МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ
СБАЛАГ „МАЙЧИН ДОМ“

Д-Р САШО ИВАНОВ ГЕОРГИЕВ

ПРОУЧВАНЕ ЧЕСТОТАТА, РАЗПРЕДЕЛЕНИЕТО НА ТИПОВЕТЕ И КЛИНИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ HPV ИНФЕКЦИЯ ПО ВРЕМЕ НА БРЕМЕННОСТ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“

Област на висше образование: Здравеопазване и спорт
Професионално направление: Медицина
Научна специалност: Акушерство и гинекология

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
ПРОФ. Д-Р ВИКТОР ЗЛАТКОВ, ДМ

София / 2017 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

	Стр.
1. ВЪВЕДЕНИЕ	6
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
2.1. Особености на вирусните инфекции	9
2.1.1. Пътища на проникване на вирусите в организма	9
2.1.2. Видове вирусни инфекции	11
2.1.3. Механизми на реализация на вирусната инфекция	15
2.1.4. Защитна реакция на организма срещу вирусните инфекции	18
2.2. Човешки папилома вирус (Human papillomavirus - HPV)	19
2.2.1. Характеристика на HPVs	20
2.2.2. Структура на HPV	22
2.2.3. Епидемиология на инфекциите с HPV	25
2.3. Клинични аспекти на инфекцията предизвикана от HPVs	26
2.3.1. HPV инфекция и бременност	28
2.3.2. HPV инфекция при новородени	33
2.4. Възможности на HPV диагностиката	37
2.4.1. Хистоморфологична оценка	38
2.4.2. Цитологично изследване	39
2.4.3. Колпоскопска диагностика	40
2.4.4. Вирусологични методи	42
2.4.4.1. Имунохистистохимично изследване	42
2.4.4.2. Молекулярно биологични техники	43
2.5. Обобщение	48

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	50
4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	52
4.1.Клиничен материал	53
4.2.Методи	54
4.2.1. Гинекологична анамнеза и статус	54
4.2.2. Лабораторни показатели	55
4.2.3. Специализирани акушеро-гинекологични изследвания	55
4.2.3.1. Цитологичен метод	55
4.2.3.2. Колпоскопски метод	56
4.2.3.3. Методи осигуряващи материал за хистологично изследване	56
4.2.3.3.1. Прицелна биопсия	56
4.2.3.3.2. Конизация на маточната шийка	57
4.2.3.4. Ултразвуково изследване	58
4.2.4. Специализирани вирусологични изследвания	59
4.2.4.1. HPV-типизация чрез ДНК с амплификация	59
4.2.5. Статистически методи	62
5. **СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**	64
5.1.***Здравно състояние на проучваната група от бременни пациентки***	65
5.1.1. Анамнестични и клинични данни	65
5.1.2. Лабораторни данни	69
5.2.**Цитологични, колпоскопски и хистологични находки на маточната шийка по време на бременността.**	71
5.2.1. Цитологични находки	71
5.2.2. Колпоскопски находки	77
5.2.3. Хистологични находки	82
5.3.**Резултати от HPV типизация на изследваните жени и новородени**	88

5.3.1. HPV вирусна инфекция по време на бременност - честота и разпределение по типове.	95
5.3.2. HPV вирусна инфекция в послеродовия период - честота и разпределение по типове.	97
5.3.3. HPV вирусна инфекция и тютюнопушене	102
5.3.4. Проучване вертикалната трансмисия на HPV вирусна инфекция между майка и новородено	103
5.4. ***Диагностична значимост на цитологичното и колпоскопско изследване в зависимост от HPV статуса.***	114
5.4.1. Диагностична сигурност на цитологичния метод	115
5.4.2. Диагностично сигурност на колпоскопското изследване	121
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
7. ИЗВОДИ	135
8. ПРИНОСИ	139
9. КНИГОПИС	143
10. ПРИЛОЖЕНИЯ	160

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АФ	Алкална фосфатаза
ДНК	Дезокси рибонуклеинова киселина
ГГТП	Гама-глутамилтранспептидаза
ИХХ	Имуно хистохимия
К.б.	Кило бази
НК	Нуклеинова киселина
ППОМ	Преждевременно пукнат околоплоден мехур
РМШ	Рак на маточната шийка
РНК	Рибонуклеинова киселина
СГОТ	серумна глутамин оксо ацил трансфераза
СГПТ	серумна глутаминова пируват трансаминаза
СЗО	Световна здравна организация
СУЕ	Скорост утаяване на еритроцити
IL 12	Интралевкин 12
Ig A	Имуноглобулин А
EDTA	Етилендиамин тетраоцетна киселина
CIN	Целвикална интерепителна неоплазия
CIS	Carcinoma in situ
HPV	Human papilloma virus
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
ISH	In situ хибридизация
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
PCR	Полимеразна верижна реакция
TP53	Tumor protein 53 gene

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Вирусите имат водещо значение за инфекциозната патология при човека. Те причиняват повече от 80% от заразните заболявания и от тях умират повече болни в сравнение с всички болести, причинявани от други инфекциозни агенти. С годините тази тенденция се засилва. За това оказват влияние много и различни фактори:

- *увеличаване и концентрация на населението, общуването между хората от различни райони на света*
- *разрушаване на естествени екосистеми, които могат да елиминират вирусите*
- *общо отслабване на имунитета под влияние на замърсяването на въздуха, храната и водата, увеличената употреба на антибиотици, стероиди, алкохол, наркотици, нарастването на стресовите фактори*
- *поява на нови или модифицирани вируси, адаптацията им към други преносители, както и разширяване на географското им разпространение*
- *загърбване на важни морални традиции с ранни безразборни сексуални контакти с повече партньори и лекомислено отношение към необходимите предпазни мерки*
- *-недостатъчно или неправилно използване на противовирусни средства и схеми за лечение и профилактика на вирусните заболявания.*

Посочените детерминанти имат медико-социални характеристики, част от които са обект на настоящата разработка.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. ОСОБЕНОСТИ НА ВИРУСНИТЕ ИНФЕКЦИИ

Развитието на всяка вирусна инфекция е в пряка зависимост от три фактора: вирулентността на вируса, възможностите, с които клетките и организма на приемника се противопоставят на инфекцията и условията, при които се осъществява това взаимодействие /116/.

Природата на микроорганизма е един от основните фактори, определящи взаимоотношенията между него и гостоприемника. В някои случаи възрастта на приемника е от особено значение. Например, повечето вируси атакуват предимно млади хора и деца и са особено опасни за новородените. Други важни фактори са лошата хигиена, животът в големи общности и храната. Пътуванията, летните лагери и други занимания създават контакт на хората с комари, кърлежи и други. Многобройните сексуални контакти също допринасят за разпространението и заразяването с някои вируси /50/. Здравните специалисти са изложени по-често на инфекции с респираторни вируси и с контаминирани кръвни продукти. По отношение възприемчивостта на даден организъм към вирусни инфекции известна роля могат да играят и наследствени фактори свързани с имунитета.

2.1.1. ПЪТИЩА НА ПРОНИКВАНЕ НА ВИРУСИТЕ В ОРГАНИЗМА

Вирусите проникват в организма по различни пътища. Те се определят от локализацията на чувствителните клетки в организма и

механизма на предаване на вирусите от един индивид на друг. Съществуват вирулентни фактори, които повишават възможностите на вирусите за инвазия, адхезия и репликация в прицелните тъкани, възпрепятстване механизмите на естествената резистентност и имунния отговор /44/. Тези механизми са съществени за патогенността и оцеляването на вируса в макроорганизма. Загубата на някои от тези вирулентни фактори води до атенюиране на вируса.

Много вируси се реплицират в мястото на първичното проникване в организма. Клетките в мястото на първичната репликация трябва да притежават две характеристики: да имат рецептори за съответния вирус и да са пермисивни, т.е. способни да поддържат размножаването на вируса. Ясно е, че клетките в организма притежават различни рецептори и различна пермисивност за всеки вирус. Първичната репликация на много вируси след проникване започва в лимфоидните фоликули на дихателните пътища и храносмилателния тракт, следва виремия и вторична репликация в други тъкани и органи, като се развиват различни болестни състояния .

Разнообразните пътища на разпространение на вирусите в организма обезпечават развитие на инфекцията в клетките и тъканите на тези органи, към които вирусите имат тропизъм. Това обуславя типични поражения, местни по характер или обхващащи и други органи и тъкани.

Лимфната система е един от основните пътища, по които вирусите се разпространяват от местата на първоначалната локализация (кожа, лигавица на дихателните пътища и храносмилателния тракт).

Хематогенният е друг основен път за разпространение на вирусите в организма. В кръвта вирусите могат да постъпят от лимфната система или по капилярите до първично инфектираните тъкани. Виремията се поддържа чрез постоянно постъпване на вируси в кръвта или при нарушаване на

механизмите за елиминирането им от кръвта. Някои вируси притежават способността да се репродуцират в ендотелните клетки на кръвоносните съдове, откъдето попадат в кръвта. Виремията е важно звено в патогенезата на персистиращите инфекции, тъй като обезпечава попадането на вирусите в различни органи.

2.1.2. ВИДОВЕ ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ

Едно заболяване може да се причини от различни вируси, които имат сходен тъканен тропизъм. От друга страна, един вирус може да причини различни заболявания в зависимост от вида на ангажираните в инфекцията клетки, но може и да не предизвика заболяване.

Основните характеристики на вирусната инфекция са свързани с: генерализация на вируса; продължителност на инфекцията; проява на клинични симптоми; отделяне на вируса в околната среда /44/.

Инфекцията е огнищна когато действието на вируса се проявява на входната врата. Тя има по-кратък инкубационен период и рядко се развива виремия. Вирусите са облигатни вътреклетъчни паразити, като извънклетъчният вирион е биологично инертен. Тази инертност се съхранява дотогава, докато не се реализира взаимодействие с клетката. При ваимодействието с клетъчния геном вирусният геном започва да функционира вътреклетъчно като самостоятелна генетична единица.

Когато вирусният геном се реплицира независимо от клетъчния геном, инфекцията е известна като автономна. Тази форма на вирусна инфекция е характерна за повечето вируси с изключение на ретровирусите. *Автономната инфекция* е продуктивна и абортивна /34/. Продуктивната автономна инфекция завършва с образуването на патогенни вируси.

Абортивна автономна инфекция е тази инфекция, която не завършва с развитие на пълни вирусни частици или те са в ниски титри.

Ако вирусният геном се включва в състава на клетъчния геном, процесът е известен като интеграционен. Интеграционната инфекция е резултат от физическо обединяване на вирусния и клетъчния геном. Вирусният геном се реплицира и функционира като съставна част на клетъчния геном. Интеграцията може да бъда пълна или да се интегрира само част от генома. Вирусните последователности в състава на клетъчния геном са известни като провирус, или провирусна ДНК.

При интеграционните инфекции няма продукция на вирусни частици. Клетката може да съхрани своите нормални функции и при нейното делене вирусните последователности могат да преминат в генома на дъщерните клетки. Този процес се наблюдава при инфекция, предизвикана от онкогенни вируси. Интеграцията може да доведе и до неопластична трасформация на клетките. Така трансформираната клетка придобива способността за неограничено, безразборно делене в резултат на натрупване на регулаторните механизми, контролиращи деленето на клетката.

Продуктивната и абортивната инфекция могат да протекат като остра или хронична инфекция.

Остра е инфекцията, при която след образуване на вирусно потомство клетката загива или оздравява, но не съдържа повече вируси. Острата инфекция на клетъчно ниво може да бъде цитолитична и нецитолитична. Инфекция, която засяга важни области на клетъчния геном завършва с клетъчна апоптоза (смърт). Така инфекциозният процес се прекъсва с цитолизата на заразената клетка

Инфекцията, която не води до лизис на клетката и може да продуцира от време на време вирусни частици, се нарича нецитолитична. Вирусите напускат клетката чрез пъпкуване без лизис. Продуктивната нецитолитична инфекция, най-вероятно, винаги е хронична. Абортивната нецитолитична инфекция може да бъде остра и хронична.

Хронична инфекция се наблюдава, когато клетката продължава да продуцира вирусни частици или вирусни компоненти до своята естествена смърт. Тази способност се предава и на дъщерните клетки. Често хронична форма придобива абортивната инфекция, когато вирусният генетичен материал не участва във вирусното потомство, а се натрупва и се предава на дъщерните клетки. Един от факторите, предизвикващи хронична инфекция, са дефектните интерфериращи частици. Попаднали в клетката заедно с инфекциозните вирусни частици, те се конкурират с тях за факторите на репродукция и възпрепятстват образуването на инфекциозно потомство. В резултат на това се предотвратява смъртта на клетката.

Смесената инфекция е резултат на възможността клетката да се зарази в естествени условия с два или няколко различни вируса. Два и повече инфекциозни процеса, протичащи едновременно в една клетка, могат да се развият различно: единият от вирусите потиска репродукцията на втория или се потиска репродукцията и на двата.

Генерализираната инфекция се характеризира с това, че след репликация на вируса в първичните огнища настъпва генерализация и вирусът достига до чувствителните тъкани, където формира вторични огнища на размножаване. Тази инфекция има по-продължителен инкубационен период, появата на виремия е обичайна и голямо значение за защитата имат хуморалните антитела и общият клетъчен имунитет. Имунитетът е продължителен.

Острата инфекция продължава относително кратко време и протича с отделянето на вируса в околната среда. Инфекцията завършва с елиминиране на вируса благодарение на имунните механизми на макроорганизма. Тя съответства на продуктивната инфекция на нивото на клетката. Тази инфекция може да протече както в клинична, така и в безсимптомна (инапарентна) форма. Острата инфекция може да завърши с оздравяване или със смърт. При острите генерализирани инфекции вирусът обикновено се отделя в острата фаза на заболяването, но понякога и през оздравителния период. При някои инфекции екскрецията от местните поражения може да продължи няколко месеца или години. При продължително взаимодействие на вируса с огранизма се появява персистираща форма на инфекция.

Един вирус може да предизвика както остра, така и персистираща инфекция в зависимост от състоянието на организма и на първо място от неговата имунна система. Персистиращата инфекция може да се прояви като латентна, хронична или бавна в зависимост от екскрецията на вируса в околната среда и проявата на клиничните симптоми на заболяването.

Краят на вирусната инфекция настъпва, когато патогенните вируси и вирус-асоциирани клетки се премахнат от организма. Неспецифичният имунен отговор обикновено е достатъчен за ограничаване на инфекцията. Антителата са ефективни по отношение на екстрацелуларните и цитолитичните вируси, при виремия.

Клетъчно-медиираният имунитет е необходим на таргетните клетки при наличие на персистираща инфекция основно при случаите, където кратката или липсваща виремия не провокира изграждането на системен имунен отговор. В тази връзка, човешкия папиломен вирус е типичен пример.

Вирусите, увреждащи кожата или лигавиците обикновено се елиминират с ексудатите или секретите. Относително кратка екскреция на вируса може да бъде в резултат на бързо разрушаване на чувствителните клетки или синтез на антитела.

2.1.3.МЕХАНИЗМИ НА РЕАЛИЗАЦИЯ НА ВИРУСНАТА ИНФЕКЦИЯ

Механизмите на вирусната репликация и на клетъчната трансформация под влияние на вируса продължават да се изучават. За да се развие инфекцията, е необходимо вируса да проникне в базалната епителна клетка /145/. Това обикновено изисква нарушаване на целостта на многослойния епител. Такива лезии не винаги са явни и може да настъпят, когато кожата или лигавиците са изложени на въздействие на фактори, предизвикващи микротравми. Навлизането на вирусните частици е бавен процес, който продължава няколко часа и се извършва чрез ендоцитоза на везикули, покрити с белтъка клатрин. След разсъбличането на вируса геномната му ДНК се транспортира в ядрото.

Известни са три етапа в процеса на репликацията на вирусната ДНК. Първият протича в базалните епителни клетки, в които вирусният геном се намножава до 50-100 копия/клетка. Следва етап на "геномно поддържане", който протича в активно делящите се базални клетки на долните слоеве на епидермиса. Вирусните геноми се реплицират средно веднъж на един клетъчен цикъл по време на S- фазата, в синхрон с клетъчните хромозоми. Този начин на репликация осигурява поддържането на инфекцията в

базалните клетки на епидермиса в латентно състояние. Третият етап, наречен геномна амплификация, се извършва в по-диференцираните епителни клетки. В тях вече не се синтезира клетъчна ДНК, но има усилена продукция на вирусна ДНК.

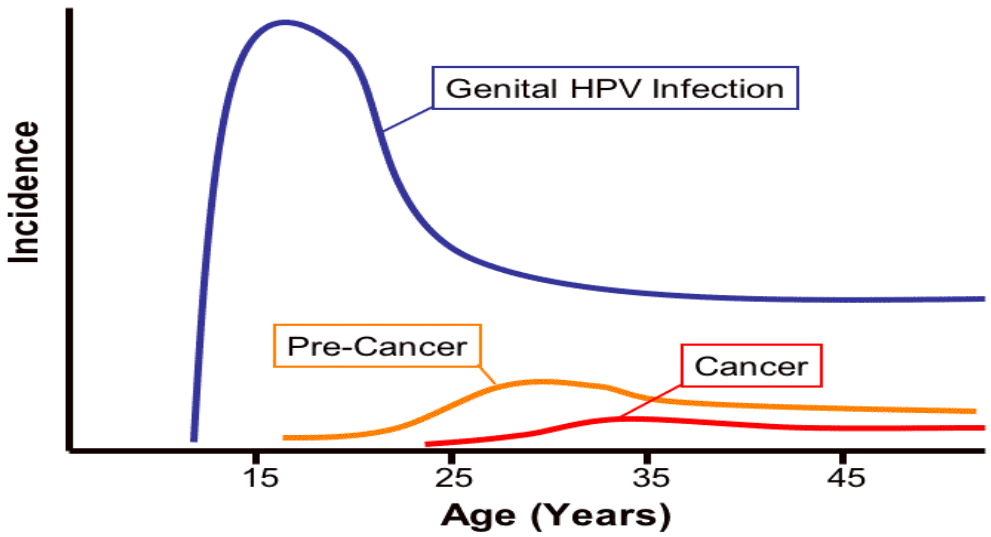
Формирането на зрели инфекциозни вирусни частици се извършва в средните и горните слоеве на епитела. За изграждането на една зряла вирусна частица се използват 360 копия на белтъци, организирани в 72 капсомера с икосаедрална симетрия. Човешкият папиломен вирус не предизвиква разрушаване на клетката и не напуска клетката, преди тя да достигне епителната повърхност. Новото поколение вирусни частици се освобождава при излющването на мъртвите плоски и метапластични клетки.

Видът, продължителността и механизмите на анти- HPV имунния отговор все още не са напълно изучени. Основни причини за това са особеностите в патогенезата на инфекцията: HPV са строго интраепителиални патогени, те не предизвикват виремия и не водят до системни прояви и т.н. Тези вируси не са цитолитични и вирусната инфекция не предизвиква възпалителен отговор от страна на организма /66/. Способността на HPV лезиите да персистират с години означава, че HPVса инфекциозни агенти с ниска имуногенност. Има обаче и данни, които свидетелстват, че имунната система активно участва в процесите на ограничаване и дори елиминиране на HPV инфекциите.

Медииранияят имунитет играе роля в имунологичния контрол на HPV. **Първичният имунен отговор** се осъществява от CD4 Т- клетки, които разпознават HPV специфични антигени. Освен това се включват цитокините IL-12, ТКР и др /146/. Образуваните антитела срещу Е1 и/или Е2 са в недостатъчно количество за индуциране на достатъчен антитяло

специфичен отговор. HPV инфекциите остават относително защитени от имунния отговор на пациента, поради разположението си в епитела. Дефектният имунен отговор улеснява персистирането, особено на високо рисковите HPV.

Персистираща инфекция с високорискови видове HPV, може да прогресира до пренеопластични и неопластични изменения. Когато инфекцията продължава да съществува дълго време - в 5 до 10% от заразените жени – е налице висок риск от развитие на предракови и ракови лезии, особено на шийката на матката. Този процес обикновено отнема 10-15 години, ако не се вземат предпазни мерки **(Фиг. 1).**



Фиг. 1. Връзка между началото на инфекцията с HPV и възможността за доказване на предраково състояние или рак.

2.1.4.ЗАЩИТНА РЕАКЦИЯ НА ОРГАНИЗМА СРЕЩУ ВИРУСНИТЕ ИНФЕКЦИИ

Заразените клетки по време на вирусната инфекция могат да реагират по три различни начина: без видими промени, с цитопатичен ефект, с трансформация /34/.

Патологичните промени в заразените с вируса клетки са обусловени от специфични и неспецифични процеси. *Неспецифичните патологични процеси* могат да са свързани с промяна в проницаемостта на цитоплазмената мембрана, маргинация на хроматина, хромозомни аберации, пикноза на ядрата, вакуолизация на цитоплазмата. *Специфичните промени* са свързани с образуване на синцитиум, както и изменения в клетъчните мембрани от включените специфични вирусни белтъци и тяхното въздействие върху клетката.

В острия стадий на заболяването организмът е защитен от вирусни инфекции с естествени бариери (кожа, мукус, епител, стомашен и жлъчен сок). След като вирусът преодолее естествените бариери, той активира разпространението на вируса, както чрез неспецифичния имунен отговор (интерферони, макрофаги, МК клетки), така и чрез антиген-специфичен имунен отговор (антитела, Т-клетки). Антиген-специфичният имунен отговор е системен и той се активира последен. Крайната цел на този имунния отговор е елиминирането на вируса и клетките в които се реплицира. Точната природа на имунния отговор се различава за всеки отделен вирус.

При HPV инфекция защитните фактори са свързани повече със секреторните антитела от клас Ig A и локалния клетъчен имунитет,

отколкото с хуморалните антитела, а ефективни ваксини са тези, които стимулират образуването на секреторни антитела. Имунитетът е краткотраен.

2.2.ЧОВЕШКИ ПАПИЛОМА ВИРУС (HUMAN PAPILLOMAVIRUS - HPV)

Човешкият папилома вирус (HPV) се счита за един от най-широко разпространените човешки вируси сред сексуално активното население на планетата.

До момента се съобщава за около 200 различни типа HPV, от които над 60-70 засягат гениталния тракт /129, 69, 80/.

Тяхната типизация се извършва на база разлика на на нуклеотидната последователност на ORF на L1 гена. Понастоящем HPV генома се описва като нова фамилия – при разлика над 40%, нов тип – над 10%, нов субтип - между 2- 10% и нов вариант - под 2% /17, 67, 60/.

Най-общо филогенетично папиломните вирусите се разделят на пет подгрупи – A, B, C, D и E, от които три – A, B и E се срещат при човека. Най-голямата, група A е хетерогенна и най-често се асоциира с доброкачествени или онкогенни генитални инфекции, по-рядко с обикновените брадавици и ларингеалните папиломи. Група B също тя е нехомогенна и включва папиломни вируси предизвикващи както различни кожни изменения – epidermodysplasia verruciformis, verruca planum, така и плоскоклетъчен карцином при имуносупресирани болни /60, 85/.

Биологичният ефект на тези клинични изяви на папиломните вируси се определя основно от онкогенната им значимост. Най-често, те се разделят в две групи. Първата, включва HPV типове асоцииращи се с доброкачествени кожно-лигавични изменения (90% от аногениталните брадавици се причиняват от HPV типове 6 и 11). Втората, се свързва преди всичко с изявата на предракови и ракови изменения, от които 20 се асоциират директно с РМШ /62/. От тях 16 и 18 са отговорни за 70% от случаите с РМШ, 50% за HSIL и с 14-25% за LSIL /82/.

2.2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА НА HPVs

Първият папиломен вирус е описан през 1933 г. от Richard Shope - откривател на заешкия папиломен вирус - етиологичен агент на кожната папиломатоза при зайците /137/. Това е първият идентифициран ДНК туморен вирус. Години след откриването им папиломните вируси остават встрани от интензивните специализирани проучвания главно поради отсъствието на клетъчни системи за in vitro култивирането им /129/. Успешното изолиране и клониране на папиломавирусния геном през 70-те години на XX в. разкри възможности за неговото картиране, секвениране и по-задълбочено изучаване на неговата структура и функции /17/.

Гостоприемникът на човешките папиломни вируси е строго специфичен - плоските и метапластични епителни клетки /63, 152/. Проникването в клетката се осъществява с помощта на рецептори, които все още са с недостатъчно изяснена природа. Вирусът бързо прониква в ядрото на заразената клетка и се интегрира в молекулата на клетъчната

ДНК.

Научният интерес към папиломните вируси се засилва през 80-те години на XX в., когато се разработват различни методи за in vitro изучаване на клетъчната трансформация. Отначало като модел за изучаването на молекулярните свойства и патогенетичния потенциал на папиломните вируси е използван говеждият папиломен вирус тип 1. G /39/. При проучването на вирусната туморна генеза важна роля играят наблюденията при различни гръбначни животни. Установено е, че папиломните вируси предизвикват развитието на брадавици, които в някои случаи показват и малигнена прогресия. Постепенно научните интереси се фокусират върху онкогенния потенциал на човешките папиломни вируси и това интензифицира проучванията върху възможното участие на HPV при индукцията на малигнена клетъчна пролиферация /73/.

