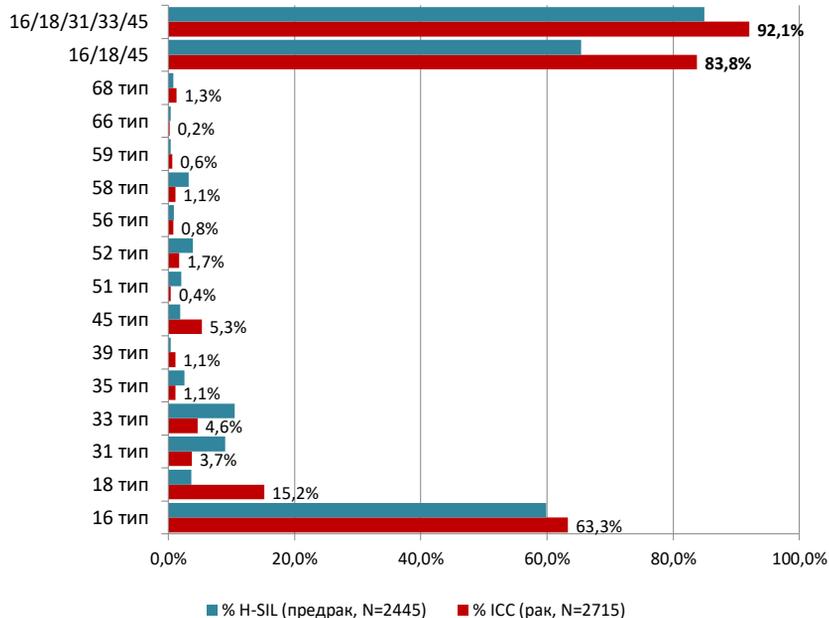
ВПЧ 51 и 56 типов быстрее элиминируются и реже ведут к развитию дисплазии даже при высоких концентрациях

Зачем выявлять 45 генотип?

- 16, 18, 45 в совокупности причина 75% плоскоклеточных раков и 94% аденокарцином;
- 18, 45 – чаще обнаруживаются в аденокарциномах;
- Средний возраст возникновения раков при ВПЧ 16, 18, 45 – 47 лет, при всех остальных – 56 лет;
- Средний возраст пациентов с раком ВПЧ 45 самый молодой (46,8 лет), по сравнению с 18 (48,2 лет) и 16 (50 лет);
- Часто интегрирует в геном человека

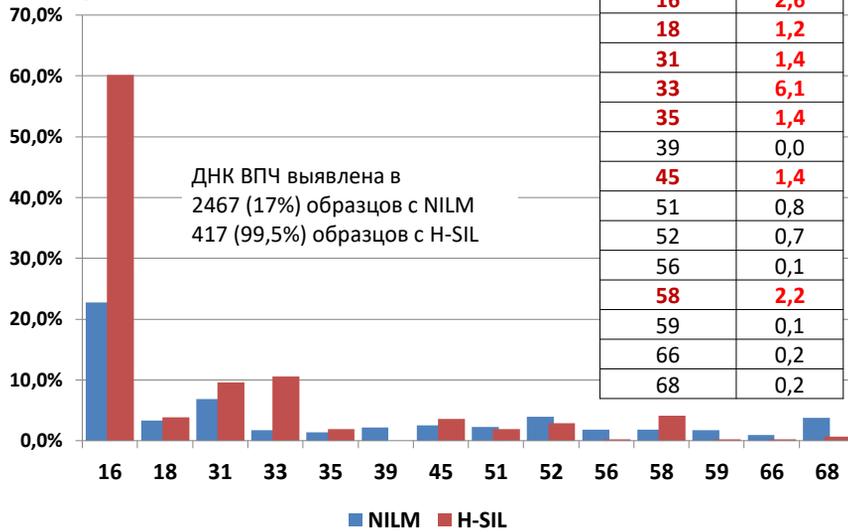
Tjalma WA, Depuydt CE, 2012

Исследования HERACLES и SCALE



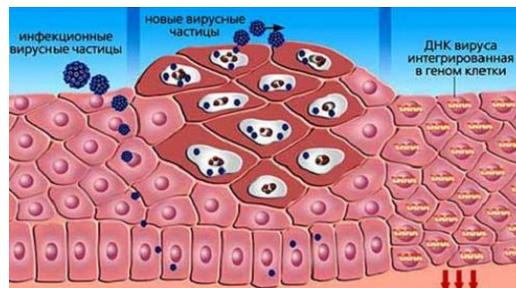
Значение других типов ВПЧ

По цитологическим заключениям



«Вирусная нагрузка»

