

Оригинальные исследования

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 616.5-006.52-022:578.827.12]-078:575

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕТА-ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ В КОЖЕ

А. Ю. Кладова¹, Д. А. Куведова², О. Ю. Шипулина², В. И. Киселев¹, В. А. Молочков¹

¹Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова; ²ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

На сегодняшний день роль вирусов папилломы человека (ВПЧ) рода beta в развитии эпителиальных опухолей и других пролиферативных заболеваний кожи (псориаз) остается не до конца выясненной. Нами была разработана количественная методика определения 25 генотипов папилломавирусов рода beta на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В ходе разработки методики и оценки ее аналитических характеристик использовали плазмидные положительные контроли типов 5, 8, 15, 20, 24, 37, 38, 49, 92 (M. Favre, E.-M. de Villiers). Для охвата всех представителей рода beta (виды beta 1, 2, 3, 4, 5) были разработаны четыре независимые системы олигонуклеотидов (группоспецифические праймеры и зонды). Олигонуклеотиды выбирали таким образом, чтобы число несоответствий с последовательностью выявляемых типов было минимально. Аналитическую чувствительность метода оценивали с использованием 10- и 2-кратных разведений контрольных ДНК, чувствительность составила для разных систем от 300 до 1250 копий ДНК ВПЧ/мл. Перекрестные реакции на типы ВПЧ других родов выявлены не были. Апробацию проводили на 41 клиническом образце, содержащем ДНК ВПЧ кожные типы, которые были выявлены с помощью разработанной методики и подтверждены методом прямого секвенирования. Проведенные количественные измерения свидетельствуют о повышенной вирусной нагрузке в патологических образцах кожи по сравнению со здоровой кожей. Для оценки точности количественных измерений значение нагрузки ДНК ВПЧ в клинических образцах, измеренное методом ПЦР в реальном времени, сравнивалось с вирусной нагрузкой, оцененной методом разведений. Разница в измерениях составила не более 0,5 lg, что свидетельствует о высокой точности проведенных по разработанному методу количественных измерений.

Ключевые слова: beta-папилломавирусы, вирусная нагрузка

DEVELOPMENT AND TESTING OF ASSAY FOR THE CONCENTRATION OF β -PAPILLOMAVIRUSES IN THE SKIN. A. Yu. Kladova, D. A. Kuevda, O. Yu. Shipulina, V. I. Kiselev, V. A. Molochkov

Today the role of cutaneous human papillomaviruses (HPV) of the subgenus β -papillomaviruses in the development of epithelial tumors and other proliferative skin diseases (psoriasis) is still unknown. A real-time polymerase chain reaction (PCR)-based assay has been developed to detect 25 genotypes of β -papillomaviruses. Plasmid controls of genotypes 5, 8, 15, 20, 24, 37, 38, 49, and 92 (M. Favre, E.-M. de Villiers) were used when the procedure was developed and its analytical characteristics were assessed. Four independent sets of oligonucleotides (group-specific primers and probes) were designed to cover all species (B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , and B_5) of β -papillomaviruses. The oligonucleotides were chosen so that the number of disagreements with the sequence of detectable types was minimal. The analytical sensitivity of the assay was evaluated, using 10- and 2-fold dilutions of control DNAs, and varied from 300 to 1250 HPV DNA copies per ml. There were no cross reactions to HPV genotypes of another subgenus. Tests were carried out using 41 clinical samples containing the cutaneous types of HPV, detected by the developed procedure and confirmed by direct sequencing. Quantifications indicated a higher viral load in the pathological skin samples than in the healthy skin ones. To assess the accuracy of measurements, the viral load estimated by real-time PRC was compared with that assessed by serial dilutions assay. The measurement difference was not more than 0.5 lg, indicating the high accuracy of measurements.

Key words: β -papillomaviruses, viral load.

Вирус папилломы является чрезвычайно распространенным инфекционным агентом, поражающим эпителий кожных покровов и слизистых оболочек. На сегодняшний день известно и охарактеризовано более 120 генотипов вирусов папиллом, инфицирующих человека, млекопитающих и птиц [2, 25]. Согласно последнему пересмотру классификации Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV), все вирусы папилломы относятся к семейству Papillomaviridae и объединены в 12 родов, обозначаемых греческими буквами. Внутривидовая классификация, основанная на

различии нуклеотидной последовательности генома вируса, делит представителей родов на виды (обозначаются греческой буквой и арабской цифрой) и типы (обозначаются арабскими цифрами). К родам, инфицирующим человека, относятся alpha-, beta-, gamma-, mu- и nu-папилломавирусы, и именно их принято обозначать термином "вирус папилломы человека" (ВПЧ). Подгруппа слизистых типов ВПЧ включает в себя большую часть рода alpha-папилломавирусов (старое таксономическое название "супергруппа генитальных типов", 11 видов), подгруппа кожных типов ВПЧ в основном

представлена родом beta-папилломавирусов (старое таксономическое название "супергруппа типов верруциформной эпидермодисплазии", 5 видов), а также включает в себя представителей родов gamma, nu, mu и некоторых представителей рода alpha [5, 8].

Филогенетические группы папилломавирусов согласуются с известным тканевым тропизмом и отличаются довольно высокой специфичностью в отношении инфицируемого типа ткани (табл. 1).

Наиболее частыми клиническими проявлениями папилломавирусной инфекции у человека являются генитальные бородавки, вызываемые слизистыми типами ВПЧ рода alpha. Представители этого рода (см. табл. 1) инфицируют также слизистые оболочки заднего прохода, ротоглотки, гортани, конъюнктивы, вызывая доброкачественные и диспластические изменения эпителия [2, 25]. На сегодняшний день ВПЧ признан одним из основных канцерогенных факторов, вызывающих эпителиальные опухоли слизистых оболочек у человека [12].