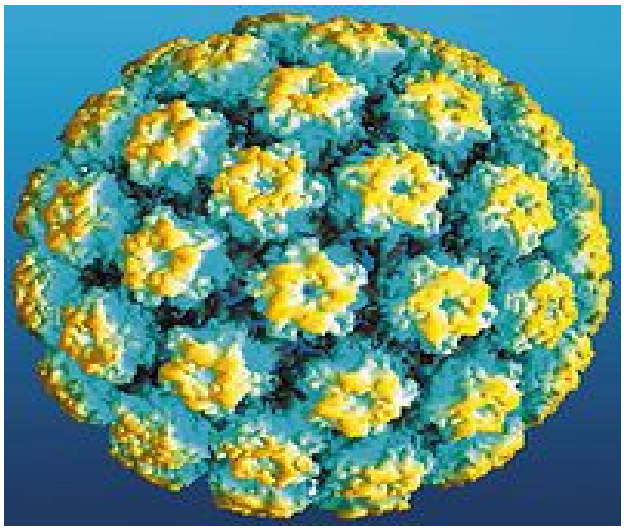
Етиопатогенетичната връзка между HPV и рака на маточната шийка е забелязана през 1968-70 година и по-късно доказана 1972-74 година от немския вирусолог проф. Harald zur Hausen /174/. Днес се счита за доказано, че различни генотипове на човешките папиломни вируси са свързани етиопатогенетично с цервикалния рак и с други епителни тумори. През 80-те години на XX в. с бързото навлизане на молекулно-биологичните методи за откриване и анализ на специфични (вирусни) нуклеинови киселини бе доказано, че HPV присъства в свободна и/или интегрирана форма в клетки от доброкачествени и злокачествени лезии на различни органи. Постепенно са натрупани научни и практически данни, които разширяват познанията относно молекулярните механизми на канцерогенезата и позволяват търсене и анализ на връзките между определени генетични характеристики и клиничните прояви на

инфекцията. Едновременно с това започва разработването на диагностични тестове, базирани на молекулярните техники за детекция и типизация на различни вирусни геноми /84/. Това позволява по-точното определяне на параметрите на инфекцията (качествени и количествени) и допринася както за определяне на подходящ терапевтичен подход, така и за прогнозиране на хода и изхода от заболяването. Съществен резултат от задълбочените проучвания на патогенезата на HPV на молекулярно ниво е разработването на анти- HPV ваксини с възможен профилактичен и/или терапевтичен ефект.

През 2000 г. Международният комитет по таксономия на вирусите отдели тези вируси в самостоятелно семейство - ***Pappiliomaviridae***.

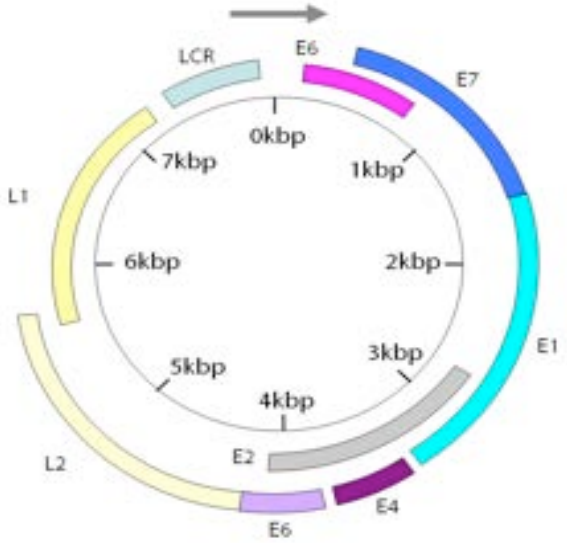
2.2.2. СТРУКТУРА НА HPVs

Според морфологичната характеристика (Фигура 2), вирусните частици са с големина около 55 nm, имат двойноверижен ДНК геном и капсид. Капсидът е необвит, с икосаедрална симетрия, изграден е от 72 пентамера /82/.



Фиг. 2. Модел на HPV на електронна микроскопия.
(http://hpvvirusinwomen.com/images/hpv).

Вирусният геном е с големина около 8000 к.б. представлява кръгова двойно верижна ДНК молекула съдържаща вирусните гени, които се означават като ранни и късни според момента на активирането им по време на вирусната репликация - фигура 3 /82/.



Фигура 3. Схематично представяне на генома на HPV.

Циркулярният ДНК геном на всички папилома вируси се разделя условно на три сегмента с различна големина. Контролната зона (long control region - LCR) или наричана още некодирана зона заема 10% от генома. Останалата част е изградена в 50% от т.нар. “ранни” (E) гени, произвеждащи белтъците: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 и в 40% - от “късни” (L) гени и съответните L1 и L2 белтъци. (5-вж. по-горе) /100/.

Произведените от съответнитегени E6 и E7 белтъци са основните онкопротеини, които манипулират клетъчния цикъл, индуцират аномалии на хромозомите и блокират апоптозата /31/. Протеинът E6 е онкогенен компонент на високо-рисковите HPV, въвлечен в развитието на рака. Той подпомага тумурогенезата чрез стимулиране на клетъчната деградация и супресира *TP53* /49/. Протеинът E7 в онкогенни HPV се конкурира за един ретинобластоменп протеин и с помощта на E2P транскрипциония фактор променя клетъчния цикъл. Всички HPV може да предизвикат преходно разпространението, но само типовете, 16 и 18 и членовете на тяхните семейства могат да обезсмъртят in vitro клетъчни линии. Капсидните протеини E6 и E7 на високо рисковите HPV инпхибират синтезата на някои интерферони (1EM-алфа и 1PM-бета), които са много важни антивирусни агенти.

Гените E1, E2, E4, E5, E6 и E7, кодират ранните белтъци участващи в трансформацията и репликацията и взаимодействат с генома на човека, като E6 и E7 са основните онкопротеини, които манипулират клетъчния цикъл, индуцират аномалии на хромозомите и блокират апоптозата. Човешките папиломни вируси са устойчиви на различни химични и физични въздействия. Вирусните капсиди издържат на обработка с етер,

киселина и загряване за 1 час на 50°C. За тоталната им инактивация е необходима обработка на 100°C за 1 час. Нещо повече, топлината, генерирана по време на лазерна хирургия или електрокоагулация, произвежда аерозолен облак, съдържащ вирусна ДНК, чрез която е възможно заразяване на персонала, извършващ манипулациите. Стандартното автоклавиране трябва задължително да се използва за стерилизация на хирургичните инструменти, а аерозолите, получавани по време на манипулациите, да се евакуират по съответния начин.

2.2.3.ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ИНФЕКЦИИТЕ С HPV

Приема се, че около 16% от световната популация е носителка на HPV. Съгласно едно проучване на K.J Syrjanen /156/ близо 80% от жените са изложени на риск от HPV инфекция. Счита се че разпространението на основната част от HPV инфекциите сред мъжете, са транзитни и асимптоматични, без клинични проблеми /29/.

Човешките папиломни вируси са причина за възникване и развитие на различни заболявания, както доброкачествени, така и злокачествени. В голяма част от случаите заболяването не предизвиква видими изменения или клинични прояви. Основно място за клинична изява на инфекциите, причинени от HPV, са кожата, полулигавиците и лигавиците.

Над 70 % от ново инфектираните индивиди се изчистват от HPV след 1 година и 90% след около 2 години /45/. Средната продължителност на новата инфекция е 8 месеца.

Към рисковете за прогресия на HPV инфекцията до рак се включват полигамия, тютюнопушене, употреба на алкохол, напредване на биологичната възраст, наличие на други полово преносими инфекции, имунна супресия, прием на орални контрацептиви, наркотици и други. В САЩ почти 40 милиона индивиди са инфектирани с HPV. Данните за Европа посочват за около 25 милиони инфектирани индивида.

2.3. КЛИНИЧНИ АСПЕКТИ НА ИНФЕКЦИЯТА ПРЕДИЗВИКАНА ОТ HPVs

Последиците от инфекция с HPV са свързани с доброкачествени и злокачествени заболявания при жените и по-рядко при мъжете /51/. Отделните типове показват различна вирулентност. Основно се разделят на **високо рискови** (16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 и др.) **и ниско рискови** (1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 42, 44, 53, 58 и др.).

Нискорисковите HPVs (главно от семействата на типовете 6 и 11) могат да предизвикат доброкачествени или нискостепенни клетъчни увреди, като брадавици (обикновени, плоски, островърхи, нишковидни), кондиломи, папилоза на ВОЛУСП - по кожата и гениталите на жените и мъжете /114/. Инфектиране с високорисковите HPV могат да развият цервикална интраепителна неоплазия (ЦИН), вулварна интраепителна неоплазия, интраепителна неоплазия на пениса и / или анален интраепителна неоплазия /43/. Тези състояния са известни още, като

дисплазия или преканцероза /53/. Те могат да продължат с години и да доведат до поява на рак на маточната шийка (РМШ), на вагината, на вулвата, на ануса, на пениса и другаде.

Високо рисковите вируси се откриват в 95-99% от регистрираните случаи на РМШ, като в 70- 80% от случаите се намират типове 16 и 18.

Понастоящем РМШ продължава да е значим медико-социален проблем. По данни на СЗО в света, 15% от случаите с рак при жените се пада на РМШ или годишно новозаболелите са над 561 200 пациентки, като взаимовръзката с HPV инфекция се намира в повече от 200 000 случая /85/. Всеки ден повече от 2000 жени по света, се диагностицират с HPV свързан рак.

Според **Центъра за контрол на заболяванията (CCD)** около 79-80 млн. жени са засегнатите с HPV инфекция в САЩ, като всяка година новозаразените са 14 млн. души. Около 27 000 мъже и жени годишно се диагностицират с HPV асоцииран рак, което означава нов случай на всеки 20 минути /134, 47/.

За България съгласно данните на **Раковия регистър (2012)**, РМШ е на 2-ро място в структурата на гинекологичните неоплазии с 32%, след рака на ендометриума и на 4то място с 7.2% в общата онкологична заболеваемост при жените, при пик между 30-49 г. възраст.

За посочената година новозаболелите от РМШ са 1068 (фактическа заболеваемост от 28.5 x 10^5 и стандартизирана заболеваемост – 18.9 x 10^5), с диагностицирани тежки преканцерози (CIS) – при 248 пациентки, докато общия брой на случаите с дисплазия не е ясен, тъй като те не подлежат на

задължителна регистрация. Починалите са 382, което е факт. См от 10.2 x 10^5 и станд. См – 5.9 x 10^5.

В последните години се обръща внимание, че някои типове HPVs могат да увеличат риска за сърдечно-съдови заболявания и рак на гърлото /31, 96/.

2.3.1.HPV ИНФЕКЦИЯ И БРЕМЕННОСТ

Бременността, явяваща се като временно имуносупресирано състояние на организма, представлява особен интерес за проучване на развитието и последствията от генитална HPV инфекция, тъй като съществува вероятност за HPV индуцирани клинични усложнения при протичане на бременността и раждането, както и риск от предаване на инфекцията от майката на плода. Установено е, че при бременните жени честота на HPV инфекция е по-висока отколкото при небременните и варира от 5.5% до 65% /106/.

Цервикалната инфекция на бременни с високорискови HPV типове се асоциира с възникване на предракови интраепителни неоплазии, аномалии в плацентата, преждевременно раждане и спонтанни аборти в първия и втория триместър от бременността /173/.

Доказано е, че HPV инфектира плацентата, но не е изяснен пътят на заразяване, като има няколко хипотетични възможности /168, 164/:

- чрез асцендиране на инфекцията,
- чрез инфекция на яйцеклетката или зиготата преди или в ранните етапи на имплантацията,

- чрез заразяване на яйцеклетката от сперматозоид с латентна HPV инфекция.

Физиологичните промени, които настъпват в организма на майката по време на бременността, като имунологични и хормонални изменения, създават условия за модулиране на вирусните нива и повлияване хода на HPV инфекцията, като улесняват растежа, развитието или повторната поява на лезии и/или генитални брадавици. По време на бременността гениталните кондиломи имат склонност към нарастване и могат да достигнат значителни размери поради засилена васкуларизация и хормонални и имунологични изменения, които могат дори да доведат до създаване на механична обструкция на родовия канал /55/.

Някои от основните задачи на научните разработки е да се идентифицират рисковите фактори свързани с епидемиологията на HPV инфекцията, като основен акцент се поставя върху възрастта на жената, паритета, броя на сексуалните партньори, метода на контрацепция, както и някои културални условия като тютюнопушенето. Всичко това цели да се идентифицират по- лесно рисковите групи и да се насочи вниманието на жените и здравната система към необходимите мерки за профилактика.

В едно проучване Salcedo et al. /143/ представят интересни данни при изследването на група от бременни жени спрямо такава на небременни. Авторите намират статистически значима разлика по отношение на HPV инфекцията свързана с възрастта на жената, броя на сексуалните партньори и патологията на цервикалната цитология. В изследваните групи HPV инфекцията е значително по-честа находка при бременните жени. Също така е отбелязано, че HPV инфекцията преобладава при по- младите жени както и при тези с по- голям брой сексуални партньори. Liu P и съавтори /98/ също представят данни в подкрепа на тази връзка, като посочват възрастовата

група под 25 години като високо рискова. Такива наблюдения публикуват и E. Brun-Micaleff et al. /42/, които също отбелязват, че честотата на HPV инфекцията е по-висока при по-младите жени, тези с повече сексулани партньори и ранно начало на сексуалния живот. Авторите намират връзка между тютюнопушенето като рисков фактор и инфекцията, което е отбелязано и в други проучвания /35, 40, 130/ .

По отношение на образованието и социалния статус в литературата има доста противоречиви данни. В едни публикации такава връзка не се установява /37/, докато други описват по-висока честотата на HPV инфекцията в групи с по-ниско социално-икономическо състояние /126, 153/.

Други актуални въпроси касаят скрининговите програми при бременните целящи да идентифицират HPV позитивните бременни и да проследят статуса на инфекцията, усложнения на бременността, вертикалната трансмисия на HPV инфекцията от майката на плода и други.

Извън риска за развитие на цитологичен и тъканен атипизъм ~~е~~ важен проблемът има ли повишен риск от предтерминно раждане или други усложнения на бременността при жените с HPV инфекция. В една публикация на J.N. Hong et al. /83/ се представят данни от изследването на група от 2686 жени, които имат живородени деца от единични бременности и данни от PAP тест. Групата е разделена на две – такива с нормални резултати от теста и такива с атипични. Авторите не намират доказателства, че HPV инфекцията е свързана с повишен риск за преждевременно раждане, но същевременно с това не изключват категорично риска за възможни усложнения. Тъй като има сравнително малко проучвания по въпроса се счита, че са необходими допълнителни данни за изясняване на потенциалните рискове от HPV инфекцията по отношение на преждевременното раждане.

Оценката на цервикалната цитология показва, че в основата на патологичните находки стои доказаната HPV инфекция, като превесът е на типовете HPV16 и 18. Тук е интересно да се отбележи, че при 17 от 23 HPV позитивни бременни жени или (73.9 %) е установена нормална цервикална цитология. По отношение на видовете HPV преимуществено застъпени при бременните жени са високо рискови генотипове идентифицирани предимно във втори триместър на бременността - 23.8% сравнено с 13.2%; за първи триместър, 17.4% за трети триместър и 15.1% в постпарталния период. Високо рисковите типове – HPV 16 и HPV 18 са преобладавали като находка през трети триместър на бременността /88/.

Значителният дял на разпространение на HPV инфекцията сред бременни е показателно за необходимостта за провеждане на скрининг с цел превенция на възникване на малигнени състояния на маточната шийка /112/. Има данни, че HPV инфекцията преобладава и при жени, които са имуносупресирани. Така възниква въпроса за възможния ефект на бременността по отношение възможността на организма да се самопречисти от вирусната инфекция /48/.

Въпреки, че в доста проучвания резултатите подкрепят по- високата честота на HPV инфекцията сред бременните /70, 68, 110/, има и такива, които не намират такава асоциация /119/. Тези противоречиви резултати могат да бъдат свързани, както с подбора на клиничните групи, така и с разлика в методите на генотипизиране на видовете HPV.

Общоприето е схващането, че честотата на премалигнените и малигнените епителни находки на маточната шийка при бременните не се различава съществено, от тази при сексуално активни, небременни жени. В действителност проблемите на диагностичния процес не са така елементарни,

още повече, че появата на патологични резултати е истински стрес за пациентките и лекарите.

В тази връзка проучванията показват, че съществува връзка между HPV инфекцията с високо рискови типове и цервикална интерепителна неоплазия по време на бременността /171/. Нивата на вирусният товар корелира с тежеста на CIN, като тя е значително по-висока в сравнение с бременни с цервицити или при небременни жени /28, 150/.

Редица проучвания насочват вниманието на изследователите към влиянието на HPV инфекцията върху бременността, още повече, че новообразуванията на маточната шийка са най-честите тумори през бременността /56/.

Цитологичните отклонения се срещат при 5% от бременните. Карцинома in situ се намира в границите от 0,11 до 0,55%, а РМШ е около 0,03% от бременните. Обобщените данни на различни автори, показват че цервикалния карцином се среща в широкия интервал между 1:250 до 1:13000 бременности (средно 1:2000 до 1:3000) /25, 175/.

В България единствените проучвания на епитела на маточната шийка по време на бременност са разработвани в научните трудове на А. Карагьозов /13/ и В. Златков /7, 175/.

В изследването на А. Карагьозов са оценени колпоскопските промени на маточната шийка след раждане при първескини и многораждали. Докато В. Златков, в своя дисертационен труд установява статистически значима разлика на резултатите от цитологичното, колпоскопското и хистологичното изследване на епитела на маточната шийка при жени с начална бременност при сравняването им с контролната група от небременни жени. Посочва се, че тези различия се дължат на преобладаване на възпалителните изменения, HPV-лезиите и нискостепенните форми на CIN. Допълнително, той въвежда

имунохистохимичния (ИХХ) и ин-ситу хибридизационния метод (ISH) за идентифициране на папиломния вирус, като първи стъпки за разкриване типовото разнообразие на това заболяване.

2.3.2. HPV ИНФЕКЦИЯ ПРИ НОВОРОДЕНИ

Данните за риска от предаване на HPV инфекцията от майката на новороденото (вертикална трансмисия) са противоречиви и в различните източници варират от 1-5% до 40-80% /127/.

Връзката на ларингеалната папиломатоза и острите кондиломи на новороденото по вагинален път с HPV-инфекцията на майката е добре известна /76/. По отношение наличието на тези изменения и при деца родени чрез цезарово сечение стои въпроса за пътищата на перинатална вертикална трансмисия. Проучванията на Armbruster-Moraes et al. /30/ на околоплодната течност за наличието на папиломни вируси, чрез амниоцентеза за пръв път показа 24 от 37 положителни проби за HPV типовете 16, 18, 33 при бременни с аногенитална папиломатоза, без да може да се оцени значението на тези находки, по-отношение здравното състояние на плода. Обсъжда се възможността този първи контакт да има отношение към някои малформации на фетуса, както и за връзката със спонтанните аборти.

Потенциалните пътища за заразяване с HPV на новородените от заразените майките са: при преминаване на плода през инфектирания родов канал, чрез възходяща инфекция при преждевременно спукване на околоплодния мехур, чрез виремия и/ или инфектирана семенна течност при оплождането. Откриването на HPV в амниотичната течност, фетусните мембрани, кръвта от пъпна връв и трофобластните клетки на плацентата

предполага инфектиране с HPV in utero, т.е. още по време на бременността (пренатална трансмисия) /157/. Вероятността от вертикалната вирусна трансмисия предполага клинично третиране на инфектираните жени при семейно планиране преди бременността, изготвянето на стратегии за ваксиниране, както и избор на начина на раждане – нормално или чрез цезарово сечение. Затова е важно не само изясняването на честотата на трансмисия, но също и проследяването на съвпадението на типовете, детектирани при майката и при детето.

Вродената HPV инфекция в даден момент може да доведе до остра инфекция с клинична изява, изразена в орални брадавици, аногенителни кондиломи и ларингеални папиломи. Обикновено папиломите регресират в продължение на месеци или години. Независимо дали вродената HPV инфекция е клинично изявена, съществува вероятност инфекцията с онкогенни типове HPV да доведе до натрупване на генетична нестабилност на инфектираните клетки, която да се прояви в по-късна възраст. Например, неустановени и нетретирани аногенитални инфекции с HPV в ранна детска възраст представляват опасност от възникване на продължителни неопластични изменения в по-късна възраст, водейки до развиване на рак на гениталиите при възрастните /147/.

Вертикална (перинатална) трансмисия на HPV от майката на новороденото по време на раждане може да предизвиква инфекции на дихателните пътища, които се проявяват предимно като ювенилна рекурентна респираторна папиломатоза. Ларингеарните папиломи, които са първичната форма на това заболяване, са най-често срещания доброкачествен тумор на ларинкса при деца. Ларингеалните папиломи се проявяват като дрезгавост, хриптене и кашлица и само в редки случаи могат да запушат дихателните пътища и да застрашат живота на пациента. Трахеята, бронхите,

белодробната тъкан и носоглътката са засегнати по-рядко. Средната възраст, при която се изявява ювенилната рекурентна респираторна папиломатоза е 4 години. Тя може да персистира с години и да има физически и емоционални последствия. Значителни рискови фактори са нормалното раждане, първо раждане и възраст на майката под 20 год /147/.

В едно проучване на Martinelli et al. /104/ изследват група от 177 новородени. Инфекция с HPV е установена при 25 пациента (14.1%), а при анализа на последователността от нуклеотиди са описани осем различни генотипа. Тези данни потвърждават установяването на HPV в устната лигавица на новородени.

Друго проучване е насочено към възможността да се докаже предаването на HPV от майката на новороденото. Подбрани са две групи – HPV позитивни майки и HPV негативни /46/. За да се оцени преобладаването на HPV и разпределението на генотиповете по време на бременността е проведено и съответното скрининг проучване за установяване на ДНК на HPV на шийката на матката сред 828 бременни. Изследвани са клетки от шийката на матката на майките по време на бременността (средно 31 г.с.), около раждането, при контролния преглед 6 седмици след раждането и на възраст около 3, 6, 12 и 24 месеца. Цитологичният материал е събиран –от устата и външните полови органи на бебетата. Резултатите посочват, че вирусната ДНК на HPV от маточната шийка е установена в 6.5% от бременните (54 от 828).

При изследваните 418 новородени (среден период на проследяване 14 месеца), в 19.7% от новородените от майки с положителен резултат за HPV и при 16.9% новородени от родените от майки с отрицателен резултат са налице положителни резултати за HPV в даден момент от проследяването на

бебето. Най-често установявания генотип както у бебетата, така и у майките е HPV - 16.

Установена е статистически значима връзка между статуса на майката и детето по отношение на HPV при контролния преглед 6 седмици след раждането. Посочва се, че вероятността децата на майки положителен резултат за HPV при прегледа след раждането да имат тест с положителен резултат за HPV е 5 пъти по-голяма от вероятността положителен резултат да имат децата на майки с отрицателен резултат ($p = 0.02$).

Проведеното проучване потвърждава, че рискът от вертикално предаване на генотиповете на HPV е сравнително нисък. Тези данни показват също, че вертикалното предаване може би не е единственият източник на зараза с HPV сред бебетата и представляват частично доказателство за хоризонтално предаване на HPV от майка на дете. Подобни резултати представят Park et al. /127/, като в тяхното проучване рискът за вертикално предаване на вирусната ДНК на HPV от майка на новородено се увеличава при вагинално раждане при маточна шийка с HPV инфекция. Отсъствието на вирусна контаминация при бебетата на 6 месец след раждането обаче може да предположи по-скоро временно заразяване, отколкото действително вертикално предаване.

Rombaldi et al. /140/ представят интересни данни за трансмисията на HPV от майката на детето чрез плацентата, по време на бременността. Счита се, че е налице предаване през плацентата, ако се установява съвпадение на типа на HPV между резултатите за майката, плацентата и новороденото или между резултатите за майката и за кръвта от пъпната връв. Проучването включва 49 бременни жени с положителен резултат за ДНК на HPV при раждането. Положителен резултат за ДНК на HPV е установен в пробите от дванадесет плаценти (24.5%, n = 12/ 49), както и пробите от носно-

фарингеалния секрет, от устата или от кръвта от пъпната връв на единадесет новородени. В 5 случая (10.2%, n = 5/ 49) има съвпадение на типа на HPV между пробите от гениталната област / плацентата / новородените. В един случай (2%, n = 1/ 49) е доказано съвпадение на типа на HPV между пробите от гениталната област/ кръвта от пъпната връв и това също предполага предаване през плацентата. Наблюдава се положителна и значима корелация между инфекцията с HPV през плацентата и променливите характеристики на майките показващи наличие на имуносупресия. В заключение проучването предполага инфектиране на плацентата в 23.3% от проучените случаи и предаване през плацентата в 12.2%.

