MODERN MEDICINE AND PRACTICE
https://inovatus.es/index.php/ejmmp
EUROPEAN JOURNAL OF MODERNMEDICINEAND PRACTICE
Vol. 4 No. 4 (Apr - 2024) EJMMP ISSN: 2795-921X

К ВОПРОСУ ИЗУЧЕНИЯ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Адильгереева Мадина Искандеровна
Ассистент, кафедры кожных и венерических болезней, детских кожных и венерических болезней, СПИД, Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт г. Ташкент

Аннотация: Мы использовали методы исследования вируса папилломы человека в диагностики и лечения заболеваний. что дает к использованию их в профилактики этого заболевания.

Ключевые слова: анализ, аспекты, вирус, папилломы, диагностика.

Вирус папилломы человека (ВПЧ) – это на сегодня наиболее распространенная вирусная инфекция, а семейство ВПЧ на данный момент насчитывает более 200 генотипов.

Типы ВПЧ низкого риска, которые вряд ли могут вызвать рак, включают ВПЧ 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70 и 72. Типы высокого риска ВПЧ чаще связаны с раком и включают типы,

Большинство инфекций, вызванных ВПЧ, носят субклинический характер. У очень маленьких детей (младше четырех лет) видимые проявления инфекции ВПЧ могут включать острую кондилому. Поражения полости рта включают обыкновенные бородавки, папилломы, кондиломы и очаговую эпителиальную гиперплазию. Большинство этих поражений (75%) являются результатом ВПЧ 6 и 11. Ювенильный или юношеский рецидивирующий респираторный папилломатоз является редким, более серьезным проявлением инфекции. По оценкам специалистов, это заболевание встречается у 4,3 на 100 000 рождений, вызывается инфекцией ВПЧ типа 6 или 11 и наиболее вероятно возникает у первенцев, рожденных естественным путем, женщинами в возрасте до 20 лет.

Способы передачи вируса у детей различные, включая перинатальную передачу, ауто- и гетероинокуляцию, сексуальное насилие и, возможно, косвенную передачу через поверхности или объекты (например, одежда, оборудование, мебель), так называемые фомиты, которые могут быть заражены вирусом, где они могут оставаться активными длительное время. Автоинокуляция происходит в результате передачи ВПЧ от одного участка к другому при царапании или купании (Syrjänen S., 2010).

Обнаружение фрагментов ДНК вирусов ВПЧ в биологическом материале человека проводили методом ПЦР Real - time.

Забор материала производился с пораженного участка в пробирки "ДНК-ЭКСПРЕС", предназначенные для выделения ДНК из биологического материала (элементы бородавок, взятые с коже) для последующего анализа выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) Real-time.

Исследуемый материал с помощью одноразовых стерильных зондов переносили в пробирку с реагентом. Пробирки с реагентом, содержащие анализируемый материал, тщательно перемешивали

на микроцентрифуге- встряхивателе в течение 10 сек, помещали пробирку в твердотельный термостат и инкубировали при температуре +98°С в течение 10 минут.

После завершения инкубации пробирки центрифугировали при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18...+25°С) в течение 15 сек.

Полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации. Полученный супернатант хранили при температуре +2 - +8°С не более одной недели или при температуре -20°С не более 6 мес.

ПЦР-диагностику проводили в соответствие с протоколом набора формата ФЛУОРОПОЛ-РВ в комплектация OneStep.

1. Для проведения исследования необходимо достать из коробки необходимое число пробирок и расставить в соответствии с заранее подготовленным протоколом. Реакция проводился на анализаторе Rotor Gene-6000 (Corbet Reserch).
2. Полностью разморозить содержимое пробирок. При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5-сек на микроцентрифуге - вортексе.
3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

✓ в пробирку исследуемых образцов - исследуемые образцы ДНК;

✓ в пробирку отрицательного контрольного образца - разбавитель из комплекта набора;

✓ в пробирку положительного контрольного образца - положительный контрольный образец ДНК из комплекта используемого набора.