- Относительный показатель тяжести процесса;
- Показатель персистенции вируса;
- Важный показатель при ведении пациентов после лечения CIN2+



Способы измерения

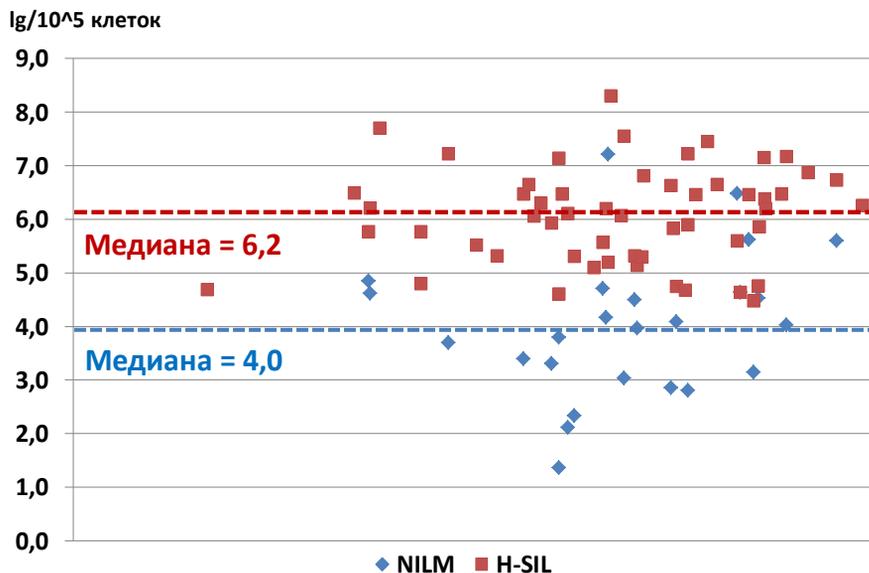
Абсолютная концентрация

- Копий ДНК ВПЧ в объеме образца (1 мл)

Относительная концентрация

- Копий (**Ig копий**) ДНК ВПЧ на клетку (геном)
 - на 1 клетку
 - На 10^3 клеток
 - **На 10^5 клеток**

Вирусная нагрузка при NILM и H-SIL



Валидация ВПЧ тестов, предназначенных для скрининга РШМ

Meijer et al. **Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women of 30 years and older** // *Int J Cancer*. 2009. 124(3).P. 516–52;

von Karsa et al., **European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination** // *Papillomavirus Res*. 2015. 22-31

- ✓ Валидация теста на ВПЧ должна быть проведена в сравнении с референтным ВПЧ тестом (в настоящее время в качестве такого теста предлагается использовать Hybrid Capture 2 HPV DNA Test) на образцах, полученных от женщин из скрининговой популяции;
- ✓ Чувствительность ВПЧ теста для выявления CIN2+ должна быть не ниже 90% по сравнению с референтным тестом при тестировании как минимум **60 проб от пациенток с CIN2+**;
- ✓ Специфичность ВПЧ теста для выявления CIN2+ должна быть не ниже 98% по сравнению с референтным тестом при тестировании как минимум **800 проб от пациенток с нормальной цитологией**

Зарегистрированные ВПЧ-тесты АмплиСенс валидированные для скрининга, адаптированные для жидкостных образцов

Набор реагентов	Выявляемые типы (возможность типирования)
АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL + АмплиСенс ВПЧ 16/18-FL (два теста)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (12 типов) (с определением количества и отдельным выявлением 16 и 18 типов)
	
НОВЫЕ ВПЧ-ТЕСТЫ АМПЛИСЕНС	
АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL (14 типов)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 (с определением количества и отдельным выявлением 16, 18 и 45 типов)
АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-титр-FL (14 типов)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 (с определением количества индивидуальных типов)