В България, до момента клинични проучвания за оценка риска от предаване на HPV инфекцията от майката на новороденото не са правени.

2.4.ВЪЗМОЖНОСТИ НА HPV ДИАГНОСТИКАТА

Традиционните методи за диагностика на вирусна инфекция, като електронна микроскопия, клетъчно култивиране и прилагане на методи за имунологична диагностика като цяло не са подходящи за човешкия папилома вирус, тъй като той не подлежи на клетъчно култивиране /133/.

2.4.1. ХИСТОМОРФОЛОГИЧНА ОЦЕНКА

Морфологично, индуцираните от HPV изменения представляват доброкачествени епителиоми, обусловени от пролиферацията на инфектираните клетки от базалния слой на многослойния епител с участието на субепителната строма, като времето за инкубацията е от 3 седмици до 8 месеца (средно 3 месеца). Съгласно критериите на Meisels et al. /107/, те се проявяват основно под три форми на лезиите: екзофитна (от 6,6 до 12,4 %), плоска (от 69,0 до 78,9 %) и инвертна / ендофитна (от 14,5 до 18,6%), в зависимост от локализацията и посоката на растеж /12/. Обръща се внимание на съчетанието на папиломните лезии с цервикалната интраепителна неоплазия, както и с възможността за многоогнищна изява на находките /81, 141, 167/. Според Robertson et al. /139/ съществува голяма разлика в оценките на различните патолози при идентифициране на CIN измененията, когато са асоциирани с HPV.

В тази връзка се подчертава, че хистологичното изследване е с богата морфологична картина най-често показваща папиломатоза, акантоза, паракератоза и хиперкератоза /12/. Характерни са още койлоцитната дисплазия и многоядреността /93/.

За диагностичната практика се препоръчват различни скоринг системи, като тази на Reid et al. /135/, която заради своята простота и ефективност е внедрена и в нашите хистоморфологични лаборатории /12, 14/.

2.4.2. ЦИТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

Според Карагьозов и сътр. /12/ при рутинен цитологичен скрининг HPV - измененията се срещат в 1,5 - 1,7%, като диагностичната сигурност е 58,62%. В обширно проучване на 15 патолози от различни лаборатории на Франция от почти 400 000 цервико-вагинални намазки е установено наличие на нискостепенни HPV-изменения в границите от 0,2 до 2%, а високостепенните между 0,5 и 5,2% /103/. Интерес в това отношение, представляват данните от перинаталните центрове на Тексаския университет за 1989 г., показващи, че 10 % от всички цитонамазки при бременните имат промени свързващи се с HPV. При това нискостепенните се наблюдават в 86 %, а високостепенните-в 14 % от пациентките /78/.

Койлоцитната атипия е термин предложен от Koss и Durfee през 1956 г., с който те свързва добре познатите "балонни" клетки с вирусната инфекция /142/. Касае се за суперфициална или интермедиерна клетка, с неправилно разпределен ядрен хроматин и голямо перинуклеарно хало избутващо в периферията, плътна и най-често тъмно оцветена цитоплазма. Тази находка се приема за главен белег на HPV – инфекция /107/. Трябва да се знае, обаче че ДНК - хибридизационните методики показват това съвпадение едва между 50 - 70% /12, 26, 27.93, 141/. Според И.Карагьозов и Макавеева /15/ обособяването на койлоцитната дисплазия в III d gr. Pap от Stegner (1981), с право доби своеобразна гражданственост поради високата честота на находките. Този проблем намери своето развитие и с включването на цитологичните HPV промени в още в първия вариант на класификационната система - Bethesda 1988 / 91 г. /117/.

Дискератоцитите са друг цитологичен белег на HPV-инфекцията. Те са малки кератинизирани суперфициални клетки с плътни, а по някога и

пикнотични ядра. Протоплазмата им е плътна и при оцветяване по Pap се багри оранжево. Срещат се и под формата на ламели и плакарди, поради лесната ексфолиация /26, 27, 93, 141, 107/.

Описваните кондиломатозни парабазални клетки са с неясна хроматинова структура и перинуклеарно просветляване в цианофилна или амфофилна протоплазма`/26, 27, 93/.

Многоядреността най-често засяга койлоцитите, някои дискератоцити и по рядко единични кондиломатозни парабазални клетки. Степента на ядрените аберации може да доведе до трудности при диагностичната им диференциация от дискариотичните промени. В този случай цитонамазката трябва да се класифицира, като показваща гранични ядрени промени (borderline nuclear changes) и да се изисква извършването на колпоскопски контрол /26, 27/.

2.4.3. КОЛПОСКОПСКА ДИАГНОЗА

Според проучванията на И.Карагьозов /12/ честотата на гениталната HPV инфекция варира от 2,68 % до 5,51 % спрямо броя на колпоскопските изследвания, като в 90,16 % инфекцията протича субклинично. Това обяснява, защо клиницистите, които до средата на осемдесетте години познаваха само екзофитните форми на HPV, диагностицираха твърде рядко тази инфекция.

През годините са използвани различни колпоскопски класификации. Всяка една от тях има характеристика добре описана в различните ръководства /12, 79, 113, 142/. В България, от методологична гледна точка

Карагьозов (1989) препоръчва използването на следната класификация за HPV-промените на маточната шийка: 1.Типична остра кондилома и 2. Субклинична папиломна инфекция с нейните подвидове - микропапиларна (spiked) папилома, плоска папилома, инвертна и colpitis et cervicitis condylomatosa.

От диференциално диагностичен аспект е важно да се познават колпоскопските критерии за диференциране на HPV от CIN лезиите. При HPV-инфекцията се касае за блестящо снежно бели изменения разположени по-често извън зоната на трансформация с неравна повърхност и разляти граници. Промените, които са суспектни за CIN показват в т. нар. "матриксни участъци" по-убита сива тоналност, плоска повърхност (с изключение на участъците с тежък атипизъм) и са строго ограничени в зоната на трансформация. Тези разлики в колпоскопския образ, които са в съгласие със съвременното разбиране за онкогенезата на маточната шийка, дават основание в новите колпосскопски класификации (от Барселона -2002 и Рио де Женейро-2011) да се изисква прецизиране локализацията на измененията спрямо зоната на трансформация, както и обособяване на различни морфологични форми на оцетно белия епител /11, 9/.

Според Карагьзов и сътр. /12/ въпреки че при колпоскопия могат да се открият не повече от 1/5 от неекзофитните лезии, колпоскопското изследване придобива нови измерения. Това се дължи на високата сензитивност на методиката в улавяне и на най-малките продуктивни изменения. Подобни аспекти на диагностичната оценка се намират и при цервикографското изследване, което според Stafl (modern) намира фалшиво отрицателни резултати при пациентки с HPV - инфекция само в 20 %, за разлика от 64 % показани от цитологичното изследване.

2.4.4. ВИРУСОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

През 1988 г. И. Карагьозов и сътр. изработиха проектоинструкция относно диагнозата и поведението при HPV-инфекциите на женските генитали в рамките на рутинния онкологичен скрининг. По същество по-горе бяха разгледани предложените хистологични, цитологични и колпоскопски критерии за диагнозата на HPV-измененията. В действителност, това са класически индиректни диагностични методи, които продължават да са в основа на ежедневната гинекологична практика, като осигуряват достатъчно висока степен на съвпадение със съвременните ДНК-анализи / 21/.

От началото на 1980 г., предвид необходимостта не само от доказване последиците на тази инфекция, но и от идентифициране ролята на отделните типове HPV, започна бурното развитие на различните специализирани вирусологични техники.

2.4.4.1. ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН МЕТОД

В клиничната практика поради наличието на подходящи търговски китове най-често се прилага индиректния имунопероксидазен метод (IP-PAP). Касае се за диагностикум откриващ HPV антигените в парафинови срези от цервикални лезии. Те се изявяват при разрушаване капсида на вирионите, като освободените структурни протеини са общи групово специфични антигени. Това дава възможност на антисерума да реагира с всички добре познати папилома вирусни типове. И.Х.Х. потвърждава наличието на HPV - антигени изключително в ядрата на койлоцитите или в суперфициалните

дискариотични клетки /93, 107/. Според различните автори И.Х.Х. техника показва наличието на папиломни антигени само в 50 % от хистологичните препарати и в 67 % от цитонамазките на папиломните лезии. Интерес представлява факта, че експресията на HPV-антигените зависи от морфологията и малигнизацията на измененията. Според Syrjannen и Pyrhonen /158/ екзофитните лезии са с по-висока честота на положителните резултати от плоските, а малигнизирането на епитела води до негативиране на положителната за вируса И.Х.Х-реакция. За съжаление тази закономерност не е задължителна, следователно не може да се използва, като прогностичен критерий.

Понастоящем много лаборатории, прилагат И.Х.Х., като скринингов метод поради неговата техническата достъпност. Същевременно се обръща внимание, че приложимостта на тази диагностика сериозно се ограничава от възможността да бъде използвана само при продуктивните инфекции.

2.4.4.2. МОЛЕКУЛЯРНИ БИОЛОГИЧНИ ТЕХНИКИ

Познати са различни хибридизационни, амплификационни и секвенционни молекулярни биологични техники използувани за откриване и типизиране на човешките папиломни вируси / 154, 162, 167, 6/.

I. *ХИБРИДИЗАЦИЯ ОТ ТИПА "БЕЗ АМПЛИФИКАЦИЯ НА ДНК":*

- Southern blot анализ (SB)
- Dot blot анализ / Vira Pap

- Филтърна in situ хибридизация (Fish)
- In situ хибридизация (ISH)
- Hybrid Capture Assay (HCA)

II. *ХИБРИДИЗАЦИЯ ОТ ТИПА "С АМПЛИФИКАЦИЯ НА ДНК":*

- Чрез верижна полимеразна реакция (PCR)
- Multiplex PCR (MPCR)
- Reverse Transcription PCR (RT-PCR)
- Real-time PCR

III. *СЕКВЕНЦИОННИ МЕТОДИКИ*

- Секвенционен анализ
- Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis и др.

Southern blot анализът е в основата на всички хибридизационни методи без активиране на ДНК. При него, извлечената от клетката ДНК след третиране с подходящи ензими се диспергира електрофоретично върху гел, след което се подлага на денатурация и фиксиране. Визуализацията на получените ДНК фрагменти се извършва с помощта на позната сонда (фрагмент на ДНК или РНК), маркирана с изотоп или ензим, свързваща се специфично с търсения фрагмент /6/.

От методологична гледна точка е прието, че SB-техниката е своеобразния "златен стандарт" за сравнителните изследвания между различните методи на хибридизация, от една страна поради добре дефинираната чувствителност, а от друга - от възможността типовата специфичност за отделните вируси да се доказва комбинирано, чрез хибридизация и ограничен ензимен анализ /144/. Проучванията в тази област показват добра корелация в резултатите между PCR, SB, Vira PAP и ISH, като

най-висока сензитивност има хибридизацията чрез верижната полимеразна реакция (PCR) /91, 121,162/. Смята се, че FISH метода е с по ниска сензитивност и се препоръчва да не се използва за епидемиологични проучвания / 154./

Тези методи се прилагат за откриване и типизиране на HPV и са достатъчно чувствителни, специфични и бързи. Неудобствата при тях се свързват с трудоемкостта, слабите възможности за автоматизиране, както и необходимостта от по-големи количества клетъчен материал (ДНК). Трябва да се отбележи, че появата на второ и трето поколение на Hybrid Capture анализа рязко повиши чувствителността на теста и възможностите за определяне на по-голям брой HPV типове. Тестът позволява автоматизация на процеса и е особено подходящ за скринингови програми /154, 144/.

В България, пионер във внедряването на молекулярните биологични техники се явява А. Минчева /19/. Тя има приоритет в приложението на филтърната in situ хибридизация, но в разработката си съобщава и за известен опит със Southern blot техниката, както и с нерадиоактивни тестове за доказване на ДНК на HPV в биопсии на генитални лезии /21. 20/. Рутинно приложение на комерсиални in situ хибридизационни тестове съобщава Г. Ганчев и сътр. (НСБАЛО) /71/.

В последните двайсет години водещите молекулярни биологичните техники са свързани с откриване на HPVs след ензимно умножаване на ДНК специфични фрагменти от вирусната НК. Това е в основата на т.нар. **полимеразната верижна реакция** (PCR) и нейните различни разновидности, като тази амплификация се постига чрез използване от една (PCR) до три (MPCR) двойки специфични олигонуклеотидни “зародиши” (праймери). Реакцията протича циклично, в три основни етапа: последователно редуване на денатуриране на НК, свързване на праймерите към съответните места и

изграждане на амплификационен продукт. Преминаването от един етап в друг става чрез смяна на температурата, което позволява повтаряне на циклите и многократното умножаване на желания фрагмент /36, 99/.

За скринингови цели е необходим такъв PCR протокол, който да позволява едновременно определяне на различни типове HPV. Поради тази причина се използуват праймери, специфични по отношение на постоянни нуклеотидни последователности на различните HPV типове /36/. В случаите с РМШ, където вирусният геном е интегриран в хромозомите на клетката гостоприемник, доказването на инфекцията е възможна чрез т. нар. PCR с обратен презапис (RT-PCR) на специфичните РНК последователности /36, 99. 105/.

Полимеразната верижна реакция с т. нар. консенсусни праймери дава възможност да се установи присъствието на ДНК на папиломния вирус, но същевременно тя не е достатъчно информативна за генотипа на наличния вирус. За да се получи информация за генотиповете на HPV инфекцията се използват методи за генотипизиране чрез типовоспецифични праймери / 99, 165, 105/.

Друга възможност за генно типизиране е чрез прилагане на секвенционните техники. Това е свързано с необходимостта от определяне на различните варианти HPV типове, тъй като при някои е налице различен онкогенен потенциал. Тази вариабилност на вируса се дължи на промени, основно свързани с некодиращия регион (LCR) на HPV генома. Понастоящем, секвенционният анализ на хипервариабилните региони в генома на HPV се явява “златен стандарт” при сравняване на отделните варианти на съответния тип / 36, 99/ .

В България, първи съобщения и свои опит с приложението на амплификационните и секвенционни техники в гинекологичната практика

съобщават колективите на Зл. Кълвачев и П. Драганов (НЦЗПБ), Д. Тончева (МУ-София), Н. Шикова и П. Грозданов (БАН) /74, 75/.

ДНК базираните методи за откриване на HPV показват само наличие на вирусна инфекция, но те не могат да определят онкогенната и значимост, тъй като те не са в състояние да разграничат активната персистираща от транзиторната (преходна) инфекция. В тази връзка през последните години се прилага нова концепция свързана с РНК-базирани молекулярни техники. Подобна технология разработена като търговски диагностичен набор е т.нар. NASBA метод (**N**ucleic **A**cid **S**equence-**B**ased **A**mplification). Тя е фокусирана в откриването на по-специфични рискови фактори, каквито са E6 и E7 онкогените на високорисковите HPVs. У нас, първи стъпки в усвояване на новата методика съобщават В.Златков и сътр /3/.

Обобщеният анализ от приложението различните молекулярни биологични техники показва, че те могат да бъдат препоръчани, като:

- *самостоятелна техника на цервикалния скрининг* (първичен скрининг),
- *част от цервикалния скрининг,* особено що се касае за определяне прогнозата при жени с цитонамазки имащи неопределена значимост и високостепенна характеристика.
- *техника за проследяване резултатите от лечението*

ОБОБЩЕНИЕ

Инфекцията с HPV е проблем, който трябва да бъде разглеждан в много аспекти. Основната насока е свързана с риска за развитие на пренеопластични и неопластични състояния главно на женската репродуктивна система. Това стои в основата на редица медико социални дейности и решения включващи прилагане на методите на първичната и вторична профилактика.

Бременността, явяваща се като временно имуносупресивно състояние на организма, представлява особен интерес за проучване на протичането и последствията от генитална HPV инфекция чрез проследяване на HPV статуса, морфологичните находки, честотата на спонтанни аборти и преждевременни раждания. От друга страна с не по- малка значимост е степента на риск за предване на инфекцията у новороденото и възможните последствия.

В нашата страна проучване на ролята на HPV инфекцията е изследвана от различни автори. П. Андонов /1/ установява връзка между някои ракови заболявания на гениталите и папиломни вируси. И. Карагьозов и сътр. /12/ и Т. Минчева и сътр. /19, 20, 21/ разглеждат ролята на човешкия папиломен вирус при гениталните инфекции. Промените на епитела на маточната шийка при жени с начална бременност и присъствието на HPV е отразено в дисертационния труд на В. Златков /7/. Ролята на HPV във връзка с репродуктивни проблеми е изследвана само по отношение на спонтанни аборти /18/.

До сега не са правени системни проучвания за честотата на HPV инфекция, разпределението на вирусните типове и индуцираните клинични промени при бременни. Липсват сведения за общото

разпределение на HPV сред българската популация, а данните за разпределение на типовете HPV са твърде ограничени, въпреки че в България е установена една от най-високите честоти на разпространение на рак на шийката на матката в Европейския съюз.

За да се намали вероятността от възникване на усложнения от HPV инфекцията по време на бременността, както и риска от вертикална вирусна трансмисия при новородените, е необходимо провеждането на задълбочени изследвания за разпространението и последствията от HPV инфекцията при български пациентки. **Интересни въпроси с противоречиви отговори в някои от досегашните проучвания в литературата са**:

- Кои са основните фактори водещи до по-висок риск за предаване и разпространение на инфекцията с HPV?
- Кои са преобладаващите високо рискови типове HPV сред българските пациентки по време на бременност?
- Какви са диагностичните възможности на класическите и съвременните методи за откриване на HPV инфекция?.
- Каква е честотата на персистенция или елиминиране на HPV инфекцията при бременната след нейното проследяване в постпарталния период?
- Има ли доказателства за вирусна HPV трансмисия от майката на плода?

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата разработка е:

С ПОМОЩТА НА СЪВРЕМЕННИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ ДА ПРОУЧИМ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО И КЛИНИЧНАТА ЗНАЧИМОСТ НА ОСНОВНИТЕ РИСКОВИ ТИПОВЕ НА HPV ИНФЕКЦИЯТА НА МАТОЧНАТА ШИЙКА ПРИ БРЕМЕННИ ЖЕНИ.

За изпълнението на тази цел си поставихме задачи:

1. Да анализираме проучените анамнестични, клинични и лабораторни данни за здравното състояние на изследваните пациентки.
2. Да сравним тежестта на цитологичните, колпоскопските и хистологични находки на маточната шийка по време и 6-8 седмици след приключване на бременността.
3. Оценка динамиката на HPV статус на изследваните пациентки.
4. Да изследваме за наличие на вертикална трансмисия на HPV инфекция от майка на новородено.
5. Да проучим клиничната значимост на цитологичното и колпоскопско изследване с HPV статуса на маточната шийка по време и след приключване на бременността
6. Да предложим алгоритъм на поведение при бременни с HPV инфекция.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

Проучването включва 227 бременни жени (между 18 и 49 г.) и 54 новородени. Бременните и родилите жени бяхао предварително уведомени за целите на изследването и са дали устно съгласие (приложение 1). Материалът е събран за период от 2010 г. до 2016 год. на база преминали пациентки през МЦ „Майчин дом“, като бременностите бяха проследявани в СБАЛАГ „Майчин дом”.

Всички изследвани бременни жени, на базата използвания набор от HPV типове бяха разделени на ДВЕ основни групи:

- HPV (+) пол. пациентки с начална бременност - 87 жени, от тях 87, явили се на контролен преглед средно 6-8 седмици след приключване на бременността, и
- HPV (-) отр. пациентки с начална бременност – 140 жени, от тях 140, проконтролирани за същи период след завършване на бременността, които са приети за контролна група.

По време на проучването, от по-горе обособените групи се обособиха в зависимост от приложените допълнителни изследвания, следните подгрупи:

1. Клинично-лабораторни изследвания:

а. Анамнеза и гинекологичен статус – при всички изследвани жени

б. Лабораторен минимум при 227 жени.

2. Цитологичното изследване на маточната шийка (Pap-тест): при 227 пациентки (от тях 227 бременни и при 227 небремени (поспартум).

3. Колпоскопска оценка: при 227 пациентки (от тях 227 бременни и 227 след приключване на бременността).

4. Хистологично изследване (след прицелна биопсия и конизация): при 7 жени (от тях 1 бременна и 6 жени след бременност).

5. От групата на родилите HPV позитивните жени, допълнително се изследваха 54 новородени за HPV носителство на базата използвания набор от китове.

4.2. МЕТОДИ

Представената разработка е осъществена с помощта на клинични, иконоскопски, инструментални, лабораторни, морфологични, вирусологични и статистически методи.

4.2.1. Гинекологична анамнеза и статус

В рамките на клиничното проучване беше отделено внимание на следните данни:

- възраст на пациентката
- паритет: брой на раждания и аборти
- срок на аменореята или фазата на цикъла
- субективни оплаквания за генитален флуор и кървене
- тютюнопушене - над 10 цигари дневно
- антиконцепция
- предходни терапевтични въздействия върху маточната шийка
- палпаторен статус

4.2.2. Лабораторни показатели.

Кръвни:

- хемограма: хемоглобин, хематокрит, левкоцити и СУЕ
- биохимия: кръвна захар, креатинин, общ белтък, албумин
- чернодробни ензими: СГОТ, СГПТ, АФ, ГГТП

В урината:

- албумин, захар, билирубин, уробилиноген, кетотела и седимент

Хемограмата, биохимията, чернодробните проби и урината бяха изследвани в лаборатория СМДЛ „РАМУС” и интерпретирани съобразно съответните референтни стойности. /11/

4.2.3. Специализирани акушеро-гинекологични изследвания

4.2.3.1. Цитологичен метод

Материалите за цитологичното изследване се взимаха по класическия способ от екзо- и ендоцервикса (след обзорна колпоскопия), с помощта на два стерилни памучни тампона (поради наличната бременност), и последваща фиксация в 95% етилов алкохол. По-нататъшната обработка на така подготвените препарати се осъществяваше в отделението по „Обща и клинична патология” на СБАЛАГ "Майчин дом", чрез оцветяване с haemalaun - eosin. Резултатите от проучването се определяха по класическите критерии на Papanicolaou - Koss в модификация на К. Цанев (1989). /94, 23/.

4.2.3.2. Колпоскопски метод

Прегледите се осъществяваха с апарат на фирмата Olympus (модел OCS3 фиг. 4) след приложението на 3% разтвор на оцетна киселина, при необходимост в съчетание с употребата на зелен филтър или пробата на Schiller. Находките се класифицираха **колпоскопска класификация** на IFCPC (**Барселона 2002**).



Фиг. 4. Колпоскопски апарат Olympus (модел OCS3).

4.2.3.3.Методи осигуряващи материал за хистологично изследване

4.2.3.3.1. Прицелна биопсия

Биопсията се взимаше от колпоскопски атипичния участък на маточната шийка, а в останалите случаи - от предварително избрано място

(условно "около 2 часа"). Така полученият материал се фиксираше в 10 % неутрален формалин, а парафиновите срези се оцветяваха с haemalaun - eosin или по Van Gieson.

4.2.3.3.2. Конизация на маточната шийка

Диагностично / терапевтичната конизация се извърши по метода на Sturmdorf - Белецки на пациентки, които имаха съответните индикации за този подход след приключване на бременността.

Обработката на хистологичните материали се извърши в отделението по „Обща и клинична патология" на СБАЛАГ "Майчин дом". Класифицирането на находките се осъществи по критериите на Richart за CIN, а по отношение оценката на HPV - лезиите се приложи семиобективната скоринг - система на Reid. /23 16/.

С оглед целта и задачите на проучването, резултатите от цитологичното, колпоскоското и хистологичното изследване бяха обобщени съобразно своята характеристика в следните 6 групи:

Група 0. - Находки, непозволяващи класифициране

Група 1. - Нормални находки

- цитология: I гр. Pap
- колпоскопия: оригинален плосък епител, цилиндричен епител, нормална зона на трансформация
- хистология: нормален плосък и цилиндричен епител

Група 2. Нормални, други доброкачествени находки

- цитология: II гр. Pap
- колпоскопия: различни други находки, като възпаление, ендометриоза, полипи и др.
- хистология: друг доброкачествен епител с или без данни за възпалителни изменения

Група 3. - Нискорискови, патологични находки

- цитология: III-А гр. Pap
- колпоскопия: дискретни, нежни анормални колпоскопски находки - плосък оцетно-бял епител, пунктирана зона, мозайка и левкоплакия, в или извън ЗТ
- хистология: CIN I-II (по Richart)

Група 4. - Високорискови, патологични находки

- цитология: III-Б гр. Pap
- колпоскопия: по тежките варианти на анормалните колпоскопски находки, както и участъците със съдов атипизъм или йод-негативност, в или извън ЗТ
- хистология: CIN III

Група 5. - Находки суспектни за микроинвазивна или инвазивен РМШ

- цитология: IV или V гр. Pap
- колпоскопия: суспектни за инвазивен карцином
- хистология: плоскоклетъчен или аденокарцином

4.2.3.4. Ултразвуков метод

Той се приложи само при бременните, с помощта на линеарен, real-time ехографски апарат-модел Fukuda Denshi FFsonic UF-4100 с трансдюсер от 3,5

MHz. Използваха се биометрични параметри, като GES, CRL, BPD и FML имащи пряко отношение към точното определяне срока на бременността.