4. Пробирки плотно закрыть и центрифугировать в течение 15 сек на микроцентрифуге - вортексе.
5. Создать протокол расположения образцов. Для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ используются каналы FAM (специфический сигнал), HEX (сигнал внутреннего контроля).

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

6. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

+95°С	1мин 30 сек	
+95°С	10 сек	40 циклов
+60°С	20 сек (считывание)	
+72°С	40 сек	

В присутствии любых других ДНК - матриц специфический фрагмент не синтезируется.

Цитокинов (интерферонов) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения цитокинов использовали тест-системы, разработанные в АО «Вектор-Бест» (Россия).

Данные тест-системы основаны на сэндвич – методе твердофазного ИФА с применением моно- и поликлональных антител к интерлейкинам (интерферонам).

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали в лунках иммобилизованными антителами. Связавшийся интерлейкин (интерферон) на второй стадии взаимодействовал при инкубации с конъюгатом №1 (поликлональные антитела к интерлейкину (интерферону) человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействовал при инкубации с конъюгатом №2 (стрептовидин с пероксидазой хрена).

Количество образовавшихся комплексов определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена-перекиси водорода и хромогена-тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания была пропорциональна концентрации содержащего в образце интерлейкина (интерферона).

Учет результатов проводили с использованием автоматического фотометра «Multiskan RC, Finland» для микропланшетов при длине волны 492 нм. Количественную оценку результатов проводили методом построения калибровочной кривой, отражающей зависимость оптической плотности от концентрации для стандартного антигена, образца позволяющих проводить сравнение с ним исследуемых образцов.

Высокочувствительный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет выявлять ДНК человеческих папилломавирусов (ЧПВ) высокого и низкого риска на самом раннем этапе, в том числе и при асимптомных формах бородавок, что делает возможным максимально раннее проведение терапевтических и профилактических мероприятий.

В связи с чем мы сочли целесообразным проводить идентификацию и дифференциацию ЧПВ у больных детей с папилломавирусной инфекцией с использованием данного метода диагностики.

ПЦР-диагностику проводили в соответствии с протоколом набора формата ФЛУОРОПОЛ-РВ в комплектации OneStep.

Тестирование проводили по типу папилломовирусов – HPV lr – Human papillomavirus low risk и HPV hr – Human papillomavirus high risk.

Материалом для исследования служили биоптаты кожи (элементы бородавок), взятые с пораженного участка кожи.

Исследование проводили у 98 больных детей с папилломавирусной инфекцией (бородавками).

Результаты исследования показали, что среди обследованных больных детей с папилломавирусной инфекцией в биоптатах кожи у 65 (66,3%) больных детей в ПЦР был получен положительный результат на наличие HPV lr, что подтверждает вирусный генез заболевания. У остальных 33 (33,7%) больных детей результат тестирования был отрицательным.

Среди 65 больных детей с ПВИ, у которых был получен положительный результат, у 38 (58,5%) больных детей выявлен HPV lr 6, у 19 (29,2%) больных – HPV lr 11 и у 8 (12,3%) больных сочетание HPV lr 6 и HPV lr 11 типов человеческих папилломавирусов (рис.1.).