Кожные бородавки — второе по частоте проявление папилломавирусной инфекции. Их развитие связано с кожными типами ВПЧ, принадлежащими к родам gamma, nu, mu [8].

Нарастающий интерес к изучению кожных типов ВПЧ в последние годы связан с появлением косвенных указаний на роль вируса в развитии эпителиальных новообразований кожи (базально-клеточный рак кожи — БКР, плоскоклеточный рак кожи — ПРК, болезнь Боуэна, кератоакантома — КА, себорейный кератоз — СК, актинический кератоз — АК, а также дерматозов, характеризующихся повышенной пролиферацией эпителия (псориаз) [6, 9, 12, 25]. Предполагается, что наиболее значимыми в развитии данной патологии являются типы из рода beta-папилломавирусов, впервые обнаруженные у пациентов с верруциформной эпидермодисплазией Левандовского—Лутца (ВЭЛЛ) — наследственным дерматозом, при котором высокая восприимчивость к папилломавирусной инфекции приводит к развитию множественных плоских бородавок, в 30—60% случаев транс-

формирующихся в БКР или ПРК. При этом около 90% случаев малигнизации ассоциированы с детекцией типов 5, 8 и других типов beta-папилломавирусов [17]. Эти же типы обнаруживались с помощью различных методик в тканях кожных эпителиальных новообразований иммуносупрессивных и иммунокомпетентных больных БКР, ПРК, АК, КА, СК, псориазом, не страдающих ВЭЛЛ [4, 9, 10, 13, 22].

Несмотря на то что в исследованиях *in vitro* и на моделях экспериментальных животных была показана способность ВПЧ рода beta вызывать трансформацию клеток кожи, роль этих типов в этиопатогенезе эпителиальных опухолей кожи остается неясной [15]. Основной поток научной литературы, касающийся кожных типов ВПЧ, посвящен совершенствованию лабораторных методик выявления ДНК вирусов в тканях эпителиальных новообразований кожи и при других заболеваниях, характеризующихся повышенной пролиферацией эпителия. По данным независимых исследователей [4, 6, 9, 10, 13, 16, 22], частота обнаружения ДНК ВПЧ при различных патологиях кожи варьирует в значительных пределах, составляя 30—80% при ПРК, 25—87% при БКР, 55—87% при АК, 26—57% при КА, 35—90% при псориазе.

Несогласованность эпидемиологических результатов обусловлена различной чувствительностью используемых для обнаружения ДНК ВПЧ методов. Менее чувствительные методики, такие как гибридизационные техники, метод Саузерн-блота и др., способны выявлять только случаи высокой вирусной нагрузки [11]. Внедрение и совершенствование ПЦР в значительной мере повысило эффективность обнаружения вируса и как следствие — выявляемость его при патологиях кожи. Однако и в этом случае результат исследования во многом зависит от чувствительности и специфичности используемых олигонуклеотидов (праймеров и зондов) и условий амплификации [4, 11, 18]. Использование большинством авторов универсальных праймеров с высокой степенью вырожденности, связывающихся с низкой избирательностью с ДНК-матрицей, приводит к значительной вари-

Заболевания, ассоциированные с ВПЧ [5, 8, 22, 25]

Таблица 1

Тип ВПЧ	Род	Заболевания
16*, 18*, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (высокий риск)	Alpha	Дисплазия и рак шейки матки, вульвы, влагалища, ануса, полового члена
6*, 11*, 42, 43, 44 (низкий риск)	Alpha	Аногенитальные бородавки, гигантская кондилома Бушке—Левенштейна, ювенильный папилломатоз гортани, папилломатоз гортани взрослых
1, 2, 3, 4, 7, 10, 28, 41	Gamma, mu, nu, alpha	Кожные бородавки (вульгарные, ладонно-подошвенные, плоские, бородавки "мясников", мозаичные)
5*, 8*, 15, 38 и др.	Beta	Верруциформная эпидермодисплазия Левандовского—Лутца
5, 8, 12, 14, 20, 21, 19, 25, 47, 36, 24, 93, 9, 15, 17, 22, 23, 38, 37, 80, 49, 75, 76, 92, 96	Beta	Доброкачественные и злокачественные эпителиальные новообразования кожи: базально-клеточный рак, плоскоклеточный рак, актинический кератоз, болезнь Боуэна, кератоакантома, себорейный кератоз, Псориаз

Примечание. * — наиболее значимые в развитии патологий типы ВПЧ.

бельности чувствительности методик и высокой вероятности амплификации неспецифических продуктов (например, ДНК человека), принимаемых при анализе за специфические, т. е. за ВПЧ [16, 22]. Наглядным примером в данном случае являются результаты группы исследователей [18], сравнивавших две опубликованные праймерные системы, апробированные на одной серии клинических образцов: конкордантность результатов составила 25%.

С другой стороны, выявление ВПЧ в эпителиальных опухолях кожи и псориатических очагах не позволяет сделать вывод о значимости вируса в их развитии. Присутствие вируса в патологических образцах кожи может быть следствием контаминации или независимой бессимптомной персистенции, характерной для условно-патогенных инфекционных агентов, какими являются ВПЧ [11]. Так, по результатам ряда работ [3, 21], кожные ВПЧ обнаруживаются в образцах кожи и устьях волосяных фолликулов здоровых людей в 35—70% случаев. Важным показателем в данной ситуации становится вирусная нагрузка. Возможность определять количество ВПЧ в исследуемом материале является одним из современных требований к ДНК-диагностике и позволяет отличить активное участие вируса в развитии патологии от бессимптомной персистенции [23, 24]. К наиболее перспективным и простым методам количественной оценки ДНК ВПЧ относится ПЦР в режиме реального времени, принципиальная особенность которой заключается в наличии линейной зависимости кинетики накопления флюоресцентного сигнала от концентрации специфической ДНК [1, 23].