4.2.4. Специализирани вирусологични изследвания

4.2.4.1. HPV - типизация, чрез ДНК - амплификация

Изследването се извърши в Генетична Медико-Диагностична Лаборатория "Геника" ООД. Приложи се GenoFlow HPV Array test, използвайки комерсиален кит (DiagCor, Hon Kong, China) върху ДНК изолирана от цервикален клетъчен материал на сух памучен тампон или в течна среда. Типизацията чрез хибридизация се извърши за следните 33 типа типовете: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 84.

Те бяха разделени в три групи съгласно своя онкологичен потенциал, както следва:

- Високо рискови типове HPV:

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66/68

- Средно рискови типове HPV:

53, 73, 81, 82

- Нискорискови типове HPV:

6, 11, 40/61, 42, 43/44, 54/55, 70, 57/71, 72, 84/26.

Техника

- **Подбор на биологичните проби**

Човешките папиломни вируси имат изразен тропизъм към цервикалния епител, поради което за извършване на изследванията беше използван ендоцервикалнен секрет от бременните жени, взет с помощта на сух стерилен памучен тампон чрез трикратно завъртане на тампона по посока на часовниковата стрелка. Клетъчният материал полепнал по повърхността на тампона се прехвърля в епендорф епруветка с 500 мкл транспортна среда. Събирането на пробите, включени в изследването, беше извършено от докторанта.

- **Изолиране на ДНК от пробите.**

От клетъчните материали беше изолирана вирусна ДНК с помощта на търговски кит според инструкциите, предоставени от производителя (Qiagen, Valencia, CA). Получените ДНК проби могат да бъдат съхранявани за дълъг период от време при минус 20°C.

- **Полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR)**

За установяване HPV инфекция в изследваните биологични проби беше използвана полимеразна верижна рекция (polymerase chain reaction, PCR), един от основните молекулярно-биологични методи в клиничната диагностика. Използваният търговски кит (AmpliSens HPV HCR genotype-EPh PCR kit) за PCR амплификация на ДНК позволява качествено определяне и диференциране на 12 високорискови генотипа HPV в клинични проби (цервикални секрети). Изолираната тотална ДНК от клетъчния материал, получен от клиничната проба, може да съдържа освен човешката геномна ДНК, и вирусната ДНК. За да се установи присъствието на вирусна ДНК, в PCR реакцията към тоталната ДНК се прибавят специфични

олигонуклеотидни ДНК последователности, наречени праймери, които разпознават и се свързват комплементарно само със специфични участъци от ДНК на папиломния вирус. С помощта на термостабилна ДНК-зависима ДНК-полимераза в буферна среда с подходяща концентрация на Mg2+ йони и в присъствието на свободни нуклеотиди се намножават специфичните вирусни ДНК участъци, ограничени от праймерите. За присъствието на съответния вирусен генотип в изследваната ДНК проба се съди по наличието на получените PCR продукти с определена дължина. Амплифицираните ДНК фрагменти могат да се съхраняват за 16ч при стайна температура и за една седмица при 2–8 °C.

- **Условия на амплификационната реакция**

Амплификационната реакция се извършва в PCR апарат, който поддържа определените температури, необходими за последователното осъществяване на всеки етап от PCR реакцията – денатурация, хибридизация на праймерите (анийлинг) и синтез на ДНК. Първоначалната денатурация на ДНК матрицата става при 95^{o}C за 15 мин. Следват 42 цикъла за амплификация на ДНК фрагментите при следните условия, повтарящи се на всеки цикъл – денатурация 95^{o}C – 30 сек.; анийлинг 63^{o}C – 30 сек.; елонгация 72^{o}C – 40 сек. След което се извършва допълнителна елонгация при 72^{o}C за 1мин.

- **Детекция на получените PCR продукти**

Получените от PCR реакцията амплифицирани ДНК фрагменти (PCR продукти) се детектират чрез разделяне на хоризонтална 3% агарозна гел електрофореза в TBE буфер (трис, борат, ЕДТА). PCR продуктите се визуализират след оцветяване с етидиев бромид с помощта на UV светлина. Интензитетът и дължината на PCR продуктите се сравнява с маркерни ДНК

последователности с известна дължина и концентрация и вирусният генотип се определя според дължината на съответния фрагмент.

Резултатите се отчитаха след интерпретация на три контроли:

1. контрола за амплификация, която показва успеваемостта на PCR реакцията;

2. контрола за хибридизация която показва успеваемостта на хибридизацията

3. контрола за положителен резултат, която показва, че се налага интерпретация на позитивиралите HPV типове в пробата.

При положителен резултат, пробата се обработва със специфична камера за детекция, посредством специфичен софтуер, който отчита точно кои типове са позитивни в дадената проба.

4.2.5. Статистически методи

Статистическата обработка беше извършена с пакета SPSS / PC+ за Windows, като избраното ниво на значимост за проверката на статистическите хипотези се прие да бъде при (p) равно или по- малко от 0,05.

Използвани бяха следните методи :

А. Описателни методи и методи за оценка

- Вариационен анализ на количествени променливи – средна стойност, стандартно отклонение, минимум, максимум
- Честотен анализ на качествени променливи (номинални и рангови), които включват абсолютни честоти, относителни честоти (в проценти), кумулативни относителни честоти (в проценти)

Б. Описателна статистика:

- Едномерно честотно разпределение за категорийни и количествени променливи;

- Двумерно честотно разпределение за категорийни променливи;
- Изчисляване на статистически характеристики за описание на количествените променливи:
    - Централна тенденция: Средна аритметина стойност, Медиана и Мода;
    - Разсейване: Стандартно отклонение и Стандартна грешка на средната аритметична стойност.

В. Графичен анализ:

- Стълбовидни диаграми;
- Кръгови диаграми;
- Хистограми.

Г. Статистически методи за проверка на хипотези:

- Тест на Колмогоров-Смирнов – изследване на нормалност на разпределението при количествени променливи; използван само за възрасттта
- X^2 тест и разновидностите му (формула на Пирсън, Линеен коефициент или Екзактен метод на Фишер) в зависимост от вида на двумерните честотни таблици за изследване на зависимости между категориини променливи;
- Непараметричен Тест на Уилкоксън за за изследване на взаимодействия между количествени и категорийни зависими променливи; преди и след бременност HPV
- Непараметрични Тестове на Ман-Уитни и Крускал-Уолис за изследване на взаимодействия между количествени и категорийни независими променливи.

5. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

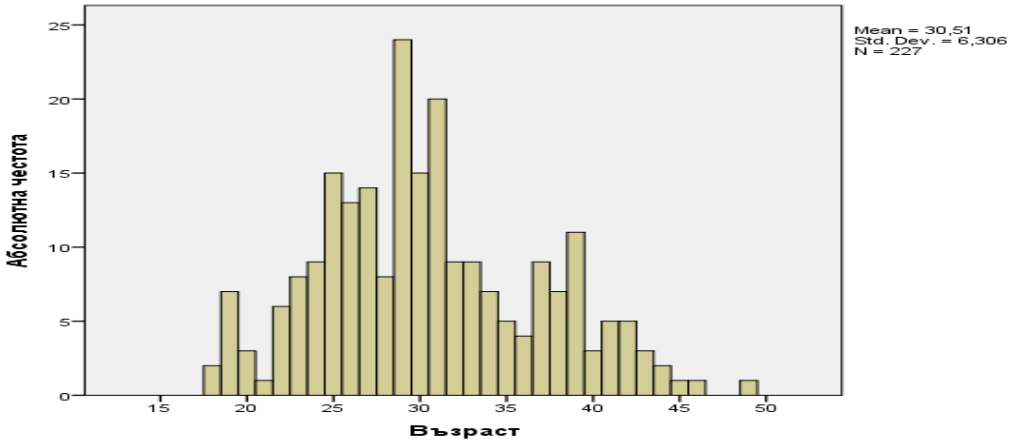
5.1. ЗДРАВНО СЪСТОЯНИЕ НА ПРОУЧЕНАТА ГРУПА ОТ БРЕМЕННИ ПАЦИЕНТКИ

В обзорната част на настоящата работа обърнахме внимание върху ролята на HPV инфекция и различните предразполагащи фактори, имащи отношение към канцерогенезата на маточната шийка и възможни усложнения по време на бременността, включително и раждането.

С оглед правилната интерпретация на резултатите получени в нашите специализирани изследвания, си поставихме за задача на базата на някои анамнестични, клинични и лабораторни данни да определим здравното състояние на проучваната група от пациентки.

5.1.1. Анамнестични и клинични данни

Обхванат е контингент от 227 жени между 18 и 49 години, със средна възраст 30,51 години при стандартно отклонение 6.306 (Фигура 5).



Фиг. № 5. Разпределение по възраст на изследваната група бременни.

На таблица 1 може да се види разпределението по възрастовите групи.

Таблица. 1

Разпределение на пациентките по възрастови групи

Възрастови периоди	Брой	%
под 20 години	9	3,95
20-29 години	101	44,5
30-39 години	96	42,3
над 40 години	21	9,25
Общо	227	100

Най- много изследвани бременни са във възрастовата група между 20-39 години (86,8%), което е в съответствие с данните на Националния статистически институт (НСИ) касаещи раждаемостта в страната.

Срокът на бременността, в които бременните жени бяха включени в нашето изследване е показан на таблица 2.

Таблица 2

Разпределение на пациентките според срока на бременността (по ултразвук)

Срок (г.с.)	Брой (N=)	Процент (%)
под 12	200	88.2
12-20	26	11.4
21-26	1	0.44
27-32	0	0
33-38	0	0
над 38	0	0
Общо	227	100

Преобладават жените в първата половина на бременността (99,6%), което е свързано с ранното им обхващане съгласно доболничната програма на НЗОК за майчино здравеопазване.

Важен рисков фактор за изява на HPV инфекция и предраковите изменения на маточната шийка е **броя на прекараните бременности,** като рисков фактор е посочено в литературата, че засяга жените имали повече от 5 бременности.

Таблица 3

Разпределение на жените по броя на бременностите

Поредност на бременността	**Брой аборти**	**Общо бременности**	**Брой изследвани бременни**	
1-ва	0	1	N= 125	55.0%
1-ва	1	2	N= 17	7.50%
2-ра	0	2	N= 57	25.0%0
2-ра	1	3	N= 15	6.70%
2-ра	2	4	N= 2	0.90%
3- та	0	3	N= 11	4.90%
Общо			**N= 227**	**100.0%**

Тяхното разпределение е показано на таблица №. 3 При 125 от изследваните жени (55.0%) , това е първа бременност, при 74 (32.6%) втора и само за 28 жени (12.4) това е трета или следваща бременност.

Прави впечатление, че съобразно трайните социални и урбанистични в нашето съвремие повечето са пациентки са с едно или две раждания 95.2%, което ги определя като ниско рискови. И тук данните не се различават от демографските данни от тези на НСИ.

В групата на жените, за които това е втора бременност (74 броя) 17 споделят за един предшестващ аборт (7.5%), а в групата на жените с три бременности, от които една настояща (28 броя) 3 са имали и предшестващ аборт (10.7%).

Тази **честотата на регистрираните предшестващи аборти** отговаря на съвремените тенденции вследствие на социално-икономическата и демографска криза.

Изтъква се възможността за връзка на неоплазията с половата активност и ползването на антиконцепция. С оглед на това е проведена анкета по тези проблеми, която показа голямо разнообразие на използваните средства, което ни накара да се въздържим от интерпретацията на резултатите.

Интерес за нас представляваше и информацията за прекараните от пациентката терапевтични въздействия върху маточната шийка, където едва 12 пациентки (5.2%) съобщават за осъществена предходна физикална деструкция.

Тютюнопушенето е друг важен фактор свързан с понижаване на локалния имунитет, поради преобладаващата екскреция на цианидите чрез цервикалната слуз.

В нашето проучване трайни навици свързани с пушенето преди и по-време на бременността (повече от 10 цигари дневно) споделят 43 жени от 227 или 18.9% изследваните бременни (Табл. 4.)

Таблица № 4

Разпределение на пушачите в отделните възрастови групи

Възрастови периоди	Брой пушачки	%	Брой непушачки	%	Общо
под 20 години	1	11.11	8	88.89	9
м/у 20-29 години	23	22.77	78	77.23	101
м/у 30-39 години	16	16.67	80	83.33	96
над 40 години	3	14.29	18	85.71	21
Общо	43	18.94	184	81.06	227

5.1.2. Лабораторни данни

С оглед на по пълното обективизиране здравното състояние на всички обхванати в проучването пациентки бяха изследвани минимума от лабораторни показатели включващи основни показатели на хемограмата, биохимията и урината като част от програмата „Майчино здравеопазване“: Липсата на отклонения в референтните стойности на тези показатели ни позволи по сигурно да изключим наличието на придружаващи остри или хронични състояния, които биха компрометирали изпълнението на поставените цели и задачи (Табл. 5).

Таблица № 5

Резултати от средните стойности и стандартните отклонения на изследваните лабораторни показатели

Лабораторни показатели	**Изследвани бременни жени**	
	(Средна стойност)	(± SD)
хемограма		
хемоглобин	116	8.173
хематокрит	0,43	0,987
левкоцити	9,04	1,678
СУЕ/ CRP	22.30	8.449
Тромбоцити	268.05	56.60
Биохимия		
кръвна захар	4,59	0,591

Изводи:

- *Независимо дали са налице различия в анамнестичните, клиничните и лабораторните резултати в проучената от нас група пациентки, всички отклонения включително и в случаите, при които са налице различни рискови фактори се движеха в границите на нормата за съответния показател.*
- *Това ни даде основание да приемем, че се касае за клинично здрави жени, при които надеждно сме обективизирали, дори физиологичните тенденции и промени и по този начин сме гарантирали отсъствието на друга патология, която да опорочи анализа на съществения диагностичен комплекс.*

5.2. ЦИТОЛОГИЧНИ КОЛПОСКОПСКИ И ХИСТОЛОГИЧНИ НАХОДКИ НА МАТОЧНАТА ШИЙКА ПО ВРЕМЕ НА БРЕМЕННОСТТА

5.2.1 Цитологични находки

Бременните жени са чувствителни и често резистират при провеждане на различни изследвания. Затова безопасността и лесната приложимост на всеки диагностичен метод е важна предпоставка той да бъде използван в рутинната практика.

Цитологичното изследване (Pap теста) се използва, както за скрининг, така за диагностика на различните болестни процеси на маточната шийка. По време на бременност, той е най-слабо инвазивно изследване на маточната шийка при който се взима клетъчен материал за морфологична оценка.

Една от характерните особености на на PAP теста е свързана с неговата диагностичната точност. В някои случаи тя може да бъде компрометирана по време на бременността, както поради технически трудности при вземането на пробата, така и заради физиологичните промени на цервикалните клетки настъпили под влиянието на хормоните. В частност се наблюдава изобилие на дегенерирали клетки от децидуа, които морфологично приличат на клетки суспектни за клетъчен атипизъм. Посочва се, че разликата помежду им е основно по отношение на техния увеличен клетъчен размер /77/. Независимо от тези ограничения, цитологичното изследване заедно с колпоскопията се счита за най- успешната програма за превенция.

Една от задачите на настоящата работа е с помощта на цитологичния Pap тест да определим здравния статус на маточната шийка на изследваната група жени по време и след бременността.

Резултатите са показани на таблица 6.

Цитологичните находките при бременните бяха разделени в 6 клинични групи, както е описано в глава „Материали и методи”, като цитонамазка беше провеждана по време на бременността и след нейното приключване.

Таблица № 6

Резултати от проведения Pap тест на изследваната група жени по време и след бременността.

Находка	През бременността №227	Относителен дял (%)	След раждане № 227	Относителен дял (%)
PAP I	57	25,1 %	17	7,5
PAP II	160	70,5 %	165	72,7
PAP IIIA	**10**	**4,4 %**	40	**17,6**
PAP IIIB	**0**	**0**	5	**2.2**
PAP IV	**0**			
PAP V	**o**			
Общо	227	100,0	227	100

При повечето от тях бяха установени нормални находки, както по време на бременността – Pap I (25.1%) и Pap II 70.5%), така и след раждане, съответно - 7.5% и 72.7%. (таблица № 6).

От друга страна е налице утежняване на цитологичната находка след приключване на бременността, като дискариотичните находки (Pap IIIA и Pap III B са нарастнали от 4.4 до 19.8% (таблица № 6).

Данните за броя на бременните с цитологична находка на PAP I и PAP II, както и тези с PAP IIIA и PAP III B, бяха обработени статистически спрямо данните за пациентките след приключване на бременността. Установена бе статистически значима значима разлика по отношение на повишение броя на патологични находки след приключване на бременността - $P< 0.0001$.

Допълнително беше анализирана динамиката на цитологичната находка установена по време на бременността и тази след раждане спрямо начина на родоразрешение, което е показано на (таблица № 7).

Таблица № 7

Сравнение на данните от цитологичната находка по време на бременността и след раждане спрямо начина на родоразрешение.

Начин на родоразрешение	SC N= 61	PN N= 162
Утежняване на цитологичната находка	15 (24%)	24 (14.8%)
Регресия на цитологичната находка	2 (3.3%)	2 (1.2%)

В проучваната от нас група беше наблюдавана значително по-голяма честота на утежняване на цитологичната находка преди и след приключване на бременността сред групата на жените родили със секцио (24%) спрямо групата на родилите per vias 14.8%.

Допълнително (Табл. 8), проучихме връзката между тежестта на цитологичните находки по време и след приключване на бременността в зависимост пристрастеността към тютюнопушене - един от предразполагащите фактори към изява на цервикалната HPV инфекция.

Таблица № 8

Сравнение на данните от цитологичната находка по време на бременността и след раждане според тютюнопушене.

Тютюнопушене	Непушачки N= 184	Пушачки N= 43
Нормална цитологичната находка	167 (90.8%)	17 (39.5%)
Утежняване на цитологичната находка	15 (8.2%)	26 (60.5%)
Регресия на цитологичната находка	2 (1.0%)	0 (0%)

В изследваната от нас група на бременни жени 184 не са пушачки, а 43 съобщават за тютюнопушене. Резултатите показват, че само при две жени от групата на непушачките се наблюдава регресия на находките от цитологичното изследване. Същевременна е налице статистически значимо утежняване на цитологичния статус на цервикса в групата на пушачките ($P< 0.0001$).

При разглеждане на разпределението на промените в цитологичната находка само в групата на пушачките спрямо начина на раждане с цел да прецени тежестта на тютюнопушенето като допълнителен предразполагащ фактор, нашето изследване не установи статистически значима разлика, което показва, че двата фактора не действат синхронно в посока утежняване на цитологичната находка..

Обсъждане

Рутинният цитологичен скрининг на бременните открива патологични промени в порядъка от 0,35 до 1,6 % в намазките на изследваните пациентки. Златков-дис /112, 130, 163/ Към този сравнително нисък процент трябва да се отнасяме много внимателно, тъй като често различните степени на дискариоза могат да аграват или да се съчетават с белезите за HPV-

инфекция, а честотата на тези промени може да стигне и до 10 % от всички цитонамазки. Златков-дис /98,119/

През последните години тенденцията жените да реализират първата си бременност в по- късна възраст се свързва и с по-честа анормална цитологична находка, особено в началото на бременността. Повечето автори посочват, че тези находки най-често регресират след края на бременността /89. 101/.

От друга страна в дисертационния труд на В. Златков /175/ тази тенденция не се установява при изследваната популация от български жени с начална бременност. Като възможна причина за тази разлика авторът посочва спецификите на подбраната група и краткия период между първичния и контролния преглед.

В нашите резултати се наблюдава съвсем противоположна тенденция, за нарастване честотата на патологичните находки след приключване на бременността. Обяснение за това може да се търси с наличието на HPV инфекция в изследваната група. Посочва се, че при сравняване на HPV и CIN измененията, папиломната инфекция се характеризира най-често със зрели плоски клетки, показващи амфофилна цитоплазма, докато клетките при CIN са предимно незрели с оскъдна цианофилна цитоплазма, което създава трудности в диференциално диагностичен план.

Според Dodin-Dewailly et al. /176/ позитивната предиктивна стойност на цитологичното изследване да открива папиломните лезии е относително по-слаба от тази при разпознаването на дискариотичните изменения. Това се дължи от една страна на факта, че не винаги експресията на вируса засяга отделната клетка, от друга - поразените от вируса клетки може да не са попаднали в дадената намазка. Същевременно оцветяването с хемалаум-еозин е с по-слаби възможности от оригиналното оцветяване по Papanicolaou,

даващо възможност за по доброто идентифициране на дискератоцитите и кондиломатозните парабазални клетки.

Подобна взаимовръзка се установява и от други автори, които подчертават, че по-тежките цитологични промени са на фона на инфекция с високо-рискови HPV типове / 172/.

Резултатите от нашето проучване показва, че е налице утежняване на цитологичната находка преди и след приключване на бременността сред групата на жените родили със секцио (24%) спрямо групата на родилите per vias 14.8%. Тези данни съвпадат с резултатите на SM Chung и сътр./52/, които намират статистически значима разлика в посока намаляване тежестта на цитологичните изменения при бременни с раждания протекли по нормален механизъм спрямо тези със цезарево сечение. с динамиката на наши резултати.

Тази интересна асоциация между начина на родоразрешение и тежестта на цитологичните находки те свързват с възможността за провокиране на възпалителни промени в цервикса вследствие на подценяваната травмата от механичната дилатация на маточната шийка в случаите с неподготвени родови пътища, в сравнение с бременностите завършили с вагинално раждане. Като допълнителен механизъм авторите коментират и засиления репаративен имунологичен отговор след раждането по нормален механизъм водещо до по- бърза цитологична регресия. Посочва се, че оптималния срок на поспарталната колпоскопска оценка е от 8-12 седмици след вагинално раждане когато повечето от репарационните механизми са приключили / 24., 148, 155, 52/.

Изводи

- *Налице е статистически значима разлика, която показва промяна тежестта на цитологичните находки след приключване на бременността, като те са основно за сметка на нискостепенните изменения.*
- *Установена е статистически значима разлика в посока утежняване тежестта на цитологичните изменения по време и след приключване на бременността при жени родили по абдоминален път спрямо тези родразрешени по нормален механизъм, както и на пушачки сравнени с тези бременни, които непушат.*
- *В тази връзка анализът на получените резултати поставят въпроса, доколко жените родили чрез цезарово сечение и злоупотребяващи с никотин представляват рискова група и изискват по-нататъшно активно проследяване.*

5.2.2 Колпоскопски находки

Съществува универсален консенсус, за ролята на вторичната профилактика. Системното провеждане на скринингови програми при жените намалява риска от заболяване и смъртността от рак на маточната шийка. Естествено, това не се дължи само на откриването, но и на последващото отстраняване на откритите преракови цервикални изменения. Няма скринингови програми които откриват точно и само жените с преканцерозни лезии. При всички модерни скринингови стратегии съществуват фалшиво положителни и фалшиво отрицателни резултати.

Колпоскопското изследване е неизменна част от протокола на предраковия скрининг на маточната шийка /90/. То позволява да селекционират тези пациентки, които се нуждаят от лечение, и да уточни начина на лечение.

На пациентките, насочени за колпоскопия, трябва да се спести страхът и стресът, свързани с това изследване. Те трябва да бъде добре информирани преди, по време и след колпоскопското изследване. По този начин при жените с CIN се намалява психосоциалният морбидитет.

Пълното колпоскопско изследване включва наблюдение върху оргиналния плосък епител, върху цялата зона на трансформация, върху границата между плосък и цилиндричен епител (ГПЦЕ) и колкото се може повече върху ендоцервикалния епиел. Най-важната процедура е уточняването на ГПЦЕ. Когато тя е изцяло видима и се вижда цялата лезия, колпоскопското изследвание се смята за адекватно.

Колпоскопията е напълно безопасна процедура, която може да бъде извършена на всяка жена по време на бременността независимо от гестационния срок. В популацията на бременните жени, това изследване се препоръчва основно, като референт на патологичните резултати при цитологичния скрининг /61, 65, 89, 101, 114, 122, 123, 159 , 32/ показват високата му чувствителност за откриване на раков процес и даже в случаите след няколко поредни негативни цитологични находки. В тази връзка скрининговото използване на колпоскопията, представлява интерес за ежедневната гинекологична практика.