**Клинические испытания ВПЧ-теста:
высокая чувствительность для CIN2+,
высокая специфичность – введение количественного
порога и выделение 16 и 18 типов**

Тест	Чувствительность % (95% ДИ)	Специфичность % (95% ДИ)
ВПЧ-тест АмплиСенс (≥ 3 Ig)*	99,0 (95,2-100,0)	78,0 (74,8-81,1)

* ВПЧ-ВР-скрин + ВПЧ 16/18

Комарова Е.В., Минкина Г.Н., Гаврикова М.В. и др. 2010

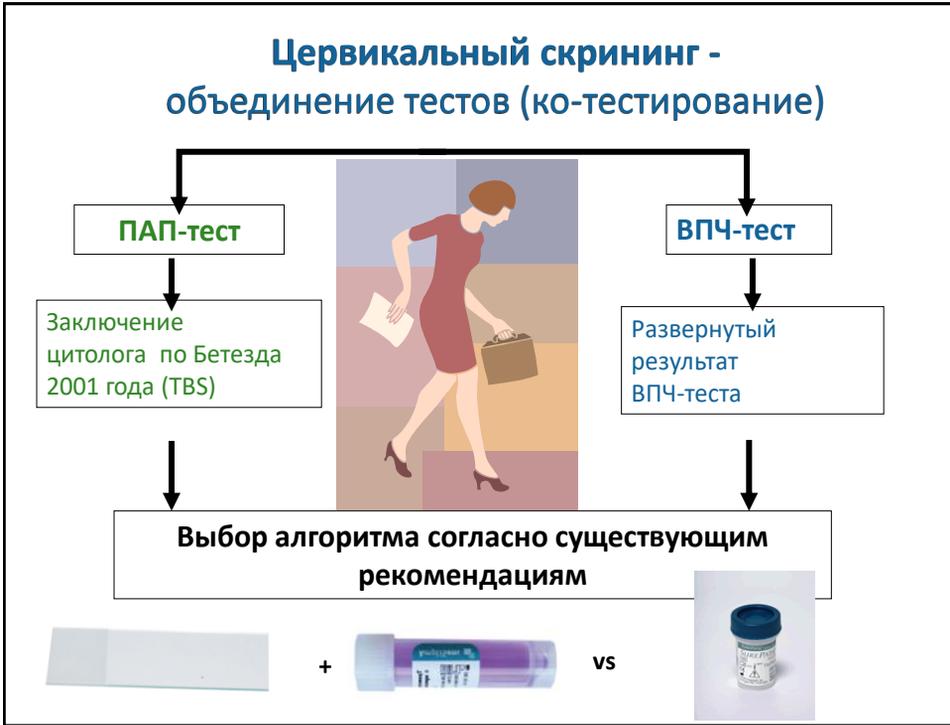
**Клиническая валидация ВПЧ-теста
согласно международным требованиям***

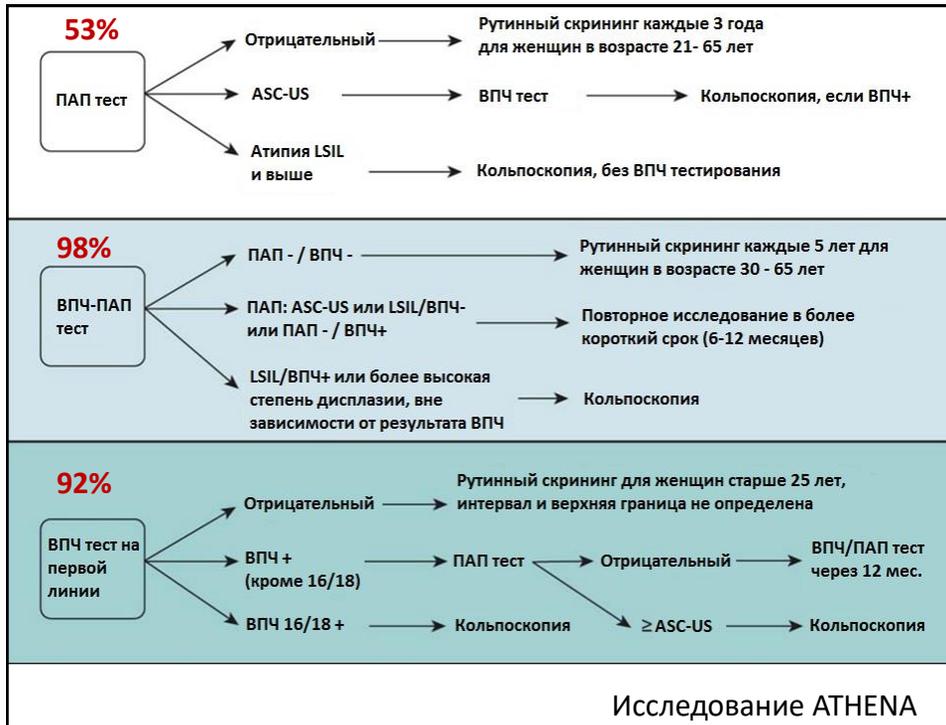
Шипулина О.Ю., Короленкова Л.И., Савичева А.М., и др.