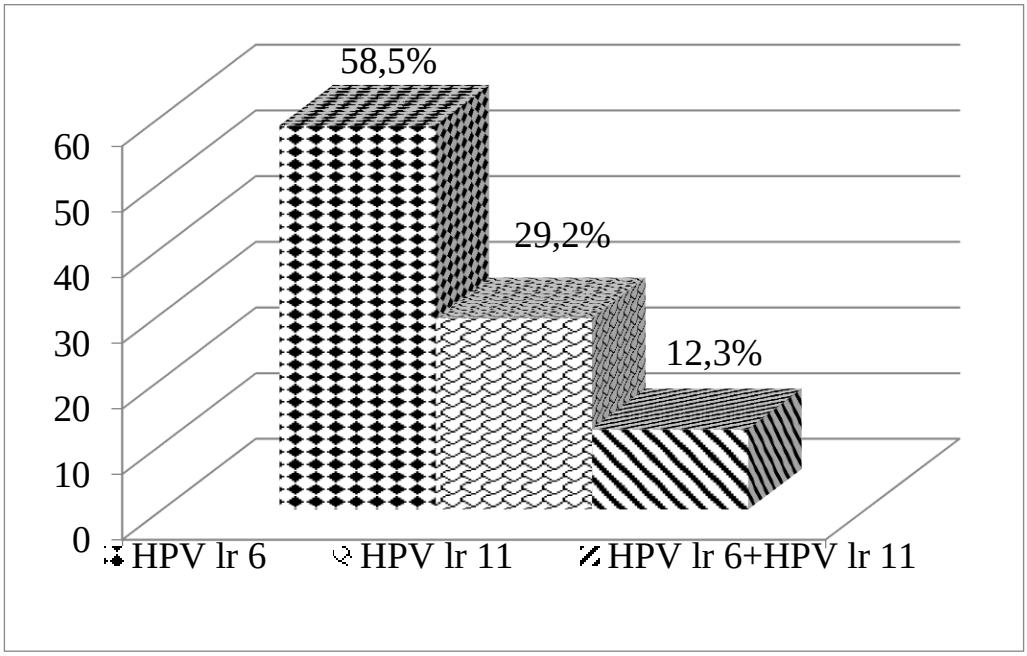


Рис.1. Показатели идентификации ПВИ в биоптатах методом ПЦР

В дальнейших исследованиях нами было исследовано наличие папилломавирусов высокого риска (HPV hr) у больных детей с папилломавирусной инфекцией. Исследование показало, что среди 98 обследованных больных детей только у 9 (9,2%) больных детей в ПЦР был получен положительный результат на наличие HPV hr, а у остальных 89 (90,8%) больных детей результат тестирования был отрицательным.

Среди 9 больных детей с ПВИ, у которых был получен положительный результат, у 4 (44,4%) больных выявлен HPV hr 16/18, у 3 (33,3%) больных – HPV hr 31/33 и у 2 (22,3%) больных сочетание HPV hr 16/18 и HPV hr 31/33 типов человеческих папилломавирусов (рис.2).

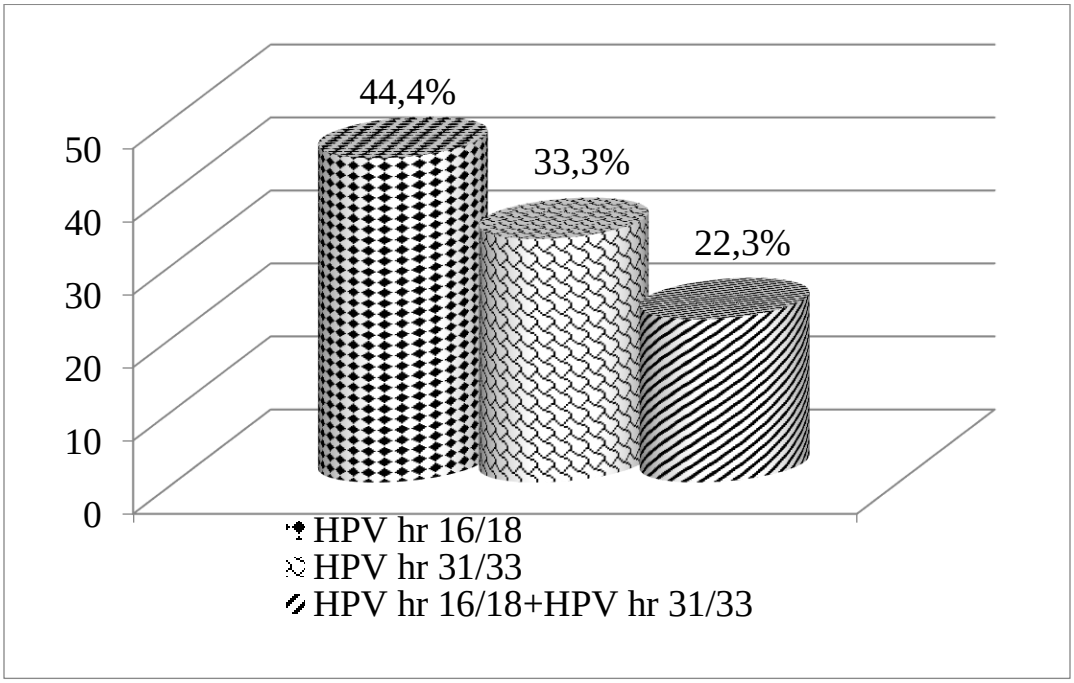


Рис.2. Показатели идентификации ОК в биоптатах методом ПЦР.