Нашето проучване включваше колпоскопско изследване на всичките 227 бременни. При 219 от тях колпоскопската находка по време на бременност не показа отклонения, а при 8 беше определена като анормална таблица №. 9.

Таблица № 9

Колпоскопски находки в изследваната група жени по време на бременността и след раждане

Находка	По време на бременност N =227	След раждане % N =227
Нормална	219 (96.5%)	**194 (85.4)**
Анормална	8 (3.5%)	**33 (14.6)**
Общо	100 %	100 %

Контролният колпоскопски преглед след приключване на бременността (таблица № 9) показа, че има увеличение на тежестта на анормалните находки от 3.5% на 14.6%, като такава е намерена при 33 от проследяваните жени при повторни прегледи след раждане е за сметка на възпалителните, HPV и нискостепенните CIN изменения. И тук, както и при цитологичните изследвания се наблюдава статистически значима разлика по отношение на повишение броя на патологични находки след приключване на бременността - P< 0.0001.

За да се направи по-обстойна оценка, кои допълнителни фактори имат отношение към промените на цервикалния епител, беше потърсена връзка между колпоскопските находки и начина на родоразрешение и тютюнопушенето (таблици 10 и 11).

Таблица № 10.

Сравнение на данните от колпоскопската находка по време на бременността и след раждане спрямо начина на родоразрешение.

Начин на родоразрешение	SC N= 61	PN N= 162
Нормална колпоскопска находка към анормална	6 (9.8%)	18 (11.1%)
Анормална колпоскопска находка към нормална	1 (1.6%)	2 (1.2%)

В проучваната от нас група не се наблюдава тенденция за значими промени в колпоскопската находка в зависимост от начина на родоразрешение.

Допълнително (табл. 11), проучихме връзката между колпоскопските находки по време и след приключване на бременността в зависимост пристрастеността към тютюнопушене - един от предразполагащите фактори към изява на цервикалната HPV инфекция.

Таблица № 11.
Сравнение на данните от цитологичната находка по време на бременността и след раждане според тютюнопушене.

Тютюнопушене	Непушачки N= 181	Пушачки N= 40
Нормална колпоскопска находка	171 (94.4%)	19 (47.5%)
Нормална колпоскопска находка към анормална	8 (4.4%)	21 (52.5%)
Анормална колпоскопска находка към нормална	3 (1.6%)	0 (0%)

Резултатите показват, че само при три жени от групата на непушачките се наблюдава промяна на колпоскопската находка от анормална по време на бременността към нормална след раждане. Същевременно е налице статистически значимо по- често неблагоприятна колпоскопска находка на в групата на пушачките ($P< 0.0001$).

Обсъждане

Оценката на колпоскопската находка дава възможност за навременна интервенция или терапия особенно в ранните срокове на бременността. Според Baldauf и съавтори /33/ по отношение ва крайната хистологична диагноза колпоскопията по време на бременност дава правилна оценка за състоянието на цервикса в 72.6% от случаите, хипердиагностициране в 17.6%

и фалшиво отрицателни находки в 9.8% от случаите. Така имайки предвид, че целта на колпоскопските изследвания е да изключи наличието на инвазивни карциноми на маточната шийка те могат да се приемат за достатъчно точни и възпроизводими /65/.

За да се извърши качествена колпоскопска оценка на маточната шийка, се изисква добра видимост на ГПЦЕ. Според Ostergard /123,124/ - при бременните жени ендоцервикалната локализация на тази граница е в 58 %, и нейната честота не се различава съществено от тази на небременните. Въпреки това хипертрофията на маточната шийка, зейването на цервикалния канал и паритета на жената позволяват сравнително лесно нейната визуализация от опитен колпоскопист. /65, 123, 124/.

Колпоскопската находка пряко корелира с цитологичната находка и в контекста на наблюдаваните тенденции в настоящето проучване може да се отбележи, че по време на бременността са регистрани значително по-малко абнормни находки (3.5%) спрямо тези след приключване на бременността (14.6%). По време на бременност се засилват процесите на епидермизация, водещи до интерпретирането на нормалната ЗТ като атипична или на просто атипичния епител като засилен атипичен епител /115/. Тези данни са в посока съобщаваната от Nahhas et al. /115/ прогрес в динамиката на HPV-измененията по време на бременност при 73 пациентки, при които липсва съществена регресия в находките след раждане, като повечето от тях запазват наблюдаваните находки и 4 месеца след приключването на бременността.

В тази връзка може да се допусне, че едни и същи фактори стоят в основата на негативните промени на цитологичните и колпоскопски находки по време и след приключване на бременността. Като такива следва да се посочат статуса по отношение на HPV инфекцията, тютюнопошене, начин на родоразрешение, промискуитет и др.

Във комбинация със цитологията и хистологичното изследвание, колпоскопията е ключов фактор, диагнозата и лечението на цервикалните лезии. Диагностичната стойност на колпоскопията зависи от това дали изследването е адекватно или не, но окончателното колкпоскопско изследване е в състояние да уточни 4 различни находки: нормални находки; доброкачествени промени; промени изискващи хистологично уточняване и суспектни лезии, изискващи потвърждаване или изключване на инвазивни лезии.

Изводи

- *Има статистически значима разлика по отношение на анормалните колпоскопски находки по време на бременността и такива след раждане, като се отбелязва увеличение на честотата им в проучваната група е за сметка на възпалителните, HPV и нискостепенните CIN изменения.*
- *Неблагоприятните промени в колпоскопските находки са по- чести при жените, които пушат в сравнение с непушачките, което прави препоръчително тази тенденция да бъде коментирана с оглед ограничаване на рисковите им навици.*

5.2.3. Хистологични находки

Вторичната профилактика на рак на маточната шийка, предполага използването на различни диагностични скрининг методи, за своевременно откриване на предраковите и ранните ракови изменения преди клиничната появата на самото заболяване. Значимостта на тази предклинична диагноза се състои във възможността за своевременно откриване и последващо пълно

излекуване при запазване фертилните възможности на жената или прилагане на т.нар. „консервативна“ радикалност.

С оглед на поставените цел и задачи на изследването бе направена оценка на получените резултати, в зависимост от хистологичната находка.

В изследваната от нас група жени по време на бременността и след раждане само 9 пациентки бяха индицирани за провеждане на хистологично изследване.

При 3 от тях след раждането, на основание получените резултати се проведе деструктивно лечение чрез лазерна вапоризация на наличните изменения (табл. 12).

Установените от нас изменения бяха нискостепенни, както при първичния така и при контролния преглед след бременността. На тази база при задоволителна колпоскопска находка (видима граница плосък/цилиндричен епител и видима изцяло лезия) извършихме тъканна деструкция чрез лазерна вапоризация на установените изменения. Последващото наблюдение на тези жени показа комплетна санация и нормализиране на резултатите от цитологичното и колпоскопско изследване.

Табл. № 12

Пациентки при които е проведена Lazzer-коагулация

Находки	**През бременността**	**След раждане**
Случай 1. Пациентка 34 години		
Хистология	Дисплазия I-II ст.	Дисплазия II ст.
Цитология	PAP II –гр.	PAP III а –гр-
Колпоскопия	ЗТ	АЗТ
Случай 2. Пациентка 41 години		
Хистология	Койлоцитна дисплазия	Койлоцитна дисплазия
Цитология	PAP II –гр.	PAP III а –гр-
Колпоскопия	ЗТ	АЗТ

Случай 3. Пациентка 22 години		
Хистология	Нормална	Папилома коли утери
Цитология	PAP II –гр.	PAP III a –гр-
Колпоскопия	ЗТ	АЗТ

По време на проучването се наложи да се извърши разширена биопсия под формата на бримкова ексцизия (LEEP/LLETZ –техника) или хирургическа конизация при 6 жени. Индикациите и резултатите от проведените изследвания по време и след приключване на бременността са показани на табл. 13:

Прави впечатление, че при всичките 6 случая се наблюдава утежняване на диагностичните находки след раждане, което е основание за извършване на посочената диагностично/терапевтична процедура. Това съвпада с нашите данни за по-тежки цитологични и колпоскопски находки при общата група пациентки. Същевременно, те съвпадат с данните от на В.Златков /175/, който в проведените биопсични изследвания установява утежняване на хистологичните находки при контролния преглед след прекъсване на бременността при пациентки с начална бременност .

Допълнително трябва да посочим, че всички пациентки с конизация на маточната шийка останаха на диспансерен учет и към момента на обобщаване на резултатите като при нито една от тях не се установиха усложнения или резидуална болест.

Табл. № 13

Пациентки при които е извършена широка биопсия (LEEP / Letzz техника и хирургическа конизация на маточната шийка)

Находки	През бременността	След раждане	Резултат от конизацията
Случай 1. Пациентка 18 години			
Хистология	Нормална	CIN III	CIN II
Цитология	PAP III a –гр	PAP III b –гр-	
Колпоскопия	ЗТ	АЗТ	
Случай 2. Пациентка 37 години			
Хистология	CIN II	CIN III	CIN III
Цитология	PAP III a –гр.	PAP III b –гр-	
Колпоскопия	АЗТ	АЗТ	
Случай 3. Пациентка 39 години			
Хистология	CIN II	CIN III	Карцином insitu
Цитология	PAP II –гр.	PAP IIIb –гр-	
Колпоскопия	АЗТ	АЗТ	
Случай 4. Пациентка 26 години			
Хистология	CIN I	CIN III	CIN III
Цитология	PAP III a –гр.	PAP III b –гр-	
Колпоскопия	ЗТ	АЗТ	
Случай 5. Пациентка 30 години			
Хистология	CIN I	CIN III	Хроничен цервицит
Цитология	PAP III a –гр.	PAP III b –гр-	
Колпоскопия	АЗТ	АЗТ	
Случай 6. Пациентка 28 години			
Хистология	Нормална	CIN III	CIN II
Цитология	PAP III a –гр.	PAP III b –гр-	
Колпоскопия	ЗТ	АЗТ	

Обсъждане.

Критерий за хистологична патология или т.нар. в литературата "златен стандарт" е честотата (разпространеността) на атипичните (HPV и CIN лезии), и патологичните (РМШ) епителни находки.

Тъканните промени на маточната шийка, срещащи се по време на бременност и след раждане, не са патогномонични състояния само за тях, но

се наблюдават по-често в този период от живота на жената, отколкото извън бременност. Те корелират със стимулиращото действие и нивото на репродуктивните хормони и се проявяват с различни общи и микроскопски изменения. /58/.

Хистологичните промени по време на бременност се проявяват основно в три насоки: децидуализация, микрогландуларна ендоцервикална хиперплазия и феномена на Arias-Stella.

Децидуализацията на стромата - локално или дифузно, се среща при една трета от изследваните пациентки и изчезва около 2 месеца след раждане или прекъсване на бременността. Измененията в маточната шийка обикновено са локални, и те могат да бъдат разположени в ендо-и ектоцервикса, като микроскопски - клетките са грубовато широки с бледи, кръгли ядра и проминиращи нуклеоли. /26,27, 128/

"Микрогландуларният" вид на ендоцервикална хиперплазия се дължи на вторичното жлезно образуване, вследствие влиянието на репродуктивните хормони. Между жлезните епителни елементи има клетки с характеристика на резервни, а понякога могат да бъдат разпознати и плоскоклетъчни, метапластични елементи. Това е много важно да се знае поради възможността да се сбърка с по-тежък тъканен атипизъм. В тези случаи липсата на неправилни ядра и митотични фигури са основните диференциално диагностични белези /26, 27/.

Макар и по-рядко, ендоцервикалните жлези могат да покажат особеностите на Arias-Stella промените. Характеризират се с едри хиперхромни ядра, на фона на леко повишена секреторна активност. Различаването от жлезната атипия е трудно, но наличието на изобилие от цитоплазма и липса на митотични фигури са опорната точка при отхвърлянето на малигнения процес /26, 27/.

Други особености на хистологичните находки по време на бременност се свързва с влиянието на HPV-инфекция. Тя предизвиква пролиферация на инфектираните клетки от базалния слой на многослойния епител с участието на субепителната строма, като времето за инкубацията е от 3 седмици до 8 месеца (средно 3 месеца). Съгласно критериите на Meisels, HPV-измененията се проявяват основно под три форми екзофитна (от 6,6 до 12,4%), плоска (от 69,0 до 78,9%) и инвертна/ендофитна (от 14,5 до 18,6%), в зависимост от локализацията и посоката на растеж. /12/.

Обръща се внимание на съчетанието на папиломните лезии с цервикалната интраепителна неоплазия, както и с възможността за многоогнищна изява на находките. В тази връзка се подчертава, че съществува голяма разлика в оценките на различните патолози при идентифициране на CIN лезиите от HPV-индуцираните промени. Важно е да се знае, че хистологичната находка при папиломната инфекция за разлика от различният по степен атипизъм при CIN, включва и следните морфологични елементи: папиломатоза, базално-клетъчна хиперплазия, акантоза, пара- и хиперкератоза, коилоцитоза, дискератоза и многоядреност /12, 81/.

Изводи:

- *В нашето проучване при сравнението на хистологичните находки по време на бременността и след раждането, контролният преглед показва тенденция за увеличаване тежестта на измененията при родилите.*
- *Малкият брой случаи не позволява да се направят значими изводи, въпреки това прави впечатление асоциацията на хистологичните промени с морфологични данни за HPV инфекция в случаите с нискостепенните находки завършили с деструктивна терапия.*

5.3. РЕЗУЛТАТИ ОТ HPV ТИПИЗАЦИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЖЕНИ И НОВОРОДЕНИ

Съгласно поставената цел и задачи ние проучихме HPV статус на изследваните 227 пациентки, преди и след приключване на бременността като освен разпространението на различните типове по време на бременността ние оценихме неговото влияние върху протичането на бременността и следродовия период.

Приложи се Geno Flow HPV Array test, използвайки комерсиален кит (DiagCor, Hon Kong, China) върху ДНК изолирана от цервикален клетъчен материал на сух памучен тампон или в течна среда. Типизацията чрез хибридизация се извърши за следните 33 типа: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 84. Същите в зависимост от онкологичния им потенциал бяха разделени в три групи – с нисък, среден и висок онкологичен риск. (вж. глава Материали и методи)

Разпространението на вирусната инфекция в групата на изследваните жени (табл. 14) показа, че HPV инфекция е установена при 87 (38.32%) жени по време на бременността, докато след приключването на бременността позитивна HPV типизация се запазва при 68 (29.95%) жени. Липсата на позитивна HPV типизация при 19 от жените не показва статистически значима разлика (P=0,07), но насочва към такава. Когато се вземе предвид и находката, че при още 23 бременни със смесена инфекция от ниско, средно и високо-рискови типове HPV, след приключване на бременността повторното изследване показва липса на някои от тях, можем да говорим за статистически значимо намаление на вирусната инфекция (P= 0.0001).. Това поставя отново въпроса за ролята на бременността, като важен фактор благоприятстващ развитието на инфекцията.

Таблица № 14

Разпространението на HPVs типове в групата на изследваните жени по време и след приключване на бременността.

№	Типове HPVs								
	През бременността				След раждане				
	Нисък риск	Среден риск	Висок риск	HPV - Асоциирани промени	Нисък риск	Среден риск	Висок риск	HPV - Асоциирани промени	PN/SC
1. СВ			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	SC
2. КК	**6**		**58**	Pap II	**6**		**58**	Pap II	PN
3. ЖЖ			**31**	Pap II			**31**	Pap III a	SC
4. БД			**33, 56**	Pap III a			**33, 56**	Pap III в	PN
5. ТВ			**52, 56**	Pap II			**56**	Pap II	SC
6. ТК			**45**	Pap II			**-**	Pap I	SC
7. БТ			**18, 56**	Pap II			**18, 56**	Pap III a	PN
8. ВГ			**16, 59**	Pap II			**16, 59**	Pap III a	PN1
9. ВН			**58**	Pap II			**-**	Pap II	PN
10. БК			**16**	Pap III a			**16**	Pap III в	SC
11. КС			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	PN
12. КП	**6**			Pap II	**6**			Pap II; кондиломи-ВПО	SC
13. ГГ			**52**	Pap II			**52**	Pap III a	PN
14. РТ	**6**			Pap I				Pap II	PN
15. ДД	**72**	**53**	**45, 66, 68**	Pap II	**-**	**-**	**45,68**	Pap II	PN
16. МК		**53**		Pap II		**-**		Pap II	SC
17. АЗ			**16**	Pap II			**16**	Pap III в	SC
18. ВК			**18,58**	Pap II			**18,58**	Pap III a	PN
19. ЕН			**45**	Pap II			**-**	Pap II	PN
20. ББ			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	PN
21. МА	**6**			Pap I	**6**			Pap II кондиломи-ВПО	SC
22. ДГ	**6**			Pap I	**-**			Pap II	PN
23. ЦВ			**66, 68**	Pap II			**66**	Pap II	PN
24. АБ			**16**	Pap III a			**16**	Pap III b,	PN
25. СС		**53**		Pap III a		**53**		Pap II	PN
26. НК	**6**			Pap I	**-**			Pap I	PN
27. КИ	**6**			Pap II	**6**			Pap II	SC
28. АГ		**53**		Pap I		**-**		Pap II	PN
29. ТК			**16, 31**	Pap II			**16, 31**	Pap III a	PN
30. ПЗ	**6, 42**		**33**	Pap II	**6**		**33**	Pap III a	SC
31. ЕС	**56**	**53**	**40, 61**	Pap I	**56**	**-**	**40**	Pap III a	SC
32. ВП	**11, 70**		**31, 52**	Pap I	**11**		**31**	Pap III a кондиломи-ВПО	SC
33. НЦ	**11, 42**	**53**	**31, 45**	Pap II	**11, 42**	**53**	**31, 45**	Pap II	PN
34. СГ	**11**		**31**	Pap II	**11**		**31**	Pap III a	SC
35. ДЦ			**66, 68**	Pap II			**66**	Pap II	SC
36. ЕТ	**6, 84, 26**			Pap II	**6**			Pap II	SC
37. СД			**35**	Pap II			**-**	Pap II	PN
38. ЖК			**52**	Pap II			**52**	Pap III a	SC
39. РР	**42**		**16, 56**	Pap II	**-**		**16, 56**	Pap III a	PN
40. ХБ			**18**	Pap II			**18**	Pap III a	PN

41. ВЙ	**43,44, 84,26**	**53**	**56,66,68**	Pap II	**-**	**53**	**56, 66,**	Pap III a	PN
42. ЮС	**6**			Pap II	**-**			Pap II	SC
43. РИ	**57, 71**			Pap II	**71**			Pap II	SC
44. ТС	**42**		**18, 45**	Pap II	**-**		**18**	Pap III a	PN
45. АА			**52, 56**	Pap II			**52, 56**	Pap II	PN
46. ВП	**70**		**31, 52**	Pap II	**-**		**31**	Pap III a	PN
47. АЗ	**42**			Pap II	**-**			Pap II	SC
48. АС		**82**		Pap II		**-**		Pap I	PN
49. ВС		**53**	**45**	Pap II		**53**	**45**	Pap III a	PN
50. МГ		**82**	**56**	Pap III a		**-**	**56**	Pap II	SC
51. СК			**45**	Pap I			**45**	Pap II	PN
52. МЖ		**53**		Pap II		**-**		Pap II	PN
53. ВГ	**11,40,81**		**16**	Pap II			**16**	Pap III a ППОМ в 36 г.с.	PN
54. ЛГ	**42, 43, 44**			Pap II	**43, 44**			Pap II	PN
55. МИ	**57, 71**		**16**	Pap II	**71**		16	Pap II	PN
56. АВ	**56**			Pap III a	**56**			Pap III в ППОМ в 35 г.с.	PN
57. ИД	**6**			Pap II	**6**			Pap II кондиломи - ВПО	SC
58. ИН			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	PN
59. МА	**43, 44, 54, 55**			Pap II	**44, 54**			Pap II	PN
60. ДК			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	PN
61. ПЙ		**81**	**59**	Pap II		**-**	**59**	Pap II	SC
62. НК	**84, 26**	**53, 82**	**51, 59**	Pap II	**84**	**53, 82**	**51, 59**	Pap II	PN
63. ДТ	**6, 42, 43**		**16**	Pap II	**6**		**16**	Pap III a ППОМ в 36 г.с.	PN
64. НТ	**6, 42, 43**		**16, 18**	Pap III a	**-**		**16, 18**	Pap III в	PN
65. ХЦ			**39**	Pap II				Pap II	PN
66. ХХ	**11**		**31,56**	Pap II			**31,56**	Pap III a ППОМ в 36 г.с.	PN
67. НД	**11**		**39**	Pap II	**-**		**39**	Pap II	SC
68. АД	**40, 66**			Pap II	**-**	**-**		Pap II	PN
69. ТВ	**70**	**53**		Pap II	**-**	**-**		Pap II	SC
70. ЕА	**40, 61**			Pap I	**-**			Pap II	PN
71. ММ	**11, 57**		**52**	Pap II	**11, 57**		**52**	Pap II ППОМ в 36 г.с.	SC
72. СН	**70, 54, 26**		**58**	Pap II	**54**		**58**	Pap II	PN
73. РЯ	**42**		**31, 45**	Pap III a	**42**		**31, 45**	Pap III a	PN
74. ЦН	**6**			Pap I	**6**			Pap II	PN
75. РР		**53**		Pap II				Pap II	PN
76. МЧ	**42**	**53**	**66, 68**	Pap II	**42**	**53**	**66, 68**	Pap II Abr.placentae 36г.с.	SC
77. ЕК			**52, 58**	Pap I			**52, 58**	Pap II	PN
78. МХ			**18, 45**	Pap II			**18, 45**	Pap III a	PN
79. МШ			**52**	Pap I			**52**	Pap II	PN
80. НК		**82**	**59**	Pap II		**82**	**59**	Pap II	PN
81. ЦГ			**66, 68**	Pap II			**66, 68**	Pap II ППОМ в 36 г.с.	PN
82. ТВ	**70**			Pap II	**-**			Pap II	PN
83. НК			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	PN
84. ДЗ	**11**		**33**	Pap II	**-**		**33**	Pap III a	PN
85. ЖГ	**11**			Pap II	**11**			Pap II кондиломи-ВПО	SC
86. МШ	**11**		**52**	Pap II	**11**		**52**	Pap III a	PN
87. НХ			**16**	Pap II			**16**	Pap III a	PN

Водещите молекулярно биологични техники са свързани с откриване на HPVs след ензимно умножаване на ДНК специфични фрагменти от вирусната НК. Това е в основата на т.нар. полимеразна верижна реакция (PCR) и нейните различни разновидности, като тази амплификация се постига чрез използване от една (PCR) до три (MPCR) двойки специфични олигонуклеотидни "зародиши" (праймери). Основният недостатък на тези методики е свързан с риска от фалшиво позитивни резултати. Посочва се, че масовият скрининг за HPV крие риск от свръхдиагноза и дисстрес сред позитивните пациентки особено при жените под 30 год. възраст, при които HPV инфекцията е по-честа и преходна (80% от случаите), а рака на маточната шийка е отн. рядък.

В тази връзка проучихме честотата на папиломната инфекция сред нашите бременни жени под и над 30 годишна възраст (Табл. 15).

Табл. № 15

Разпределение на HPV типовете по време на бременността в групата до и след 30 годишна възраст.

HPV инфекция по време на бременността		
Тип HPV инфекция	**До 30 години включително N=55**	**Над 30 години N= 32**
Високо рискови	22 (40%)	12 (37,5%)
Средно рискови	4 (7,3%)	2 (6,3%)
Ниско рискови	13 (23,6%)	5 (15,6%)
Висок + среден + нисък	4 (7,3%)	2 (6,3%)
Висок + среден	1 (1,8%)	3 (6,3%)
Висок + нисък	11 (20%)	7 (9,4%)
Среден + нисък	0	1 (3,1%)
ОБЩО високо и средно рискови	**42 (76,4%)**	**27 (84,4%)**
ОБЩО нисък риск	**13 (23,6%)**	**5 (15,6%)**

Анализът на данните показва, че ако се сравнят пациентките с високо- и среднорискови типове в двете групи, спрямо тези при които има само нискорискови типове, липсва статистически значима разлика ($p<0.4241$). Все пак се отчита, че в групата на пациентките под 30 години процентно високо и среднорисковите са по–малко, отколкото при пациентките над 30 години.

Друг факт, който трябва да се отбележи е, че няма статистически значима разлика, свързана с начина на раждане, и намаляването на честотата на вирусната инфекция ($P= 0.7863$). От общо 59 жени родили по нормален механизъм при 14 (23.73%) е установена липса на вирусна инфекция след раждането, а в групата на 28-те жени родили със секцио HPV след раждането не се установяват при 5 от тях (17.86%).