Целью нашего исследования явились разработка и апробация методики количественного определения ДНК 25 генотипов ВПЧ рода beta с использованием ПЦР в режиме реального времени. Для этого предполагалось использовать формат, позволяющий в нескольких постаповках ПЦР выявлять большое разнообразие генотипов beta-папилломавирусов и ДНК человека (β -глобиновый ген) в качестве эндогенного контроля (контроль забора, транспортировки, хранения, выделения ДНК и проведения ПЦР), повышающего достоверность анализа, а также позволяющего проводить нормирование количества вируса на количество клеток человека.

Материалы и методы

Пациенты и клинический материал

Апробацию разработанной методики проводили на 64 клинических образцах кожи, полученных от 54 больных в возрасте от 35 до 78 лет, находившихся на обследовании в отделении дерматовенерологии и дерматоневрологии МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, в том числе 15 больных БРК кожи, 7 больных ПРК, 7 больных АК, 15 больных псориазом, а также 20 клинических образцах, полученных от 20 практически здоровых людей в возрасте от 25 до 75 лет. Всем больным проводили комплексное обследование, включавшее общий анализ крови и мочи, функциональные пробы печени, биохимиче-

ские анализы плазмы крови, при необходимости — ЭКГ, рентгеноскопию органов грудной клетки и др., позволявшие исключить тяжелую соматическую патологию и условно очертить круг иммунокомпетентных пациентов, включенных в исследование. Критерием исключения были состояния, сопровождающиеся выраженной иммуносупрессией: онкологические заболевания внутренних органов и крови, тяжелые системные заболевания, инфекционный гепатит В и С, ВИЧ-инфекция, состояния после трансплантации внутренних органов. Во всех случаях БРК, ПРК и АК диагноз был подтвержден гистологически. Диагноз псориаза устанавливали на основании анамнестических и клинических данных. Группу здоровых составили добровольцы, у которых кожные заболевания, в том числе ассоциированные с кожными типами ВПЧ (бородавки), отсутствовали.

Материалом для исследования служили: биоптаты патологически измененной или нормальной кожи размером 0,2 × 0,2 см, полученные с помощью малоинвазивной модификации взятия биопсии бритвенным способом; соскобы эпителиальных клеток кожи, полученные методом скарификации. Последний метод использовали только для взятия материала из зон новообразований (БРК, ПРК, КА) или псориаза, где имелись нарушения сцепления между клетками и скарификация обеспечивала получение достаточного количества клеточной массы.

Манипуляции проводили в стерильных условиях под местной анестезией (взятие биоптатов) 2% раствором новокаина.

Исследуемый материал помещали в отдельные пробирки, содержащие 1 мл транспортной среды — ФСБ (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Для максимального сохранения количества клеточной и вирусной ДНК сразу после взятия материала пробирки замораживали и хранили до проведения ПЦР при -70°C .

Панель контрольных образцов ДНК ВПЧ

Для разработки методики количественного определения ВПЧ рода beta, а также оценки ее аналитических характеристик использовали рекомбинантные плазмидные контроли, содержащие последовательность полных геномов ВПЧ кожных типов (род alpha, gamma, mu, nu и beta) — 1, 3, 4, 5, 7, 8, 15, 20, 24, 27, 37, 38, 49, 50, 65, любезно предоставленных проф. Michel Favre (Institut Pasteur, Unite Postulante Genetique, Papillomavirus et Cancer Humain, Франция) и проф. Ethele-Michele de Villiers (Abteilung tumovirus-Charakterisierung Referenzzentrum für Humanpathogene Papillomviren, Германия), контрольные плазмиды ДНК ВПЧ слизистых типов (род alpha) — 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, а также контрольные плазмиды фрагмента β -глобинового гена человека, разработанные в ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Положительные контроли ДНК ВПЧ представляли собой плазмидные векторы, в каждый из которых клонирован геном ВПЧ одного из указанных типов. Каждая плаزمиды имела в своем составе практически полную последователь-

ность одного из типов ВПЧ. Рекомбинантный плазмидный контроль ДНК человека содержал фрагмент β-глобинового гена человека.

Измерение концентраций контролей

Исходная концентрация контрольной ДНК для каждого типа ВПЧ была определена путем предельных разведений по методу Rodrigo [20]. В соответствии с требованиями метода были выбраны олигонуклеотиды на область *bla*-гена, присутствующего во всех контрольных плазидах. Измерение концентрации проводили трехкратно в 10-кратных рядах разведений. Точки с концентрацией порядка 10 копий ДНК в ПЦР и менее исследовали в 7 повторах.

Экстракция нуклеиновых кислот

После размораживания клеточную массу (биоптаты или соскобы) осаждали центрифугированием; к осадку клеток добавляли лизирующий буфер с тиоцианатом гуанидина, содержащий 0,1 мг/мл протеиназы К; далее пробирки инкубировали при 60°C в течение 6 ч. Выделение ДНК проводили из 400 мкл клеточного лизата методом аффинной сорбции на силикагеле с использованием набора для выделения Amplisens "ДНК-сорб-С" согласно инструкции производителя (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Элюцию проводили в 100 мкл ТЕ-буфера (10 мм трис-НСl, 1 мм ЭДТА, рН 8,0). Образцы, содержащие очищенную ДНК, использовали в реакции амплификации.