Группа	ВПЧ-тест АмплиСенс	Hybrid Capture 2 test		Total
		Negative	Positive	
Контроль (<CIN2)	Negative	701	11	712
	Positive (≥ 3 Ig)	13	89	102
	Total	714	100	814
Случай (CIN2+)	Negative	1	0	1
	Positive (≥ 3 Ig)	2	71	73
	Total	3	71	74

- Клиническая **чувствительность** и **специфичность** ВПЧ-теста АмплиСенс - **98,7%** и **87,5%**,
- Клиническая **чувствительность** и **специфичность** HC2 (Digene HPV test) - **95,9%** и **87,7%**,
- Клиническая **чувствительность** и **специфичность** ВПЧ-теста АмплиСенс в сравнении с HC2 - **100%** и **98,2%** respectively.

41





ВПЧ-тест и выявление патологии в ПАП-тесте

ТЕСТ	N	Не-адекватных (%)	Недостаточно адекватных (%)	≥ ASC-US (%)	H-SIL (%)	нарушена суправитальная фиксация (%)
цитология (Лейшман)	2036	0,5%	1,3%	0,5%	0,1%	-
цитология (Папаниколау)	896	1,2%	14,7%	1,0%	0,2%	13,4%
ВПЧ-ПАП-тест (стекло+пробирка)	1835	1,9%	11,5%	4,4%	0,3%	3,4%
ПАП-тест жидкостный (ВПЧ-тест для сортировки)	6460	0,2%	2,6%	3,9%*	0,8%	-
ВПЧ-ПАП жидкостный	12800	0,2%	2,3%	10,3%	2,0%	-

* 252 случая, 250 были направлены на ВПЧ тест



Метод	Пример	Валидация	Характеристика
Генотипирование ВПЧ	Cobas 4800 Cervista (Hologic)	Крупные скрининговые исследования	Ограничение по генотипам
мРНК онкогенов	Aptima HPV (Genprobe) Proofer (NorChip)	Несколько больших исследований по наблюдениям	Зависит от типа ВПЧ
Выявление E6	OncoE6 (Arbor Vita)	Ограниченные данные	Зависит от типа ВПЧ
p16/Ki-67 цитология	CINtec PLUS (Roche Ventana)	Крупные исследования по наблюдениям	Не зависит от типа ВПЧ, на основе цитологического препарата
MCM2/Top2A cytology	ProExC (BD)	Ограниченные данные	Не зависит от типа ВПЧ, на основе цитологического препарата
3q	OncoFish (Ikonysis); FNACT (Cancer Genetics)	Ограниченные данные	Не зависит от типа ВПЧ, на основе цитологического препарата
Метилирование генов человека и вируса	Гены человека: CADM1, MAL, mir-24, EPB41L3, LMX1; Вирусные гены: L1, L2	Несколько больших исследований по наблюдениям	Гены человека: не зависит от типа ВПЧ Вирусные гены: Зависит от типа ВПЧ

TRIAGING HPV-POSITIVE WOMEN
 Nicolas Wentzensen M.D., Ph.D., M.S. Division of Cancer Epidemiology and Genetics. National Cancer Institute. Bethesda. USA

Благодарю за внимание!