При родилите по нормален механизъм, това касае случаи с № 9, 14,19, 22, 26, 28, 37, 48, 52, 65, 68, 70, 75 и 82, където по време на бременността са регистрирани HPV типове от целия спектър – ниско рискови -6, 40, 61, 66 и 70; среднорискови-53 и 82 и високорискови – 35, 39, 45 и 58. При жените родили с цезарово сечение, петте случая са с № 6, 16, 42, 47 и 69. При тях се запазва, както широтата на спектъра, така и до известна степен и видовете диагностицирани HPV типове където по време на бременността са регистрирани – нискорискови - 6, 42 и 70; среднорисковия-52 и високорисковия - 45.

❖

Интерес за нас представляваше и наличието на различни клинични прояви, които могат да се свържат с ролята на HPV инфекцията и нейното влияние върху протичането на бременността и следродовия период.

Наличие на вулварни кондиломи (ВПО) се установи само при 5 жени (5.75%) в пуерпералния период, при три от тях (случаи № 12, 21 и 57) по време и след приключване на бременността се установиха предимно

нискорискови типове 6, а при 1 жена (№ 85) – 11 тип. При една родилка (№32), типовото разнообразие беше значително и освен нискостепенните 11 и 31, по време на бременността бяха установени и два високорискови типа – 70 и 52, които липсваха в послеродовия период.

❖

Пряката връзка на HPV инфекцията с промени в цитологичната находка, трудно може да бъде оценена, независимо че цитологичните промени асоцииращи се с HPVI– койлоцити, дискератоцити, кондиломатозни парабазални клетки и многоядреност, могат да се срещнат до 10% от находките /8/.

В нашето проучване, по време на бременността от 87-те жени положителни при извършената HPV типизация само при 8 (9.2%) се установиха асоциирани промени в цервикалната намазка и то, като нискорискови – III-A гр. по Pap. След приключване на бременността, жените с клетъчна дискариоза са общо 37 (42.5%), от тях – 31 с ниска степен – III-A гр. по Pap и 6 - с промени от висока степен– Pap III-B.

Прави впечатление, че при една съществена част от пациентките 36 от 87 на фона на налични, основно високорискови типове има неблагоприятна прогресия на цитологичния статус при 30 от I-ва и II-ра група към III-A (5 родили с цезарово сечение и 25 по нормален механизъм) и една до III-B (родила чрез цезарово сечение). При други 5 жени утежняването на цитологичната находка след раждане е от III-A до III-B, като в четири от тези случаи раждането е станало по вагинален път, а едно по абдоминален.

Неблагоприятната промяна на цитологичната находка при налична HPV инфекция след приключване на бременността показва статистически значима разлика, спрямо тази по време на бременността (P = 0.0001). Може да се

приеме, че бременността и вирусната инфекция взаимно допринасят за развитието на патологични промени на цервикалните клетки.

Само при две пациентки (случаи № 25 и 50) е регистрирана промяна в обратна посока, като при едната са регистрирани среднорискови типове, а при другата смесена инфекция с високорискови и среднорискови типове.

При друга една (случай № 73) контаминирана по време на бременността с типове 42 (нискорисков), 31 и 45 (високорискови) е налице запазване след раждането, както на нискостепените дискариотични промени (III а гр. Pap), така и вирусното носителство.

❖

Други клинични промени свързани с клиничен риск от носителството на папиломни вируси е възможността за латентна инфекция на амниона и от там по-висока честота на случаите с преждевременно пукнат околоплоден мехур (ППОМ).

В нашето проучване случаите с ППОМ (преди 37 г.с.) са 6 или 6.9% от всичките 87 бременни позитивни за различни HPV типове. В тази група, с изключение на случай № 56 при всички останали жени бяха регистрирани високорискови типове HPV (16, 31, 56, 66, 68) като при пет от тях инфекцията беше от смесен тип и съдържаше и нискорискови типове.

От петте от жени, които са родили по нормален механизъм, при три от тях е установена Pap III-A (№ 53, 63 и 66), при една – III-B (№ 56) и една е с нормална находка (Pap II). След цезарово сечение само една жена с ППОМ има лека дискариоза – III-A гр. Pap като при нея високорисковите типове HPV – 66 и 68 персистират преди и след раждане.

Само за пълнотата при оценка на изследването ще спомена, че при случай №76, завърши с преждевременно отплепване на плацентата в 36 г.с., но връзката с HPV инфекция би била спекулативна.

5.3.1.HPV вирусна инфекция по време на бременност - честота и разпределение по типове.

Разпространението на вирусната инфекция в групата на изследваните жени (табл. 16) показа, че по време на бременността HPV инфекция е била установена при 87 (38%) от всичките 227 бременни жени.

При 41 от тях самостоятелно, само с един тип, както следва: нискорискови - 13 (от тях 9 бр тип 6 и по един 11, 42, 56 и 70), със среден риск – 7 (тип 53 – 5 бр и тип 82 - 2 бр.) и 21 -с висок риск (10 бр. - 16 тип, по 3 бр. – 45 и 52 тип, и по 1 бр. от 18, 31, 35, 39 и 58 тип).

Асоциация от повече от два вирусни типа се намериха при останалите 46 бременни, засегнати от човешкия папиломен вирус, както следва: най-често е комбинацията от ниско и високорискови при 18 бременни, високорискови при – 12 жени, при 6 - асоциацията от трите типа (нисък, среден и висок риск), при други 6 бременни нискорискови, комбинацията среден и висок риск се срещна при 3 жени и при 1 нисък и среден риск.

Девет от бременните жени имаха 4 и повече типа, като впечатлява пациентка № 42 с 8 типа: 4 бр. - нискорискови (25, 43, 44 и 84), един среднорисков – 35 и три високорискови – 56, 66 и 68.

Таблица № 16

Честота на регистрираните HPVs типове при изследваните бременни жени съобразно онкологичната им значимост

По групи	Разпределение на HPV типовете в групата на 87 позитивни бременни жени	Процент
Високорискови типове	**62**	**71,3 %**
Среднорискови типове	**17**	**19,5 %**
Нискорискови типове	**44**	**50,6 %**

В групата на бременните при 62 от тях е установена вирусна инфекция от високорискорискови типове, среднорисковите типове са 17 и нискорискови при 44 (таблица 16). Общата бройка засегнати от вирусната инфекция според регистрираните типове надвишава 87, защото при някои бременни беше установена смесена инфекция с различни типове вируси.

По честота най-разпространени са:

- от нискорисковите: 6 тип -14 бр. (20,5%), 11 тип – 10 бр. (14,7%), 42 тип – 9 бр. (13,2%), 26,43 и 70 тип – 4 бр. (5,9%), 71, 84, 40, 57 и 44 тип – 3 бр. (2.9%), 54 и 56 по – 2 бр. (2,9%), 55,66,61,31, и 72 – 1 бр. (1,4%).
- от среднорисковите: 53 тип 13 бр. (72,2%), 82 тип 4 бр. (22,2 %) 81 тип – 1 бр. (5, 56%).
- от високорисковите типове са: 16 тип -17 бр. (19,3%), 52 тип -10 бр. (11,36%), 56 и 45 тип по 9 бр. (10,2%), 31 тип 8 бр. (9%), 18, 66 и 68 тип по 6 бр. (6,8%), 58 тип – 5 бр. (5,68%), 33 и 59 тип по 3 бр. (3,4%), 39 тип - 2 бр. (2,27%), 40, 61, 35 и 51 по 1 бр. (1,13%).

Вижда се, че преобладават високорисковите типове HPV, като при 14 пациентки инфекцията беше смесена и бяха установени и ниско рискови типове, а при 4 пациентки среднорискови. При шест от пациентките с HPV инфекция бяха установени и трите типа папилома вируси. Общо са описани 13 високорискови типове, което свидетелства за една много висока хетерогенност. Тя може да бъде обяснена с по- висок промискуитет и други рискови фактори опосредстващи вирусната инфекция като тютюнопушенето, което е характерно за българската популация. Най- често при бременните с

HPV инфекция се срещаше тип 16 (17 от 62 пациентки – 27%), следван от типове 52, 31 и 18.

Интересен факт е, че има характерни популационни различия в честотата на вирусните типове. Така например Sowjanya и съавтори /151/ представя данни за Индия, където освен тип 16 с висока честота се срещат типовете 18, 33, 35 и 45, които не са характерни за изследваната от нас извадка. За китайската популация най- често срещащите се типове след 16-ти са 52, 58 и 18 /97/. Много сходно на намереното от нас разпределение е описано при пациенти в Румъния /166/.

5.3.2.HPV вирусна инфекция в послеродовия период - честота и разпределение по типове.

В следродовия период положителен тест за HPV инфекция запазиха 71 от бременните жени (таблица 17). При 40 от тях самостоятелно, само по един тип, както следва: нискорискови – 11 бр. (от тях 7 бр тип 6, 3 бр. - тип 56 и 1 бр. тип 11), със среден риск – 3 бр. (тип 53 – 2 бр и тип 71 - 1 бр.) и 26 -с висок риск (11 бр. - 16 тип, по 3 бр. – 52 тип, по 2 бр. 18, 31, 39 и 66 тип и по 1 бр. 33, 45, 59 и 74 тип).

Смесена инфекция с повече от два HPV типа се намериха при останалите 31 родилки, както следва: най-честа е комбинацията от високорискови при – 13 жени и ниско с високорискови при 10 родилки. Комбинацията от трите типа (нисък, среден и висок риск) се срещна при 3 типа, а при други 3, вирусните типове бяха от среден и висок риск. Ниско рисковите типове се установиха само при 2 родилки.

Три от родилите жени имаха 4 и повече типа, както следва: № 33 с 5 типа: 4 бр. - нискорискови (11 и 42), един среднорисков – 53 и два високорискови – 31 и 45; № 62 – 5 типа, нискорисков – 84 тип, среднорискови - 53, 82 и високорискови – 51 и 59, и № 76 с 4 типа по един ниско (42) и среднорисков (53) и два високорискови (66, 68).

На таблица 17 е показана честотата на типовете HPV след раждане, по групи, в зависимост от онкологичния риск, като и тук броят на диагностицираните типове надхвърля броя на инфектираните жени.

Таблица №17

Честота на регистрираните HPVs типове при изследваните жени след приключване на бременността съобразно онкологичната им значимост

	Разпределение на HPV типовете в групата на 71 позитивни родилки	Процент
Високо рискови типове	57	65,5 %
Средно рискови типове	7	8,0 %
Ниско рискови типове	26	29,9 %

По честота най-разпространени типове са:

- от ниско рисковите: 6 тип -10 бр. (33,3%), 11 тип – 6 бр. (20,0%), 42 тип – 3 бр. (10,0%), 56,71, 44 и 54 тип – 2 бр. (6,66%), 43, 84 и 57 и 44 тип – 1 бр. (3.33%). HPV типове 26, 31, 40, 55, 61, 66, 70 и 72 – които бяха идентифицирани по време на бременността не са намерени при родилките при повторния тест.

- от средно рисковите: 53 тип 8 бр. (75,0%), 82 тип 4 бр. (25 %). HPV 81 тип не е установен при изследваните жени след раждане.
- от високорисковите типове са: 16 тип -17 бр. (22,3%), като намерените бройки са същите както и по време на бременността. HPV 31 тип 8 бр. (10,5%), 52 и 56 тип -7 бр. (9,2%), 18, 45 и 66 тип по 6 бр. (7,9%), 58 и 59 тип по 4 бр. (5,2%), 33 и 68 тип – 3 бр. (3,9%), 39 тип 2 бр. (2,6%), 39 тип - 2 бр. (2,3%), 40, 71 и 51 по 1 бр. (1,3%). Типове 61 и 35, които са установени при единични пациентки по време на бременността, не са намерени при същиге пациентки след раждане.

Прави впечатление понижението на честотата на вирусната инфекция, което се отнася и за трите типа – високо-, средно- и нискорискови. И след бременността преобладават високо рисковите типове HPV, като при 7 пациентки инфекцията беше смесена и бяха установени и ниско рискови типове, а при 4 пациентки средно рискови.

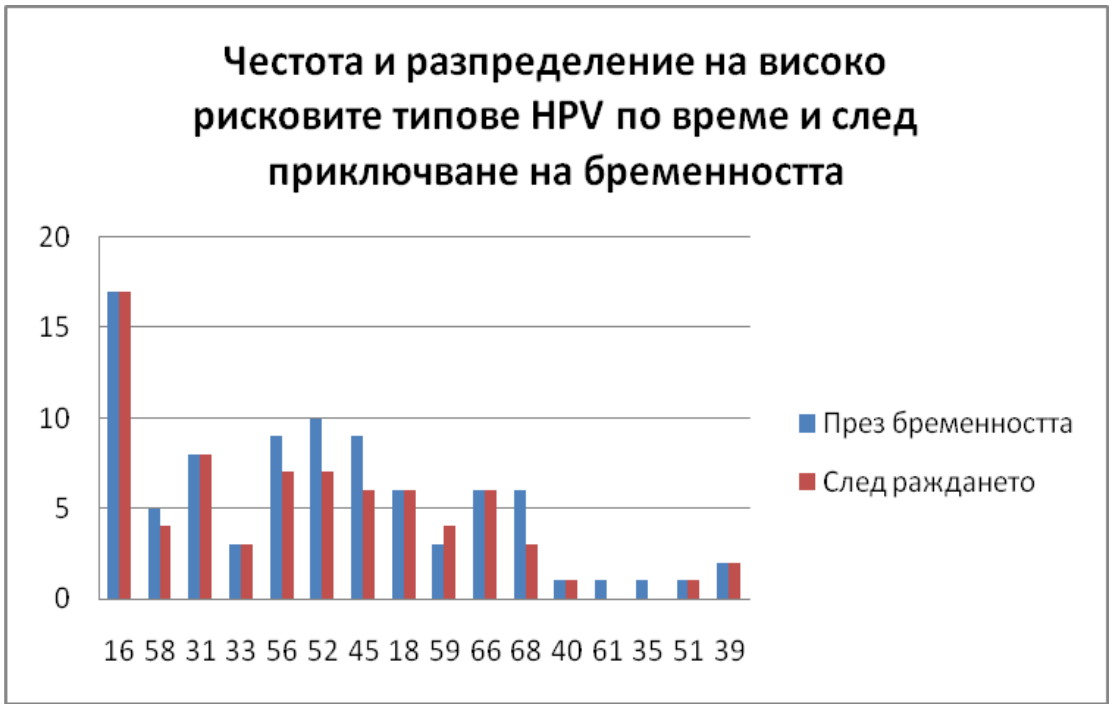
При три от пациентките с HPV инфекция бяха установени и от трите типа папилома вируси. При 19 жени, които са били диагностицирани с HPV инфекция по време на бременността, след раждане инфекция не е била установена. В тези случаи е логично е да се приеме, че понижение честотата на вирусната инфекция се дължи на приключване на бременността и промяната в хормоналния и имунен статус на жената.

❖

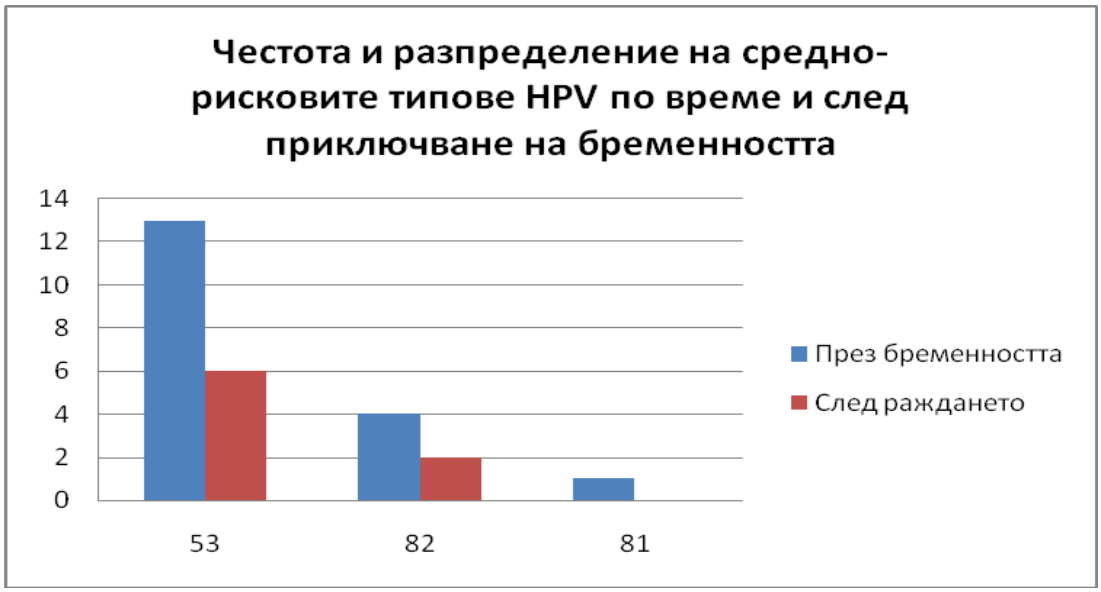
Обобщените данни от настоящето проучване представят една по висока честота на HPV вирусната инфекция по време на бременността, която е статистически значима (P< 0,005) сравнена с находката при същите жени след

приключване на бременността. Това касае всичките типове HPV регистрирани в изследваната група. Статистическите анализи са извършени с Wilcoxon Signed Ranks Test.

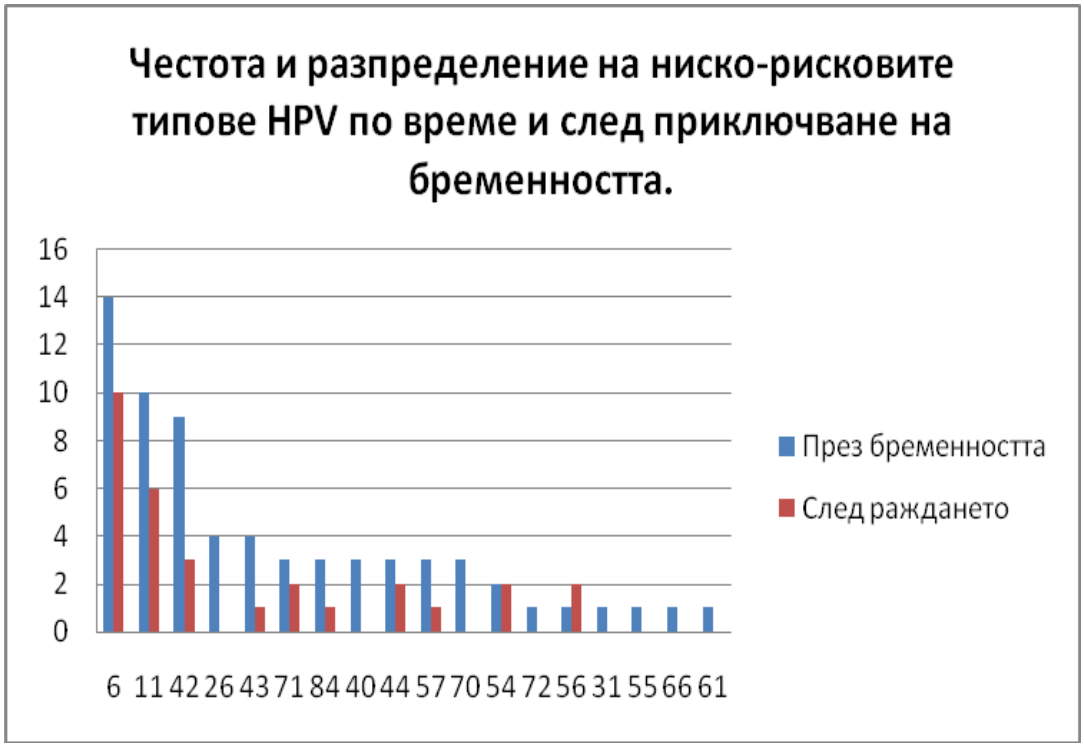
Тази разлика по отношение на отделните типове, съобразно онкологичната им значимост е показана следващите графики (фиг. 5, 6 и 7)



Фигура 5. Честота и разпределение на високо рисковите типове HPV по време и след приключване на бременността.



Фигура 6. Честота и разпределение на средно рисковите типове HPV по време и след приключване на бременността.



Фигура 7. Честота и разпределение на нисоко рисковите типове HPV по време и след приключване на бременността.

5.3.3.HPV вирусна инфекция и тютюнопушене

Връзката между тютюнопушенето и предразположението към инфекцията с HPV е отбелязана в редица проучвания. В предходни точки на настоящето проучване беше отбелязано, че този вреден навик е свързан с утежняване на цитологичната и колпоскопска находка, както по време на бременността, така и след приключването, което имаше статистически значима асоциация. Така, следвайки логиката, една от задачите е да бъде проверено и влиянието на тютюнопушенето върху честотата на вирусната инфекция и нейната прогресия.

На таблица 18 е показана корелацията между декларираните анамнестични данни за тютюнопушене (над 10 цигари дневно) и HPV статуса на жената по време на бременността и след нейното приключване.

Таблица № 18

Връзка между тютюнопушене и HPV инфекция по време на бременността и след приключването и.

Тютюнопушене	Жени по време на бременност				Жени след раждане			
	HPV -	%	HPV +	%	HPV -	%	HPV +	%
Група 1. Не	164	99,4	20	32,3	169	97,6	15	49.1
Група 2. Да	1	0.6	42	67.7	1	2.4	42	50.9
Общо	165	100	62	100	170	100	57	100

Намерените данни са силно обезпокоителни. От 43 пушачки по време на бременността и след приключването и, при 42 са установени високо рискови типове HPV, или това са 97% от случаите. Всички стататистически обработки на наличните данни, показват, че тютюнопушенето опосредства

HPV инфекцията, като неговото негативно влияние показва много висока статистическа значимост – P= 0.0001.

5.3.4.Проучване вертикалната трансмисия на HPV вирусна инфекция между майка и новородено

В настоящето проучване при 54 новородени от майки с регистрирана HPV инфекция беше проведено изследване с оглед проследяване на вертикалната трансмисия.

Само при 5 новородени (9.26%) бяха намерени HPV типове, които присъстват и при майката, като може да се приеме, че те са предадени по време на родовия процес (табл. 19).

Таблица № 19.

Вертикална трансмисия на HPV инфекцията от майката към детето в изследваната група.

№	Обект на изследването	Типове HPV			Начин на раждане
		Висок риск	**Среден риск**	**Нисък риск**	
Случай 1 Ж.Ж.	Майка	31			SC
	Новородено	31			
Случай 2 В.Г.	Майка	16		11, 40, 81	PN
	Новородено	16			
Случай 3 А.В.	Майка	56			PN
	Новородено	56			
Случай 4 Д.Т.	Майка	16		6, 42, 43, 70, 71	PN
	Новородено	16		6,71	
Случай 5 Н.Т	Майка	16, 18		6, 42, 43	PN
	Новородено	16, 18			

Прави впечатление, че при всичките 5 случая се намират предимно високорисковите типове HPV (16, 18, 31 и 56), които присъстват и при майката и за които може да се приеме, че са предадени по време на родовия процес. При 3 от случаите майките са контаминирани допълнително и с ниско рисковите типове (6, 11, 40, 42, 43, 70, 71 и 81).

Въпреки това, заради малкия обем на извадката не може да се правят аргументирани заключения в тази насока. Уместно е изследванията насочени към този проблем да се продължат, за да прецени необходимо ли е по-специално поведение по време на раждането и действия по отношение на новороденото касаещи профилактика на вирусната инфекция.

Обсъждане

Честотата на гениталната HPV инфекция при жената трудно може да бъде определена, тъй като различните клинични прояви не подлежат на задължително съобщаване и контрол не само в България. За това допринася преобладаването на субклиничните и латентни форми на инфекция, ниската чувствителност и специфичност на класическите и дискутабилните възможности на многобройните нови молекулярно-биологични диагностични техники.

По този начин, докато острите кондиломи се наблюдават наблюдават в 1% сред сексуално активната популация, при молекулярните изследвания се установява асимптомно носителство между 5-20% от жените в сексуално активна възраст между 15-49 год. възраст и до 30% от бременните. Съобщава се, че около 60% от женското население се среща с HPV инфекция поне един път в живота си, като при повечето от тях инфекцията е преходна. Понастоящем се приема, че HPV инфекция е най-разпространеното СТЗ по света, като броят на засегнатите се оценява на около 300 млн. души /9/.

Добре известно е, че годишно новозаболелите от рак на маточната шийка са над 0.5 млн. жени като 80% от тях са регистрирани в развиващите се страни. Повече от половината от тях се асоциират с различните клинични форми на HPV инфекция. Високата заболеваемост от рак на маточната шийка се свързва с разпространението на различните генотипове в различните региони и страни по света.

Класически са данните на Clifford и сътр. /54/, които показаха, че докато процентното разпределение на ниско- и високорисковите HPV типове в четири от световните региони не се различават съществено, напр. за Африка (региона под Сахара) - ниско рисковите са 41%, а високо рисковите – 56%; за Азия - ниско рисковите са 33%, а високо рисковите – 61%; за Южна Америка - ниско рисковите са 32%, а високо рисковите – 66% и за Европа - ниско рисковите са 29%, а високо рисковите – 68%. Те посочват разпространението на HPV генотипа за отделните страни, където при нискорисковите HPV вируси преобладават 6, 11, 42 и 41, докато групата на високорисковете се срещат 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56 и 58. В тези случаи наличието на HPV типове 16 и 18 в 60% от случаите се свързва с HPV асоцииран рак на маточната шийка.