Проведение ПЦР

Для охвата всех представителей ВПЧ рода beta использовали четыре независимые системы олиго-

нуклеотидов (группоспецифические праймеры и зонды): 1-я (А) — для выявления генотипов вида beta 1 (типы 5, 8, 12, 14, 21, 19, 25, 47, 36); 2-я (В) — для выявления генотипов вида beta 2 (типы 9, 15, 17, 22, 23, 38, 37, 80); 3-я (С) — для выявления генотипов вида beta 3 (типы 49, 75, 76); 4-я (D) — для выявления генотипов beta 1 (типы 20, 24, 93), beta 4 (тип 92), beta 5 (тип 96) (табл. 2).

Праймеры и зонды для амплификации ДНК ВПЧ вида beta 1 находились в области гена *E1* (типы 5, 8, 12, 14, 21, 19, 25, 47, 36) и *E2* (типы 20, 24 и 93), видов beta 2 и beta 3 — в области гена *E7*, видов beta 4 и beta 5 — в области гена *E2*.

Последовательности всех олигонуклеотидов для 25 типов ВПЧ рода beta были выбраны при анализе известных последовательностей ВПЧ, взятых из Интернет-ресурса "NCBI GeneBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и обработаны с помощью программы AlignX пакета Vector NTI 6 (InforMax Inc., 2000).

Для оценки наличия геномной ДНК человека в исследуемых образцах (принцип внутреннего контроля) были выбраны пара праймеров и зонд к последовательности β-глобинового гена человека (табл. 3). В случае правильного забора, транспортировки, хранения материала, выделения ДНК и проведения ПЦР регистрировался сигнал амплификации β-глобинового гена человека.

Выявление ДНК ВПЧ в подготовленных образцах проводили в мультиплексном формате, в четырех пробирках. Каждая пробирка содержала одну из групп олигонуклеотидов для выявления ВПЧ (А, В, С, D), а также олигонуклеотиды для выявления β-глобинового гена человека.

В состав реакционных смесей для ПЦР входили: ПЦР-буфер (66 мМ трис-НСl, рН 8,8; 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 4 мМ MgCl₂; 0,01% твин-20), смесь де-

Таблица 2

Олигонуклеотиды для выявления ВПЧ рода beta

Группа олигонуклеотидов*	Вид ВПЧ	Тип ВПЧ	Ген	Длина ампликона	Последовательность 5'—3'	Концентрация, мкМ
A	Beta 1 (кроме 20, 24, 93)	5, 8, 12, 14, 20, 21, 19, 36, 47	<i>E1</i>	204	¹ s1 GAGGAGCAATTACAAAA (A/T) CTAACGAAAG s2 GGAGCA (A/T) TTGCAAAAACGAAAG ² As TCTAT-AGCCGGTACCTCCACGTC A ³ R6G-CCGCTGTCT-GCTCTGCAAAGAGCC- ⁴ BHQ1	0,10 0,10 0,20 0,05
B	Beta 2	9, 15, 17, 22, 23, 38, 37, 80	<i>E7</i>	300 или 409	s1 CGATAG (A/G) ATGATTGGGAAAGAAGCTA s2 GCAAT-AGAATGATTGGGAAACAAGCTA As1 CGTCAAATAA (C/A) TTTCCAAATCACCATCT As2 CATTGCCAAT (G/C) TCT-TCTCGACAG R6G-CTTGTCCAGCCCA (T/C) TGACCT-GCATTG-BHQ2 R6G-TTGTC A (G/A) CCCATTGCTGAC-CTGC-BHQ2	0,20 0,20 0,10 0,10 0,05 0,05
C	Beta 3	49, 75, 76	<i>E7</i>	164	s1 AGAAATAGGTGGAAAGGGGTGTGTAG s2 GGAGCTT-GGAAGGCAGTGTGTAG As1 GCCTTG (G/A) ATAAGCTC-CTCGTCTG As2 GGCTCCTCCTCCTGATTTTCTGA R6G-CAGGTCAATGGGCTGGCCAAACTCT-BHQ2 R6G-CAG-GTCAATGGGCTGGACAAGGTCT-BHQ2	0,20 0,20 0,15 0,15 0,05 0,05
D	Beta 1 beta 4, beta 5	20, 24, 92, 93, 96	<i>E2</i>	124	s1 AGCTTACTGACCAAAGCTGGAATCTT As1 CACTAG-CAACTCATAAATGTTTCATTAG As2 TGGTGCAGACTCAT-AAATGTTTCATTAG As3 CACTGCCTTGTTCATAAATGT-TCATTAG As4 TGAACGCTGGTTCAGAGCCTCCAT As5 TGAACCGTCTGAGAGCCTCCAT R6G-AGTGACCAA-GAAGACGAGGGAGAGG-BHQ1	0,20 0,10 0,10 0,10 0,10 0,05

Примечание. * — ПЦР проводили в мультиплексном формате; в каждую смесь (А, В, С, D) брали все олигонуклеотиды, указанные в соответствующих графах таблицы. ¹s1 — прямой праймер; ²As — обратный праймер; ³R6G — флуоресцентный краситель; ⁴BHQ1 — тушитель флуоресценции.

Таблица 3
Олигонуклеотиды для амплификации β-глобинового гена человека

Праймеры/зонд	Олигонуклеотид	Последовательность 5'—3'
Прямой праймер	Glob 1	GTC-AGG-GCA-GAG-CCA-TCT-ATT-GCT
Обратный праймер	Glob 2	CCA-CAT-GCC-CAG-TTT-CTA-TTG-GTC-T
Зонд	Glob 3	¹ Fam-ACC-TCA-AAC-AgA-CAC-CAT-ggT-gCA-CCT- ² BHQ-1

Примечание. ¹Fam — флюоресцентный краситель; ²BHQ1 — тушитель флюоресценции.