Данные современных методов обследования показали, что папилломавирусные поражения у детей и подростков связаны с теми же типами ВПЧ, что и у взрослых, причем в силу физиологических особенностей и незрелости защитных механизмов дети и подростки более уязвимы, чем взрослые (Бычкова О.С. и др., 2011).

Известно, что высокочувствительный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет выявлять ДНК человеческих папилломавирусов (ЧПВ) высокого и низкого риска на самом раннем этапе, в том числе и при асимптомных формах бородавок, что делает возможным максимально раннее проведение терапевтических и профилактических мероприятий.

В связи с чем мы сочли целесообразным проводить идентификацию и дифференциацию ЧПВ у больных детей с папилломавирусной инфекцией с использованием данного метода диагностики.

Таким образом, результаты исследования показали, что у больных детей с папилломавирусной инфекцией в основном выявляются папилломавирусы низкого риска HPV lr и поэтому у детей папилломавирусы проявляются в виде обыкновенных бородавок. Следует отметить, что включение метода ПЦР – диагностики в комплекс методов, используемых при обследовании больных детей, позволяет проводить раннюю диагностику вирусных заболеваний кожи, что имеет важное значение в лечении и профилактике распространения инфекции.

Литература

1. Арифов С. С., Набиев Т. А. Современные представления об этиологии, патогенезе, клинике и лечении вирусных заболеваний кожи (остроконечные кондиломы и вирусные бородавки) //Новости дерматологии и венерологии. –2000. –№1. –С.20-24.
2. Артымук Н.В., Марочко К.В. Эффективность различных методов исследования при выявлении плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки высокой степени //Акушерство и гинекология. Новости Мнения Обучение. –2017. –№4. –С.58-62.
3. Бахтияров К.Р., Щукина А.С. Вирус папилломы человека – современный взгляд на проблему //Здоровье и образование в XXI веке. –2017. –Т.19. –№12. –С.37-40.
4. Галицкая М.Г., Гайворонская А.Г. Расширение возможностей вакцинопрофилактики папилломавирусной (ВПЧ)-инфекции: защита от целого спектра ВПЧ-ассоциированных заболеваний лиц различного возраста и пола //Педиатрич. фармакол. –2013. –№10 (1). –С.13-17.
5. Довлетханова Э.Р., Прилепская В.Н. Папилломавирусная инфекция: теоретические и практические аспекты. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. –88 с.
6. Каткова Н.Ю., Кабатин Н.А., Качалина О.В. Особенности различных форм папилломавирусной инфекции во время беременности и факторы риска ее вертикальной передачи //Мед. альманах. –2014. –№5 (35). –С.40-45.
7. Syrjänen S., Waterboer T., Sarkola M. et al. //J. Gen. Virol Dynamics of human papillomavirus serology in women followed up for 36 months after pregnancy /. –2009. –№90. –P.1515-1526.
8. Boulenoua S., Weyn C., Van Noppen M. et al. //Effects of HPV-16 E5, E6, E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells / Carcinogenesis. –2010. –№31. –473-480.
9. Fuller C., Hudgins E., Finelt N. Human-papillomavirus-related disease in pediatrics //Curr. Opin Pediatr. –2018. –V.30. –№1. –P.169-174.
10. Gallager T.Q., Derkay C.S. Pharmacotherapy of recurrent respiratory papillomatosis: an expert opinion //Expert Opin Pharmacother. –2009. –№10. –P.645-655.

11. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children //APMIS. –2010. –№118. –P.494-509.
12. Teran C.G., Villarroel P., Teran-Escalera C.N. Severe genital human papillomavirus infection in a sexually abused child //Int. J. Infect. Dis. –2009. –№13. –P.137-138.