Установено е, че при бременните жени честота на HPV инфекция е по-висока отколкото при небременните и варира от 5.5% до 65% /106/. Данните от настоящето проучване, където се установява наличие на различни HPV типове в 38.32% в българската популация на здрави бременни жени представя една висока честота на вирусната инфекция в българската популация.

В своето проучване, П. Грозданов /2/ оценява честотата на 6 HPV типа, като в него са включени 128 пациентки разделени в четири групи: една –

здрави и три с различни степени на тъканен атипизъм (лек, умерен и тежък). Контролната група от клинично здравите пациентки показва висока степен на инфектираност достигаща 20% от пациентките, като се срещат най-често типовете HPV 16 и HPV 6, а не се срещат HPV 11 и HPV 18. Тези данни се различават от литературните, където се посочва, че по света при здрави жени преобладава носителство на HPV 18. Авторът посочва, че при умерените дисплазии (CIN 2) доминира HPV 16, а при тежките (CIN 3) е налице голямо типово разнообразие с доминиране на HPV 16, 6 и 33.

Тези данни за честотата и типовото разпределение сред българската популация са близки до данните съобщавани от Georgiev et al. /72/ и се различават значително от тези на Драганов и сътр /6/, където на базата на 160 пациентки се установява 82.5% заразеност, която в зависимост от тежестта на лезиите, най-често се установяват HPV 16 (34.8%), HPV 6 (11.5%) и HPV 11/18 (6.8%).

Разликата в резултатите от посочените проучвания може да се дължи на различията в чуствителността на подбраните праймери използвани за генотипирането и броя на вирусните копия съдържащи се в съответния участък на измененията.

В мета-анализ публикуван от Bruni и съавтори /41/ включващ над един милион жени средната честота на HPV инфекцията е около 11%, като най-висока честота е отбелязана за Африка 24%, Източна Европа 21% и Латинска Америка 16%. Ако в групата на изследваните в нашето проучване жени изключим тези при които са установени средно и ниско рискови типове HPV и оставим само тези с високо рисковите – общо 62, то честотата ще бъде определена на 27%, което е сравнимо с данните за Балканския географски регион.

Инфекцията с човешки папиломен вирус е една от най-честите полово предавани инфекции. Нейното влияние върху бременността е важен и все още не добре изяснен медицински проблем. Промененият имунен и хормонален статус на бременните жени може да благоприятства инфекцията. Търси се връзката между латентните, субклинични и клиничните прояви на болестта, и риска за ранни и късни усложнения при новородените. Важен въпрос е и възможността за ранна диагностика на тази инфекция.

По време на бременността гениталните кондиломи имат склонност към нарастване и могат да достигнат значителни размери, поради засилена васкуларизация и хормонални и имунологични изменения, които могат да доведат дори до създаване на механична обструкция на родовия канал /55/.

В нашето проучване наличие на вулварни кондиломи се установи само при 5 жени жени (5.75%) в пуерпералния период, при три от тях (№ 12, 21 и 57) по време и след приключване на бременността се установиха само нискорискови типове 6, а при 1 жена (№ 85) – 11 тип. При една родилка (№32), типовото разнообразие беше значително и освен нискостепенните 11 и 31, по време на бременността бяха установени и два високорискови типа – 70 и 52, които липсваха в послеродовия период. Клиничната характеристика на установените кондиломи не беше свързана с оплаквания от страна на жените.

Цервикалната инфекция на бременни с високорискови HPV типове се асоциира с възникване на предракови интраепителни неоплазии, аномалии в плацентата, преждевременно раждане и спонтанни аборти в първия и втория триместър от бременността /173/.

Оценката на цервикалната цитология показва, че в основата на патологичните находки стои доказаната HPV инфекция, като превесът е на типовете HPV16 и 18. По отношение на видовете HPV преимуществено застъпени при бременните жени са високорискови генотипове,

идентифицирани предимно във втори триместър на бременността - 23.8% сравнено с 13.2%; за първи триместър, 17.4% за трети триместър и 15.1% в постпарталния период. Високорисковите типове – HPV 16 и HPV 18 са преобладавали като находка през трети триместър на бременността /88/.

В нашето проучване, по време на бременността от 87-те жени с HPV типизация само при 8 (9.2%) се установиха нискостепенни цитологични находки (III-A). След приключване на бременността, жените с клетъчна дискариоза са 37 (42.5%), от тях – 31 с ниска степен (III-A) и 6 - с промени от висока степен (Pap III-B), като преобладават случаите родили по нормален механизъм (29 срещу 6)

Обобщените резултати показват, че неблагоприятната промяна на цитологичната находка при налична HPV инфекция след приключване на бременността е със статистически значима разлика (p= 0.0001), което подкрепя тезата, че бременността и вирусната инфекция взаимно допринасят за развитието на по-тежки морфологични промени на епителните цервикални клетки.

Нашите данни се подкрепят от проучването на P. Grozdanov et al. /75/, където се изследва честотата и HPV типовото разпределение сред пациентки с различна степен на цервикален цитологичен атипизъм. От взетите 355 проби, в 217 (61%) авторите установяват позитивен тест за наличие на папиломна ДНК. От тях при 164 пациентки (46% от всички и 76% от позитивните за HPV) те диагностицират само един тип, а при други 53 проби (15% от всички пациентки и 24% от позитивните) са намерени два или повече папиломни вида. Типовото вирусно разпределение показва преобладаване на тип 16 - 99 проби (34.6% от всички и 45.6% от позитивните), тип 33 – 30 проби, съответно - 10.5 и 13.8%, тип 31 – 21 проби (7.3 и 9.7%), тип 6 – 17

проби (5.9 и 7.8%), тип 58 – 15 проби (5.2 и 6.9%), тип 52 – 12 проби (4.2 и 5.5%), тип 18 – 12 проби (3.8 и 5.1%) и др.

Доказано е, че HPV инфектира плацентата, но не е изяснен пътят на заразяване, като има няколко хипотетични възможности: чрез асцендиране на инфекцията, чрез инфекция на яйцеклетката или зиготата преди или в ранните етапи на имплантацията, чрез заразяване на яйцеклетката от сперматозоид с латентна HPV инфекция /168, 164/.

Важен клиничен проблем е дали риска за латентна инфекция на амниона може да се свърже с повишен риск от предтерминно раждане или други усложнения на бременността при жените с HPV инфекция.

В нашето проучване случаите с ППОМ (преди 37 г.с.) са 6 или 6.9% от всичките 87 бременни позитивни за различни HPV типове предимно високорискови. Според J.N. Hong et al. /83/, които представят данни от изследването на група от 2686 бременни жени, не са налице обективни доказателства, че HPV инфекцията е свързана с повишен риск за преждевременно раждане, но въпреки това авторите не изключват категорично риска за възможни усложнения. В тази връзка, тъй като има сравнително малко проучвания по въпроса се счита, че са необходими допълнителни данни за изясняване на потенциалните рискове от HPV инфекцията по отношение на преждевременното раждане.

Данните за риска от предаване на HPV инфекцията от майката на новороденото (вертикална трансмисия) са противоречиви и в различните източници варират от 1-5% до 40-80%. /127/. Установено е, че при положителна проба за HPV при бременните изследването на букална лигавица от новороденото може да спомогне за селекциониране–на група деца, при които има сравнително висок риск от заразяване /149, 108/ .

Нашето проучване на 54 новородени от майки с регистрирана HPV инфекция само при 5 новородени (9.26%) бяха намерени HPV типове. Прави впечатление, че при всичките 5 случая се намират предимно високорисковите типове HPV (16, 18, 31 и 56), които присъстват и при майката и за които може да се приеме, че са предадени по време на родовия процес. Въпреки това, заради малкия обем на извадката не може да се правят аргументирани заключения в тази насока, но при клиничното проследяване на децата до този момент не се установяват данни за случай с проявена клиника на ларингеална папиломатоза.

При обсъждането пътищата за заразяване се задава въпроса има ли връзка между начина на родоразрешение и риска за инфектиране на новороденото. Рискът от вертикално предаване на HPV ДНК от HPV заразена майка на новороденото се увеличава, когато бебето е родено вагинално при преминаване през инфектирана шийка на матката. Този начин на заразяване се предполага, че може да е причина за тежкото, но рядко заболяване папиломатоза на ларинкса. Изборът на цезарово сечение не може да предотврати предаването на вируса от HPV-позитивни майки. Няма достатъчно доказателства, за да се препоръча задължително цезарово сечение за всички HPV ДНК-позитивни майки /102/.

Проследяването на деца родени по вагинален път от HPV заразени майки, установява липсата на персистираща инфекция при бебетата, 6 месеца след раждането, като може да се предположи временно носителство, а не трайна вертикална инфекция /127/.

Данните за установяване на вертикалното предаване на HPV от майката на плода са непоследователни и оскъдни. Вертикално предаване може да се установи по асцендентен (цервикален) или хематогенен път

(трансплацентарно). Потенциален начин за инфекция на фетуса се свързва със заразена сперма при оплождането /86/.

Различни проучвания имат за цел да се определи честотата на човешкия папиломен вирус (HPV) в плацентата, в колострата и кръв от пъпната връв на раждащи жени и техните новородени. Биопсии са събрани от 150 плаценти, по майчината страна, 150 от феталната страна, 138 кръвни проби от пъпната връв и 118 от колострата. HPV е бил открит в 4% (6/150) от случаите на страна от плацента на майката, при 3,3% (5/150) от фетална страна, при 2,2% (3/138) в кръвта от пъпната връв и в 0,84% (1/118) в колострата проби /160, 92/.

Установено е, че инфекцията с HPV в майчиното мляко е рядка. Най-вероятно е заразената майка да предава HPV на новородено чрез плацентата или кръв от пъпната връв /170/.

Изводи

- *Разпространението на вирусните типове в групата на изследваните жени показа, че HPV инфекция по време на бременността е установена при 87 (38.32%) жени, докато след нейното приключване позитивна HPV типизация се запазва при 68 (29.95%) жени. Липсата на някои от HPV типовете в пуерпералния период, при други 23 бременни със смесена инфекция ни дава основание да посочим, че е налице статистически значимо намаление на вирусната инфекция (p= 0.0001).*
- *В групата на бременните под 30 години, се отчита по-нисък процент на високо- и среднорисковите типове, в сравнение с пациентките над 30 години.*

- *Не се установява статистически значима разлика, свързана с начина на раждане и намаляването честотата на различни HPV типове (p= 0.7863). От всички 87 бременни - 59 жени са родили по нормален механизъм, от тях след раждането - при 14 (23.73%) е установена липса на вирусна инфекция, докато в групата на 28-те жените родили със секцио, те са 5 случая или 17.86%.*
- *Ниска е честотата на случаите с клинично изявени вулварни кондиломи (5.75%). Такива се откриват само при 5 жени в пуерпералния период, като при тях се установяват предимно нискорискови типове 6 и 11 тип.*
- *Нисък е клиничния риск за латентна инфекция на амниона сързана с установяване на папиломни вируси. В нашето проучване честотата на случаите с ППОМ (предимно 35-36 г.с.) е 6.9% (6 от 87 позитивни бременни), като при всички бяха регистрирани високорискови типове HPV (16, 31, 56, 66, 68).*
- *В нашето проучване, по време на бременността от 87-те жени с HPV типизация само при 8 (9.2%) се установиха нискорискови цитологични находки (III-A). След приключване на бременността, жените с клетъчна дискариоза са 37 (42.5%), от тях – 31 с ниска степен (III-A) и 6 - с промени от висока степен (Pap III-B), като преобладават случаите родили по нормален механизъм (29 срещу 6)*
- *Обобщените резултати показват, че неблагобриятната промяна на цитологичната находка при налична HPV инфекция след приключване на бременността е със статистически значима разлика (p = 0.0001), което подкрепя тезата, че бременността и вирусната инфекция взаимно се допълват за развитието на по-тежки морфологични промени на епителните цервикални клетки.*

- *В групата на бременните при 62 от тях е установената вирусна инфекция от високорискорискови типове, среднорисковите типове са 17 и ниско рискови при 44. При 41 от случаите HPV инфекция е причинена, само от един тип, докато при останалите 46 бременни се намери смесена инфекция (от два до 8 типа).*

  По честота най-разпространени са: от нискорисковите - 6 тип (20.5%), 11 тип (14.7%), 42 тип (13.2%), 26, 43 и 70 тип (по 5.9%), 71, 84, 40, 57 и 44 тип (по 2.9%), 54 и 56 (по 2.9%) и 55, 66, 61, 31, 72 (по 1.4%); от среднорисковите - 53 тип (72.2%), 82 тип (22.2%) и 81 тип (5.56%); от високорисковите типове са 16 тип (19.3%), 52 (11.36%), 56 и 45 тип (по 10.2%), 31 тип (9%), 18, 66 и 68 тип (по 6.8%), 58 (5.68%), 33 и 59 тип (по 3.4%), 39 тип (2.27%) и 40, 61, 35 и 51 (по 1.13%).

- *В следродовия период положителен тест за HPV инфекция запазиха 71 от бременните жени. При 40 от тях самостоятелно, само по един тип, при останалите 31 родилки - смесена инфекция от два до четири HPV типа*

  По честота най-разпространени типове са: от нискорисковите - 6 (33.3%), 11 (20.0%), 42 (10.0%), 56, 71, 44 и 54 тип (по 6.66%), 43, 84 и 57 и 44 (по 3.33%); от среднорисковите - 53 тип (75.0%), 82 (25%); от високорисковите типове - 16 (22.3%), 31 тип (10.5%), 52 и 56 (по 9.2%), 18, 45 и 66 (по 7.9%), 58 и 59 (по 5.2%), 33 и 68 (по 3.9%), 39 (2.6%), 39 тип (2.3%), 40, 71 и 51 (по 1.3%).

- *Данните от анамнезата, показват статистическа значимост (p= 0.0001) на взаимовръзката тютюнопушене с установената HPV инфекция, като от 43 пушачки по време на бременността и в*

следродовия период, при 42 в 97% от случаите са установени високо рискови типове HPV.

- *При 54 новородени от майки с регистрирана HPV инфекция при 5 новородени (9.26%) бяха намерени предимно високорискови типове HPV (16, 18, 31 и 56), които присъстват и при майката и за които може да се приеме, че са предадени по време на родовия процес.*

5.4. ДИАГНОСТИЧНА ЗНАЧИМОСТ НА ЦИТОЛОГИЧНОТО И КОЛПОСКОПСКО ИЗСЛЕДВАНЕ В ЗАВИСИМОСТ ОТ HPV СТАТУСА

С оглед поставената цел на изследването да проучим разпространението и клиничната значимост на HPV инфекция на маточната шийка при бременни жениси поставихме задача да обективизараме диагностичните възможности на приложените методи за ранна диагностика на цервикалните изменения. Като критерий за оценка или т.нар. «златен стандарт» използвахме положителния резултат (за средно и високорискови онкологични типове) от HPV теста.

Тези данни сравнихме с обобщените класификационни находки за резултати от цитологичното и колпоскопско изследване посочени в глава „Материал и методики“. За целта цитонамазките бяха разделени в две групи: нормални (Pap I и II) и атипични / дискариотични (III-**A** и по-тежка степен). А колпоскопските находки бяха групирани в три подгрупи - нормални, атипични и суспектни за неоплазия, съобразно посочените по-долу критерии:

Група – Нормални колпоскопски находки

- колпоскопия: оригинален плосък епител, цилиндричен епител, нормална зона на трансформация
- колпоскопия: различни други находки, като възпаление, ендометриоза, полипи и др.

Група – Анормални колпоскопски находки

- дискретни, нежни анормални колпоскопски находки - плосък оцетно-бял епител, пунктирана зона, мозайка
- колпоскопия: по тежките варианти на анормалните колпоскопски находки, както и участъците със съдов атипизъм или йод-негативност, в или извън ЗТ

Група - Колпоскопски находки суспектни за инвазивен карцином

5.4.1. Диагностична сигурност на цитологичния метод

Връзката между HPV инфекцията и цитологичните промени не е еднозначна. Въпреки, че като цяло се приема, че човешките папиломни вируси са необходимо, но недостатъчно условие за появата на клетъчен полиморфизъм, корелацията между резултатите от двата скринингови метода е обект на различни проучвания /59, 163/.

В проучването на Moscicki et al. /111/ се подчертава, че бременността не увеличава прогресията на пре-неопластичните цервикални находки. Авторите обсъждат целесъобразността от провеждането на цитологични изследвания по време на бременността, като смятат, че използването на ДНК тестове за определяне наличието на HPV инфекция е препоръчително в диагностичен план.

Оценка възможностите на проведеното цитологично изследване да диагностицира морфологични промени асоцииращи се с наличие на HPV инфекция се извърши на база сравняване на резултатите от двата тест представени в таблица 20.

Данните от настоящето проучване показват, че по време на бременността при 217 (95.59%) пациенти цитологичната находка е била определена като PAP I и PAP II. От тях 156 (71.9%) са определени като истински негативни (ИН) за липсата на позитивност за HPV инфекция или с наличие на ниско-рискови типове. При останалите 61 пациентки (28.1%) от тази група са намерени средно и високо-рискови типове HPV, които се явяват фалшиво отрицателни (ФН) поради липса на дискариотични промени, които да се асоциират с позитивния HPV тест. При десет от пациентките (4.41%) е определена цитологична находка PAP III-A, която при две (20%) се оценява като фалшиво позитивни (ФП) т.е липсва HPV инфекция, а при останалите осем (80%) се приемат за истински позитивни (ИП) поради наличието на средно и високо-рискови типове (табл 20).

Таблица № 20.

Сравнение на данните от проведения Pap тест и HPV тестуване по време на бременността.

Цитологични находки	**РЕЗУЛТАТИ от ДНК теста за HPV (бременни)**				
Pap тест	**Отрицателен тест**		**Положителен тест**		**Общо**
	Негативни за HPV	*Ниско рискови HPV типове*	Средно рискови	Високо рискови	
PAP I	*47 (82.4%)*	*4 (7%)*	**1 (1.8%)**	**5 (8.8%)**	**57 (100%)**
PAP II	*91 (56.9%)*	*14 (8.8%)*	**5 (3.1%)**	**50 (31.2%)**	**160 (100%)**
PAP III-A	**2 (20%)**	**0**	**1 (10%)**	**7 (70%)**	**10 (100%)**
PAP III-B	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
PAP IV	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
PAP V	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Общо	140 (61.7%)	18 (7.9%)	7 (3.1%)	62 (27.3%)	**227 (100%)**

На основание на представените резултати за групата на бременните жени се намериха следните стойности на категориите отразяващи акуратността на цитологичното изследване да диагностицира пациентките за наличие или отсъствие HPV инфекция, както следва: фалшиво позитивни (ФП) – 2 (0.9%), фалшиво-негативни (ФН) - 61 (26.9%), истински позитивни (ИП) - 8 (3.5%), истински негативни (ИН) – 156 (68.7%); чувствителност- 11.59% ; специфичност - 98.73%; Pr.v.(+) - 80.0%, Pr.v.(-) - 71.89%; Ефикасност – 72.2%.

❖

За да се оцени динамиката на цервикалните промени на фона на HPV статуса и влиянието на бременността същите показатели бяха анализирани в изследваната група жени след раждане (табл 21).

Таблица № 21

Сравнение на данните от проведения Pap тест и HPV тестуване в послеродовия период.

Цитологични находки	**РЕЗУЛТАТИ от ДНК теста за HPV (родилки)**				
Pap тест	***Отрицателен тест***		**Положителен тест**		**Общо**
	Негативни за HPV	*Ниско рискови HPV типове*	Средно рискови	Високо рискови	
PAP I	*17 (100%)*	*0*	**0**	**0**	**17 (100%)**
PAP II	*133 (80.6%)*	*10 (6.1%)*	**1 (0.6%)**	**21 (12.7%)**	**165 (100%)**
PAP III-A	**9 (22.5%)**	**0**	**0**	**31 (77.5%)**	**40 (100%)**
PAP III-B	**0**	**0**	**0**	**5 (100%)**	**5 (100%)**
PAP IV	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
PAP V	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Общо	159 (70%)	10 (4.4%)	1 (0.5%)	57 (25.1%)	**227**

При 182 (80.18%) пациенти цитологичната находка е била определена като PAP I и PAP II. От тях 160 (87.9%) са ИН, тъй като са негативни за HPV инфекция или за наличие на ниско-рискови типове. Останалите 22 пациентки

(12.1%) са определени като ФН поради наличие на средно и високо-рискови типове HPV. Други 45 (19.82%) от пациентките са с цитологична находка PAP III-A и PAP III-B, от които ФП са 9 пациентки (22.5%) поради липса на HPV инфекция, а в останалите - 36 пациентки (77.5%) е свързана с наличието на високо-рискови типове, които са ИП.

На основание на представените резултати за изследваната група жени след раждане се намериха следните стойности на категориите отразяващи акуратността на цитологичното изследване да диагностицира пациентките за наличие или отсъствие HPV инфекция, както следва: фалшиво позитивни (ФП) – 9 (3.9%), фалшиво-негативни (ФН) - 22 (9.7%), истински позитивни (ИП) - 36 (15.9%), истински негативни (ИН) – 160 (70.5%); чувствителност- 62.07%; специфичност - 94.67 %; Pr.v.(+) - 80.00%, Pr.v.(-) - 87.91%; Ефикасност – 86.3%.

Обсъждане

В литературата е представена разнообразна оценка на параметрите свързана с дизайна на проучванията, размера на групите и други фактори. Като цяло се приема, че се наблюдава високо ниво на фалшиво негативни (ФН) цитологични данни /120/.

В групата на 69-те бременни жени, при които има регистрирана вирусна инфекция с високо и средно рискови типове HPV, нормална цитологична находка е определена при 61 (88.4%), докато за патологична, описана като PAP III-A при 8 (11.6%). Тези данни са в подкрепа на мнението на много автори, които обръщат внимание, че наличието на HPV инфекция не е задължително свързано с неблагоприятни промени на цервикалните клетки. От тази гледна точка, ДНК базирания скрининг тест за HPV, като част от

профилактиктична програма по време на бременността си заслужава да бъде назначаван само при наличие анормални цитологични находка имайки предвид, че в нашето проучване негативния тест за HPV е установен при 160 (87.9%) от бременните жени. Липсата на категорична връзка на HPV статуса с цитологичните промени на цервикалните клетки се потвърждава и от наблюдаваната статистически значима разлика (p=0.023) при сравняване наличието на патологични находки при липсата на вирусна инфекция (2 от 158 бременни) и при наличието на такава (8 от 69 бременни).

След приключване на бременността се наблюдава още по-подчертана статистически значима разлика (p= 0,0001) в наличието на патологични находки при липсата на вирусна инфекция (9 от 169 бременни) и при наличието на такава (36 от 58 бременни табл. 21)

Липса на корелация между цитологичния резултат и приложените молекулярно-биологични тестове отчитат Златков и сътр. /10/, които намират, че DNA-HPV теста е позитивен при 73.1% (n=120) от случаите с негативен Pap тест (I-II гр.) от изследваните 164 жени. Подобни са данни и за положителните за E6/E7 mRNA теста – 60.8% (14 от 23) жени, при които се намира нормална цитологична находка. Това потвърждава нашите данни, че цитологичното изследване е с ниска диагностична стойност (чувствителност) за откриване на HPV инфекцията. И докато при ДНК тестовете, това е обяснимо, имайки предвид необходимостта от продължително персистиране на вируса за иницииране на канцерогенезата, то случаите с нормален цитологичен резултат и позитивност на РНК-теста означава, че този процес е стартирал, но все още няма морфологична изява на ниво единични клетки от повърхностния епител, които се ексфолират при пробовземането на материала.

Категориите отразяващи акуратността на цитологичното изследване и връзката му с HPV инфекцията по време на бременността и след раждане са сравнени в таблица 22.

Таблица № 22

Сравнение на акуратността на цитологичното изследване за откриване на HPV инфекцията по време на бременността и след раждане.