зокси-нуклеотидтрифосфатов, каждый 0,2 мМ; праймеры и зонды в концентрации от 0,2 до 1,6 пмоль/мкл ("Синтол", Москва); ДНК TaqF-полимераза (2 ЕД в реакцию) (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва); ДНК-проба; общий объем 25 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе Mx3000P ("Stratagene", США). Режим ПЦР был следующим: предварительный этап — 95°C в течение 15 мин, далее 50 циклов ПЦР: денатурация в течение 25 с при 95°C; отжиг в течение 30 с при 60°C, элонгация в течение 1 мин при 65°C.

Для адекватной оценки результатов ПЦР использовали несколько видов контролей. Положительный контроль представлял собой амплификацию контрольных плазмид типов 5, 8, 15, 37, 38, 49, 24, 20 в концентрации 10⁴ копий/мл. Отрицательный контроль представлял собой обычную реакционную смесь, в которую вместо образца ДНК добавляли чистый ТЕ-буфер. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию β-глобинового гена.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли путем измерения флюоресцентного сигнала, нарастающего по мере накопления специфического продукта реакции. Результат амплификации ДНК ВПЧ во всех четырех системах регистрировали по каналу флюоресценции Joe, результат амплификации внутреннего контроля — по каналу Fam. Получаемая зависимость интенсивности флюоресценции от цикла реакции — кривая флюоресценции — имела в случае положительной реакции характерный S-образный вид. В соответствии с этим проводили качественную оценку результатов реакции.

Количественный анализ основывался на линейной зависимости величины порогового цикла (цикл начала увеличения флюоресценции) от исходной концентрации ДНК ВПЧ в образце. Для количественного анализа использовали 10-кратные разведения (6 lg — 1 lg) положительных плазмидных контролей типов 5, 8, 15, 37, 38, 20, 24, 49 ВПЧ и ДНК человека (стандарты).

Результаты и обсуждение

Определение аналитической специфичности и чувствительности метода

Для разработанной методики была проведена оценка аналитической специфичности и чувствительности.

Аналитическую специфичность оценивали по отсутствию перекрестных реакций на представителей соседних родов ВПЧ (alpha, gamma, mu, nu), представителей соседних видов ВПЧ из рода beta, ДНК человека, а также S.aureus, S. pyogenus, Ps. aeruginosa, E. coli, U. urealiticum, C.trachomatis, G.vaginalis, T.vaginalis. С этой целью использовали высококонцентрированные (10⁸ копий ДНК г/мл) плазмидные положительные контроли ДНК ВПЧ слизистых типов (род alpha): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82; плазмидные контроли ДНК ВПЧ кожных типов (род alpha, gamma, mu, nu и beta): 1, 3, 4, 7, 50, 65, 5, 7, 8, 15, 20, 24, 37, 38, 49; ДНК человека и ДНК, полученную из культур бактерий (10⁸ копий ДНК/мл). При исследовании перекрестных реакций выявлено не было. Специфичность метода была подтверждена секвенированием, с помощью которого определяли нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов ВПЧ, выявленных в 12 клинических образцах патологически измененной кожи. Было показано, что выявляемый положительный сигнал относился к ВПЧ рода beta (выявленные типы: из группы А — 8, 14, 36; из группы В — 15, 23, 38; из группы С — 75, 49; из группы D — 20, 24, 92).

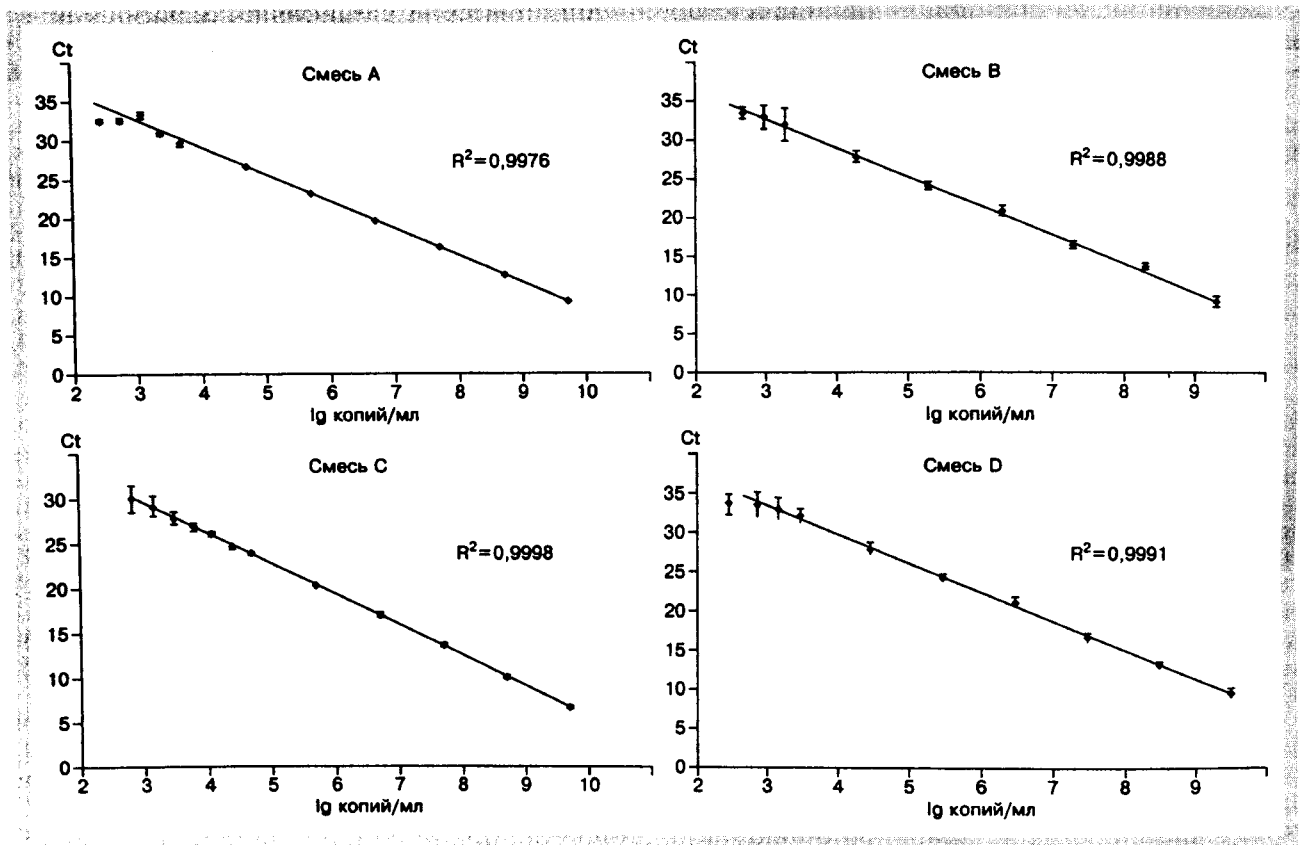
Аналитическую чувствительность метода оценивали с использованием 10-кратных разведений контрольной панели ДНК ВПЧ типов 7, 8, 15, 20, 24, 37, 38, 49. После определения последнего подходящего разведения осуществляли серию 2-кратных разведений из этой точки. Далее определяли последнее 100% проходящее разведение (6 точек из 6), которое и считали порогом аналитической чувствительности. Аналитическая чувствительность составила: для смеси А — 1250 копий ДНК ВПЧ/мл, для смеси В — 1000 копий/мл, для смеси С — 450 копий/мл, для смеси D — 300 копий/мл. Полученные величины аналитической чувствительности позволяли выявлять (при использовании описанной методики пробоподготовки) не менее 2500 вирусных частиц в клиническом образце.

Линейный диапазон

Для разработанных систем выявления ДНК ВПЧ beta-папилломавирусов было проведено исследование наличия линейной зависимости между логарифмом концентрации исходной ДНК-матрицы в образце и циклом начала увеличения флюоресценции (пороговым циклом). Такая зависимость лежит в основе проведения количественных измерений для ПЦР в режиме реального времени.

На рисунке приводятся результаты эксперимента с 10- и 2-кратными разведениями контрольных ДНК, соответствующих четырем системам олигонуклеотидов, и график линейной зависимости порогового цикла от логарифма концентрации.

На рисунке видно, что данные зависимости имеют линейный характер в диапазоне: для смеси А — от 2,5 · 10³ (3,4 lg) до 10⁹ (9 lg) копий/мл, для смеси В — от 5 · 10² (2,7 lg) до 2 · 10⁷ (7,3 lg) копий/мл, для смеси С — от 7 · 10² (2,8 lg) до 10⁷ (7 lg) копий/мл, для смеси D — от 5 · 10² (2,7 lg) до 2 · 10⁷ (7,3 lg) копий/мл. Коэффициент корреляции (R²) во всех случаях более 0,99.



Корреляция логарифма концентрации ДНК ВПЧ и порогового цикла (Ct) в разработанных системах олигонуклеотидов.

Оценка качества образцов по наличию геномной ДНК человека

Качество клинических образцов (качество забора, транспортировки, хранения, выделения) было оценено по количеству геномной ДНК, определяемой в ходе ПЦР. Для этого параллельно с амплификацией участков генома ВПЧ проводили амплификацию β -глобинового гена человека. По стандартам определяли количество ДНК β -глобина, попавшего в реакцию. Медиана концентрации ДНК человека составила 7,11 lg/мл. Разброс значений (процентили 2,5 и 97,5) составил 5,31—8,58 lg/мл. С учетом данных о количестве ДНК человека в образцах и аналитической чувствительности метода ($3 \cdot 10^2$ — $1,2 \cdot 10^3$ копий ДНК/мл) чувствительность выявления ДНК ВПЧ в клинических образцах составила в среднем 6,2 копии ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток человека при разбросе (процентили 2,5 и 97,5) 0,2—391,8 ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток человека. Для дости-

жения чувствительности не менее чем 100 копий ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток человека нами было введено ограничение на минимальное количество клеток человека в образце, которое составило 5,9 lg ($8,0 \cdot 10^5$) копий ДНК человека/мл. С учетом полученных данных все образцы, содержащие менее чем 5,9 lg ДНК человека/мл, считались невалидными.

Апробация на клинических образцах

Все образцы кожи больных БКР, ПКР, АК, псориазом, а также образцы нормальной кожи были первоначально протестированы на присутствие ДНК ВПЧ рода beta (табл. 4).

Представленные данные свидетельствуют о том, что рак кожи (ПКР, БКР), предшествующие ему состояния (АК) и другие гиперпролиферативные заболевания кожи (псориаз) в высоком проценте случаев ассоциированы с ВПЧ. Наряду с этим ВПЧ

Таблица 4

Выявляемость ДНК ВПЧ рода beta в образцах с различными клиническими диагнозами

Диагноз	Количество образцов	Количество ВПЧ + образцов, %	Распределение по видам среди ВПЧ + образцов
Базально-клеточный рак	15	11 (73,3)	Beta1 — 9 Beta2 — 5 Beta3, 4, 5 — 4 Смешанные — 9
Плоскоклеточный рак	7	5 (71,4)	Beta 1 — 5 Beta 2 — 4 Beta 3, 4, 5 — 3 Смешанные — 4
Актинический кератоз	7	7 (100)	Beta 1 — 3 Beta 2 — 5 Beta 3, 4, 5 — 4 Смешанные — 7
Псориаз	15	10 (66,6)	Beta 1 — 7 Beta 2 — 10 Beta 3, 4, 5 — 5 Смешанные — 10
Норма	20	8 (40)	Beta 1 — 4 Beta 2 — 4 Beta 3, 4, 5 — 2 Смешанные — 2

Таблица 5

Средние вирусные нагрузки ДНК ВПЧ в образцах с различными клиническими диагнозами

Диагноз	Количество образцов (все ВПЧ+)	Медиана и разброс концентрации, lg ДНК ВПЧ/мл (2,5; 97,5 перцентиль)
Базально-клеточный рак	11	2,09 (0,48; 6,09)
Плоскоклеточный рак	5	2,42 (0,78; 2,87)
Актинический кератоз	7*	4,11 (2,97; 6,19)
Псориаз	10	2,22 (0,33; 3,75)
Норма	8	1,2 (0,42; 2,40)

Примечание. * — $p < 0,005$ (критерий Манна—Уитни).

рода beta также довольно часто обнаруживается в образцах здоровой кожи (45%). Виды beta 1 и beta 2 входят в разряд наиболее распространенных ВПЧ рода beta, обнаруживаемых в очагах эпителиальных опухолей кожи и псориаза. В ВПЧ-положительных образцах ПКР, БКР, АК и псориаза имеет место ассоциация нескольких видов ВПЧ рода beta, тогда как в здоровой коже преимущественно выявляется один вид ВПЧ рода beta. Полученные нами при использовании разработанной методики тенденции не противоречат данным зарубежных исследователей, использовавших для обнаружения ВПЧ в коже высокочувствительные и высокоспецифичные неколичественные методы ПЦР-анализа [4, 7, 11, 13, 19]. Это, с одной стороны, позволяет использовать наш метод выявления ВПЧ рода beta в дальнейшем для изучения ВПЧ-ассоциированных заболеваний кожи, с другой — еще раз подчеркивает необходимость проведения количественного анализа с определением вирусной нагрузки ДНК ВПЧ.

В результате проведенного количественного анализа (табл. 5) было установлено, что средние показатели вирусной нагрузки ДНК ВПЧ в ВПЧ-положительных эпителиальных новообразованиях кожи и псориазе превышали средние показатели вирусной нагрузки ДНК ВПЧ в нормальной коже, что, с нашей точки зрения, может свидетельствовать об активации ВПЧ в анализируемых образцах кожи с патологическими изменениями. В этой связи количественное измерение вирусных частиц позволяет более точно судить о характере присутствия

вируса и может рассматриваться как предпочтительный метод для изучения связи вируса с развитием, течением или прогрессированием заболевания.

Для оценки точности количественных измерений проведено сравнение значения концентраций ДНК ВПЧ, полученных в ПЦР в режиме реального времени и методом 5-кратных разведений. С этой целью проводили 5-кратное разведение ВПЧ положительных клинических образцов (по 4 из каждой группы — А, В, С, D) и пробы из ряда разведений брали в ПЦР. Концентрация ДНК ВПЧ в последнем проходящем разведении считалась равной порогу чувствительности метода (см. выше). В соответствии с этим рассчитывали концентрацию ВПЧ в исходной точке и сравнивали с результатом количественных измерений, полученных в ПЦР (табл. 6). При двух подходах измерения концентрации различия были не более чем на 0,5 lg, что свидетельствовало о высокой точности проведенных количественных измерений.

Заключение

Таким образом, с учетом современных требований к генодиагностике папилломавирусной инфекции нами была разработана методика выявления и количественного определения 25 генотипов ВПЧ рода beta, причастных к развитию эпителиальных новообразований и других гиперпролиферативных состояний кожи.

В ходе проведенных исследований получены высокие аналитические характеристики метода, позволяющие выявлять не менее 2500 вирусных частиц в клиническом образце.

Апробация на клинических образцах кожи показала высокий процент выявления ДНК ВПЧ, преобладание среди них представителей видов beta 1 и beta 2, а также преимущественное развитие в патологически измененном эпителии кожи микстинфекции, что не противоречит ранее описанным данным, полученным при использовании высокочувствительных неколичественных методов ПЦР-анализа [4, 7, 11, 13, 19]. Это позволяет использовать наш метод для выявления ВПЧ рода beta в

Таблица 6

Оценка точности количественных измерений

Группа ВПЧ	№ образца	I. Концентрация ДНК ВПЧ, измеренная методом разведений, lg	II. Концентрация ДНК ВПЧ, измеренная в ПЦР в реальном времени, lg	$\Delta \lg_{(I-II)}$
A	1	1,80	1,47	0,33
	2	2,49	2,71	-0,22
	3	1,80	1,87	-0,07
B	4	2,49	1,81	0,68
	5	1,70	1,23	0,47
	6	3,10	2,63	0,47
	7	2,40	2,08	0,32
C	8	1,85	2,05	-0,2
	9	2,05	1,82	0,23
	10	2,05	1,85	0,19
	11	0,65	0,67	-0,02
D	12	2,05	2,04	0,01
	13	1,57	1,68	-0,10
	14	0,87	0,82	0,05
	15	0,17	0,49	-0,32
	16	2,85	2,45	0,4

дальнейшем с целью изучения ВПЧ-ассоциированных заболеваний кожи.

Примененный нами количественный анализ позволил обнаружить повышение вирусной нагрузки в образцах кожи БКР, ПКР, АК и псориаза по отношению к нормальной коже, причем для АК отличия имели достоверный характер. Можно предполагать, что повышенная вирусная нагрузка, определяемая в эпителиальных опухолях кожи и типичных псориазных очагах, может являться важным молекулярным маркером, указывающим на активное участие вируса в их развитии.

Приведенные данные свидетельствуют о важности нового диагностического подхода для изучения связи ВПЧ рода beta с развитием эпителиальных опухолей кожи и других кожных заболеваний, сопровождающихся повышенной пролиферацией эпителия. Проведение дальнейших исследований, основанных на количественном выявлении ВПЧ в репрезентативных выборках различных кожных патологий, позволит более глубоко судить о связи ВПЧ с их развитием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Екимов А. Н., Шипулин Г. А., Бочкарев Е. Г., Рюмин Д. В. Новейшие технологии в генодиагностике: полимеразно-цепная реакция в реальном времени (Real-time PCR) // Вестн. последиплом. мед. образования. — 2001. — № 3. — С. 38—41.
2. Молочков В. А., Киселев В. И., Рудых И. В., Щербо С. П. Папилломавирусная инфекция: клиника, диагностика, лечение. — М., 2004.
3. Astori G., Lavergne D., Benton C. et al. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts // J. Invest. Dermatol. — 1998. — Vol. 110. — P. 752—755.
4. Berkhout R., Tieben L., Smits H. et al. Nested PCR approach to detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients // J. Clin. Microbiol. — 1995. — Vol. 33. — P. 690—695.
5. Bernard H. The clinical importance of the nonmenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 32. — P. 325—331.
6. de Jong-Tieben L., Berkhout R., ter Schegget J. The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer // Transplantation. — 2000. — Vol. 69. — P. 44—49.
7. de Villiers E., Ruhland A., Sekaric P. Human papillomaviruses in non-melanoma skin cancer // Semin. Cancer Biol. — 1999. — Vol. 9. — P. 413—422.
8. de Villiers E., Faquet C., Broker T. et al. Classification of papillomaviruses // Clin. Virol. — 2004. — Vol. 324. — P. 17—27.
9. Favre M., Orth G., Majewski S. et al. Psoriasis, a possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of Epidermodysplasia verruciformis // J. Invest. Dermatol. — 1998. — Vol. 110. — P. 311—317.
10. Forslund O., Antonsson A., Nordin P. et al. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin // J. Gen. Virol. — 1999. — Vol. 80. — P. 2437—2443.
11. Forslund O., Lindelof B. et al. High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of the skin tumors but not in "stripped" biopsies from the same tumors // J. Invest. Dermatol. — 2004. — Vol. 123. — P. 388—394.
12. Harwood C., McGregor J., Proby C., Breuer J. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer // J. Clin. Pathol. — 1999. — Vol. 52. — P. 249—253.
13. Harwood C., Spink P., Suretheran T. et al. Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for the detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. — P. 3545—3555.
14. Herrington C., Anderson S., Bauer H. et al. Comparative analysis of human papillomavirus detection by PCR and non-isotopic in situ hybridization // J. Clin. Pathol. — 1995. — Vol. 48. — P. 415—419.
15. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Humans. Human papillomaviruses. — Lyon, 2005. — Vol. 90.
16. Ifiner A., Klug S., Garbe C. et al. The prevalence of HPV genotypes in non-melanoma skin cancer of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors // Cancer Res. — 2003. — Vol. 63. — P. 7515—7519.
17. Majewski S., Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin // Arch. Dermatol. — 1995. — Vol. 131. — P. 1312—1318.
18. Meyer T., Arndt R., Christophers E. et al. Frequency and distribution of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depends upon the HPV detection system: a comparison of four PCR assays // Dermatology. — 2000. — Vol. 201. — P. 204—211.
19. Pfister H., Futchs P., Majewski S. et al. High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population // Arch. Dermatol. Res. — 2003. — Vol. 295. — P. 273—279.
20. Rodrigo A., Goracke P., Rowhanian K. et al. Quantitation of target molecules from PCR-based limiting dilution assays // AIDS Res. Hum. Retrovirus. — 1997. — Vol. 13. — P. 737—742.
21. Strujik L., Bavinc J., Wannigen P. et al. Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with history of cutaneous squamous cell carcinoma // J. Invest. Dermatol. — 2003. — Vol. 121. — P. 1531—1535.
22. Suretheran T., Harwood C., Spink P. et al. Detection and typing of human papillomaviruses in mucosal and cutaneous biopsies from immunosuppressed and immunocompetent patients and patients with epidermodysplasia verruciformis: a unified diagnostic approach // J. Clin. Pathol. — 1998. — Vol. 51. — P. 606—610.
23. Weissenborn S., Funke A., Helmich M. et al. DNA loads of oncogenic human papillomaviruses are strongly elevated in HIV-positive women with high grade cervical lesions // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 2763—2767.
24. Weissenborn S., Nidi I., Purdie K. et al. Human papillomavirus-DNA-loads in actinic keratoses exceeded those in non-melanoma skin cancer // J. Invest. Dermatol. — 2005. — Vol. 125. — P. 93—97.
25. zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — Vol. 1288. — P. 55—78.

Поступила 10.01.07