Категории	По време на бременността	След раждане
Истински позитивни	8 (3.5%)	36 (15.9%)
Фалшиво позитивни	2 (0.9%)	9 (3.9%)
Фалшиво негативни	61 (26.9%)	22 (9.7%)
Истински негативни	156 (68.7%)	160 (70.5%)
Чувствителност	11.59%	62.07%
Специфичност	98.73%	94.67%
Положителна прогнозна стойност PPV	80%	80%
Отрицателна прогнозна стойност NPV	71.89%	87.91%
Ефективност	72.2%	86.3%

Диагностичната чувствителност на цитологичните изследвания да откриват HPV позитивни пациентки е много по- голяма след раждане в сравнение на намерената по време на бременността – 62% спрямо 11.59%. Въз основа на тази високата специфичност може да се приеме, че при нормални резултати от цитологични изследвания не е целесъобразно пациентките да се насочват за ДНК изследвания за HPV инфекция. Друг показател, който е важно да бъде обсъден е ефективността на теста. По принцип тя се влияе от честотата (преобладаването) на заболяването. При сравними параметри по отношение на чувствителност и специфичност ефективността на даден тест ще нараства с намаляване на преобладаването на

заболяването. Това може да обясни, защо ефективността на теста след раждане е по-висока (86.3%) спрямо тази по време на бременност (72.2%), като се отчита, че HPV вирусната инфекция е по- рядка в послеродовия период вероятно следствие инволуция на измененията на база промяна в хормоналния статус и клетъчно-медиирания имунитет.

5.4.2. Диагностична сигурност на колпоскопското изследване

В клиничната практика най-важно за оценката взаимовръзката между човешкия папиломен вирус и пре-неопластичните и неопластични лезии на маточната шийка е наличието на обективни критерии, които да показват кога и кои изменения ще прогресират, регресират или стационират.

В нашето проучване се потвърди, че цитологичното изследване е с ниска диагностична стойност за откриване на HPV инфекция. В тази връзка е необходимо да се оцени ролята на колпоскопското изследване, като алтернативен метод за клинична диагноза на папиломните лезии. В своята монография И. Каргьозов и А. Карагьозов /177/ посочват, че в зависимост от конкретната ситуация колпоскопията се явява водещ или подчинен на цитологията филтърен метод. В това отношение изследването на бременните жени е добър пример за приложение на колпоскопията като втори филтър, с който се цели намаляване процента на излишните биопсии.

Оценка възможностите на проведеното колпоскопско изследване да диагностицира морфологични промени асоцииращи се с HPV инфекция се са представени в таблица 23.

Таблица № 23.

Сравнение на данните от колпоскопското изследване и HPV тестуване по време на бременността.

Колпоскопски находки	**РЕЗУЛТАТИ от ДНК теста за HPV (бременни)**				
	Отрицателен тест		**Положителен тест**		**Общо**
	Негативни за HPV	*Ниско рискови HPV типове*	Средно рискови	Високо рискови	
Нормални	*139* **(63.5%)**	*18* **(8.2%)**	**6 (2.7%)**	**56 (25.6%)**	**219 (100%)**
Анормални	**1 (12.5%)**	**0**	**1 (12.5%)**	**6 (75.0%)**	**8 (100%)**
Суспектни за Нео	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Общо	140 (61.7%)	18 (7.9%)	7 (3.1%)	62 (27.3%)	**227 (100%)**

Данните от настоящето проучване показват, че по време на бременността при 219 (96.47%) пациенти колпоскопската находка е била определена като нормална. От тях 157 (71,7%) са ИН защото са негативни за HPV инфекция или е установено наличие на ниско-рискови типове. Останалите 62 пациентки (28,3%) се явяват ФН, тъй като са намерени средно и високо-рискови типове HPV. При осем (3.52%) от пациентките е определена анормална колпоскопска находка, от които една (12.5%) е ФП поради липса на HPV инфекция, а при останалите седем (87,5%) са ИП заради наличието на средно и високо-рискови типове (табл. 23).

На основание на представените резултати за групата на бременните жени се намериха следните стойности на категориите отразяващи акуратността на колпоскопското изследване да диагностицира пациентките за наличие или отсъствие HPV инфекция, както следва: фалшиво позитивни (ФП) – 1 (0.4%) , фалшиво-негативни (ФН) - 62 (27.3%), истински позитивни (ИП) - 7 (3.1), истински негативни (ИН) – 157 (69.2%); чувствителност-

10.14% ; специфичност - 99. 37%; Pr.v.(+) - 87.5%, Pr.v.(-) - 71.69%; Ефикасност – 72.24%.

❖

За да се оценят промените в колпоскопските находки на фона на HPV статуса и влиянието на бременността същите показатели бяха анализирани в изследваната група жени след раждане (табл 24).

При 194 (85.46%) пациентки тя е определена като нормална. От тях 165 (85,1%) са ИН, определени като негативни за HPV инфекция или с наличие на ниско-рискови типове. Като ФН са оцени останалите 29 пациентки (14,9%), при които са намерени средно и високо-рискови типове HPV. Други 33 (14.54%) от пациентките са с анормална колпоскопска находка, при които 4 (12%) са ФП на фона на липсваща HPV инфекция, а в останалите 29 (88%) са налице високо-рискови типове и се явяват ИП.

Таблица № 24.

Сравнение на данните от колпоскопското изследване и HPV тестуване в послеродовия период.

Колпоскопски находки	**РЕЗУЛТАТИ от ДНК теста за HPV (родилки)**				
	Отрицателен тест		**Положителен тест**		**Общо**
	Негативни за HPV	*Ниско рискови HPV типове*	Средно рискови	Високо рискови	
Нормални	*155 (79.9%)*	*10 (5.1%)*	**1 (0.5%)**	**28 (14.5%)**	**194 (100%)**
Анормални	**4 (2.5%)**	**0**	**0**	**29 (75.0%)**	**33 (100%)**
Суспектни за Нео	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Общо	159 (70.0%)	10 (4.5%)	1 (0.4%)	57 (25.1%)	**227 (100%)**

На основание на представените резултати за изследваната група жени след раждане се намериха следните стойности на категориите отразяващи акуратността на колпоскопското изследване да диагностицира пациентките за наличие или отсъствие HPV инфекция, както следва: фалшиво позитивни (ФП) – 29 (12.8%), фалшиво-негативни (ФН) - 4 (1.8%), истински позитивни (ИП) - 29 (12.8), истински негативни (ИН) – 165 (72.6%); чувствителност-87.88%, специфичност - 85.05%; Pr.v.(+) - 50.0%, Pr.v.(-) - 97.63%; Ефикасност – 85.5%.

Категориите отразяващи акуратността на колпоскопското изследване и връзката му с HPV инфекцията по време на бременността и след раждане са показани на таблица 25 .

Таблица № 25.

Сравнение на акуратността на колпоскопското изследване за откриване на HPV инфекцията по време на бременността и след раждане.

Категории	По време на бременността	След раждане
Истински позитивни	7 (3,1%)	29 (12,8%)
Фалшиво позитивни	1 (0,4%)	29 (12,8%)
Фалшиво негативни	62 (27,3%)	4 (1,8%)
Истински негативни	157 (69,2%)	165 (72,2%)
Чувствителност	10,14 %	87,88%
Специфичност	99,37 %	85,05%
Положителна прогнозна стойност PPV	87,5%	50%
Отрицателна прогнозна стойност NPV	71,69%	97,63%
Ефективност	72,24%	85,5%

Обсъждане

Колпоскопското изследване – нативна и разширена колпоскопия с използване на оцетна киселина и Луголов разтвор беше проведено при всичките 227 жени по време и след приключване на бременността.

Анализът на данните по време на бременността показва, че преобладават нормалните колпоскопски находки – 219 (96.48%) срещу статистически значимо по нисък дял на анормалните – 8 бр. (3.52%). Подобна тенденция е налице и при резултатите от колпоскопското изследване на родилите жени, където нормалните находки са 194 бр. (85.5%), а анормалните колпоскопски находки са 33 бр. (14.5%). И тук, след раждането както при цитологичното изследване, колпоскопското изследване показва по-високи диагностичните възможности в пуерпералния период, което е статистически значимо (p=0001) и отразява динамиката на находките по-време и след бременността.

Според Карагьозов и сътр. /12/ честотата на колпоскопските атипични находки се установява в границите от 5- до 20%, сред които честота на колпоскопските HPV находки е в границите на 2.68 до 5.51%, а на тези които се асоциират с пре-неопластични изменения от 0.5 до 1.6%/

Повечето от проучванията не дават висока оценка за специфичността и чувствителността на колпоскопското изследване за откриване на HPV инфекцията. Те посочват, че пряка зависимост между наличието на анормална колпоскопска находка и вирусна инфекция обикновено не е статистически значима /118/.

Подобни резултатите съобщава и В. Златков /7/, който отчита липсата на значима статистическа разлика в честотата на нормални (51.3%) и анормални находки (48.7%) при изследване на бременни жени с начална

бременност, в сравнение с тези след приключване на бременността, където нормалните са 58.7%, а анормални колпоскопски находки - 41.3%.

Той посочва, че по-високата чувствителност на колпоскопския метод се движи в границите от 72.1 до 90%, спрямо 30 - 58.3% при цитологичния метод. Същевременно, потвърждава по-голямата специфичност на цитологичното изследване (90.6- 98.3%) сравнена с тази на колпоскопското (69.2 - 81.2%).

Изводи

- *В групата на 69-те бременни жени, при които има регистрирана вирусна инфекция с високо и средно рискови типове HPV, нормална цитологична находка е определена при 61 (88.4%), докато за патологична, описана като PAP III-A и по-тежка, едва при 8 (11.6%), което показва липсата на категорична връзка (p=0.023) на HPV статуса с цитологичните промени на цервикалните клетки.*
- *Същата зависимост подкрепена със статистически значима разлика (p= 0,0001) се наблюдава и след приключване на бременността, което потвърждава, че HPV инфекция вероятно е необходимо, но недостатъчно условие за появата на клетъчен полиморфизъм (атипизъм) на цервикалните клетки.*
- *Анализът на резултатите от колпоскопското изследване по време на бременност показва, че преобладават нормалните колпоскопски находки – 219 (96.48%) срещу статистически значимо по нисък дял на анормалните – 8 бр. (3.52%).*
- *Подобна тенденция е налице и при резултатите от колпоскопското изследване на родилите жени, където нормалните находки са 194*

бр. (85.5%), а анормалните колпоскопски находки са 33 бр. (14.5%). И тук, след раждането както при цитологичното изследване, колпоскопското изследване показва по-високи диагностичните възможности в пуерпералния период, което е статистически значимо (p=0001) и отразява утежнената динамика на находките по-време и след бременността.

- *Пряка зависимост между наличието на анормална колпоскопска находка и вирусна инфекция не е статистически значима.*
- *Обобщеният анализ потвърждава ниската диагностична значимост на цитологичното и колпоскопско изследване за откриване на морфологични промени свързани с наличието на цервикална HPV инфекция.*

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Здравното състояние на маточната шийка по време на бременност е важен проблем в акушеро-гинекологичната практика, поради добре известната роля на хормоналните промени, водещи до трудности в диагностичната интерпретация на находките.

Както нашето, така и множество други проучвания показват, че честотата на предраковите изменения на маточната шийка по време на бременност не се различава съществено от тази при небременните жени. В тази връзка си поставихме задача да оценим дали са налице рискови фактори, които да се асоциират с тези промени или самата бременност трябва да се приеме като възможност за обособяване на рискова група изискваща организация на профилактична програма.

Нашето изследване на базата на анамнестични, клинични и лабораторни изследвания установи, че проучената от нас група бременни са клинично здрави жени. Всички отклонения включително и при тези при които се установяваха някои различия или рискови фактори се движеха в границите на нормата за съответния показател. Това ни даде основание да гарантираме липсата на друга патология, която би опорочила анализа на проведените диагностични изследвания.

Предлагани са и се прилагат различни диагностични методи за оценка състоянието на цервикалната лигавица. За съжаление, малко от тях изпълняват самостоятелно всички изисквания за качествен и ефективен скрининг.

Цитологичното изследване продължава да бъде водещият тест за оценка здравното състояние на епитела на маточната шийка по-време на бременност, поради висока специфичност, независимо от ниската чувствителност. Установената статистически значима разлика, която показва промяна тежестта на цитологичните находки след приключване на бременността е за

сметка основно на ниско степенните изменения. Подобна значима разлика в посока утежняване тежестта на цитологичните изменения по време и след приключване на бременността се намира и при жени родили по абдоминален път спрямо тези родразрешени по нормален механизъм, както и на пушачки сравнени с тези бременни, които непушат.

В тази връзка анализът на получените резултати поставят въпроса, доколко жените родили чрез цезарово сечение и злоупотребяващи с никотин представляват рискова група и изискват по-нататъшно активно проследяване.

Ролята на колпоскопското изследване като референт на патологичните цитонамазки е добре известна. В нашето проучване, както и след приложение на цитологичния метод установихме статичтически значимо утежняване на находките след приключване на бременността като тази тенденция е за сметка на възпалителните, HPV и нискостепенните CIN изменения. Същевременно се запазва и неблагоприятната тенденция за утежняване на колпоскопските находки при жените, които пушат в сравнение с непушачките.

Хистологичното изследване продължава да е т. нар. "златен стандарт" при оценка възможностите на различните методики. В нашето проучване „страхът“ от приложение на прицелна биопсия от страна на пациентките е в основата на малкия брой случаи, при които си позволихме да използваме методиката и то след приключване на бременността. Това не ни позволява да направим значими изводи, но въпреки това прави впечатление асоциацията на хистологичните промени с морфологични данни за HPV инфекция в случаите с нискостепенните находки завършили с деструктивна терапия.

Намерените от нас статистически значими разлики в цитологичните, колпоскопските и единичните хистологични находки между групата от бременни и контролния преглед след приключване на бременността още

веднъж обръщат внимание върху необходимостта от комплексно прилагане и на трите методики. Въпреки това имайки предвид актуалната хипотеза за механизма на цервикалната онкогенеза, проучването на HPV-инфекцията чрез ДНК тестуване се явява съществен момент при оценка на различните предракови изменения.

В тази връзка, типизацията за наличието на основните онкогенни HPV генотипа се приема като обективен тест, чрез които бихме намалили субективните грешки при използване на досегашните класически методи за диагноза.

В проведеното от нас проучване с цел изясняване HPV статуса на 227 бременни жени и динамичното му проследяване в ранния пуерперален период показа, че разпространението на HPV инфекция по време на бременността достига 87 (38.32%) жени, докато след нейното приключване позитивна HPV типизация се запазва при 68 (29.95%) жени. Липсата на някои от HPV типовете в пуерпералния период, при други 23 бременни със смесена инфекция ни дава основание да посочим, че е налице статистически значима инволуция на вирусната инфекция (p= 0.0001).

Не се установява статистически значима разлика, свързана с начина на раждане и намаляването честотата на различни HPV типове (p= 0.7863). Ниска е честотата на случаите с клинично изявени вулварни кондиломи - 5 (5.75%) жени в пуерпералния период. Нисък е клиничния риск за латентна инфекция на амниона от носителството на папиломни вируси. В нашето проучване честотата на случаите с ППОМ (предимно 35-36 г.с.) е 6.9% (6 от 87 позитивни бременни), като при всички бяха регистрирани високорискови типове HPV (16, 31, 56, 66, 68).

Пряката връзка на HPV инфекцията с промени в цитологичната находка, трудно може да бъде оценена. Въпреки това обобщените резултати в

нашето проучване показват, че неблагобриятната промяна на цитологичната находка при налична HPV инфекция след приключване на бременността е със статистически значима разлика (p = 0.0001), което подкрепя тезата, че бременността и вирусната инфекция взаимно допринасят за развитието на по-тежки морфологични промени на епителните цервикални клетки.

В групата на бременните при 62 от тях е установената вирусна инфекция от високорискорискови типове, среднорисковите типове са 17 и ниско рискови при 44. При 41 от случаите HPV инфекция е причинена, само от един тип, докато при останалите 46 бременни се намери смесена инфекция (от два до 8 типа).

По честота най-разпространени са: от нискорисковите - 6 тип (20.5%), 11 тип (14.7%), 42 тип (13.2%), 26, 43 и 70 тип (по 5.9%), 71, 84, 40, 57 и 44 тип (по 2.9%), 54 и 56 (по 2.9%) и 55, 66, 61, 31, 72 (по 1.4%); от среднорисковите - 53 тип (72.2%), 82 тип (22.2%) и 81 тип (5.56%); от високорисковите типове са 16 тип (19.3%), 52 (11.36%), 56 и 45 тип (по 10.2%), 31 тип (9%), 18, 66 и 68 тип (по 6.8%), 58 (5.68%), 33 и 59 тип (по 3.4%), 39 тип (2.27%) и 40, 61, 35 и 51 (по 1.13%).

В следродовия период положителен тест за HPV инфекция запазиха 71 от бременните жени. При 40 от тях самостоятелно, само по един тип, при останалите 31 родилки - смесена инфекция от два до четири HPV типа

По честота най-разпространени типове са: от ниско-рисковите - 6 (33.3%), 11 (20.0%), 42 (10.0%), 56, 71, 44 и 54 тип (по 6.66%), 43, 84 и 57 и 44 (по 3.33%); от среднорисковите - 53 тип (75.0%), 82 (25%); от високорисковите типове - 16 (22.3%), 31 тип (10.5%), 52 и 56 (по 9.2%), 18, 45

и 66 (по 7.9%), 58 и 59 (по 5.2%), 33 и 68 (по 3.9%), 39 (2.6%), 39 тип (2.3%), 40, 71 и 51 (по 1.3%).

Анализът на анамнестичните данни, показват че тютюнопушенето опосредства HPV инфекцията, като неговото негативно влияние показва много висока статистическа значимост (p= 0.0001). От 43 пушачки по време на бременността и в следродовия период, при 42 са установени високо рискови типове HPV, или 97% от случаите.

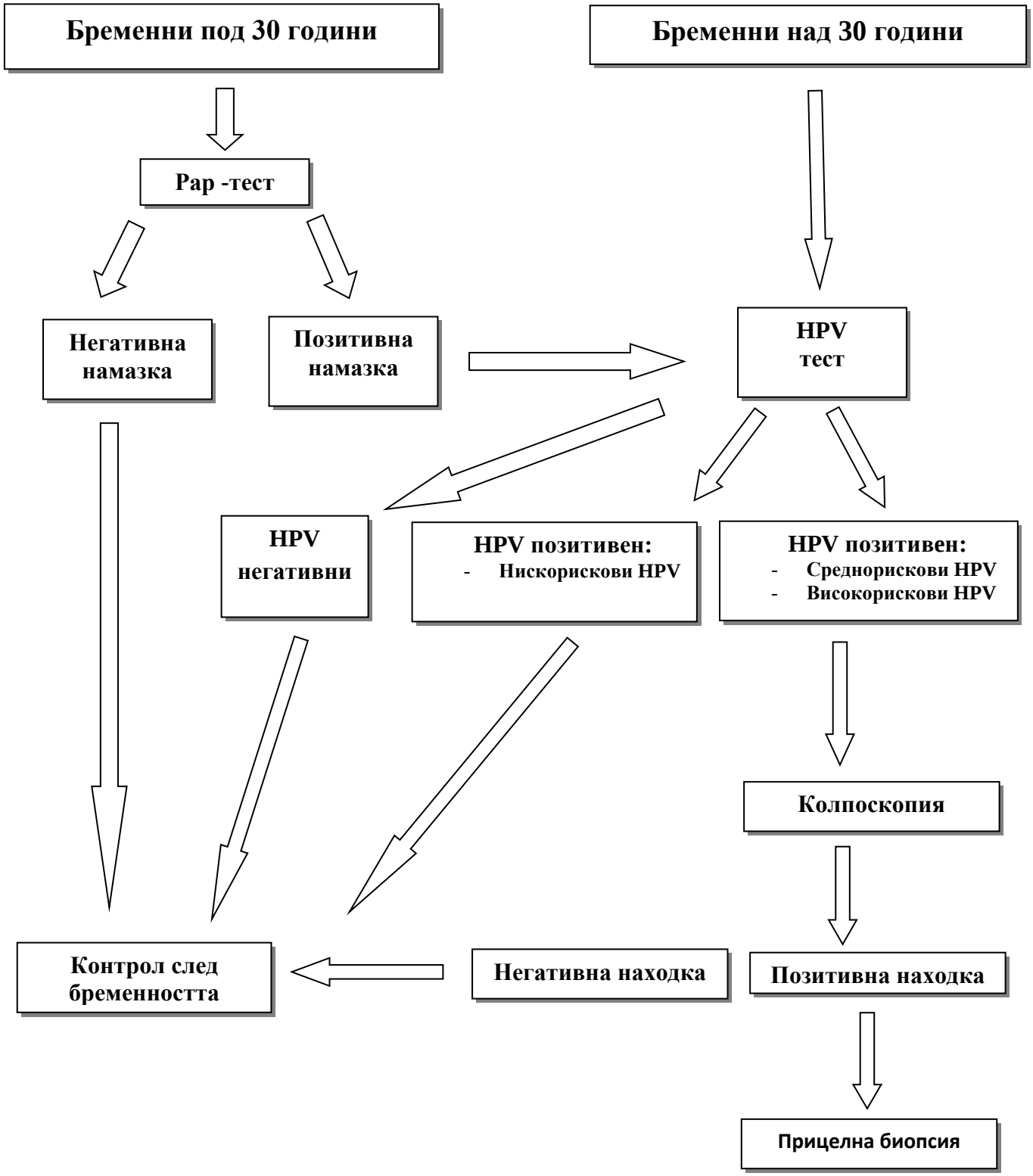
При 54 новородени от майки с регистрирана HPV инфекция при 5 новородени (9.26%) бяха намерени предимно високорискови типове HPV (16, 18, 31 и 56), които присъстват и при майката и за които може да се приеме, че са предадени по време на родовия процес.

Проучването потвърждава ниската специфичност и чувствителност, както на цитологичното, така и на колпоскопско изследване за откриване на HPV инфекцията. И тук, двете методик показва по-високи диагностичните възможности в пуерпералния период, което е статистически значимо (p=0001) и отразява утежняването на находките след бременността.

В обобщение на всичко посочено по-горе*, предлагаме следната схема на възможностите за цервикален скрининг при бременните жени*, който може да се използва в ежедневната акушеро-гинекологична практика.

Основни принципи за нейното съставяне са свързани, както с резултатите от нашето изследване, така и от литературните данни за все по нарастващата диагностична значимост на HPV - ДНК тестовете, при жените над 30 годишна възраст.

АЛГОРИТЪМ


Бременни под 30 години
Бременни над 30 години
Pap -тест
Негативна намазка
Позитивна намазка
HPV тест
HPV негативни
HPV позитивен:
- Нискорискови HPV
HPV позитивен:
- Среднорискови HPV
- Високорискови HPV
Колпоскопия
Контрол след бременността
Негативна находка
Позитивна находка
Прицелна биопсия

7. ИЗВОДИ

1. *Обхванат е контингент от 227 бременни жени между 18 и 49 годишна възраст (ср. 30.51 г.), от тях – 110 под 30 год. (48.45%) и 117 – над 30 год. или (51.55%). Преобладават бременните в първата половина на бременността (99.6%), като при всички - различията в анамнестичните, клиничните и лабораторните резултати се движеха в границите на нормата за съответния показател.*

2. *Нашето проучване установи статистически значимо увеличаване честотата на атипичните цитологични ($p<0.0001$) и колпоскопските находки ($p<0.0001$) след приключване на бременността в сравнение с резултатите по време на бременността, като те са за сметка на възпалителните, HPV и нискостепенните CIN изменения.*

3. *Подобни неблагоприятни статистически значими промени в динамиката на цитологичните ($p<0.0001$) и колпоскопски находки ($p<0.0001$) преди и след раждане при жените, при пушещи в сравнение с непушачки, както и при цитологичните изменения по време и след приключване на бременността при жени родили по абдоминален път (24%), спрямо тези родразрешени по нормален механизъм (14.8%).*

4. *Разпространението на вирусните типове в групата на изследваните жени показа, че HPV инфекция по време на бременността е установена при 87 (38.32%) жени, докато след нейното приключване позитивна HPV типизация се запазва при 68 (29.95%) жени. Липсата на някои от HPV типовете в пуерпералния период, при други 23 бременни със смесена инфекция ни дава основание да посочим, че е налице статистически значимо намаление на вирусната инфекция (p= 0.0001).*

5. *В групата на бременните под 30 години, се отчита по-нисък процент на високо- и среднорисковите типове, в сравнение с пациентките над 30 години, като не се установява статистически значима разлика, свързана с начина на раждане и намаляването честотата на различни HPV типове (p= 0.7863).*

6. *Нисък е клиничния риск за латентна инфекция на амниона свързана с установяване на папиломни вируси. В нашето проучване честотата на случаите с ППОМ (предимно 35-36 г.с.) е 6.9% (6 от 87 позитивни бременни), като при всички бяха регистрирани високорискови типове HPV (16, 31, 56, 66, 68).*

7. *В групата на бременните типовото разпределение показва, че при 62 от тях, тя е свързана с високорискорискови типове като преобладават 16, 52, 56, 45, 31 и др., при 17 – среднорискови (53, 82 и 81) и ниско рискови при 44 (6, 11, 42 и др.). При 41 от случаите HPV инфекция е причинена, само от един тип, докато при*

останалите 46 бременни се намери смесена инфекция (от два до 8 типа).

8. *В следродовия период положителен тест за HPV инфекция запазиха 71 от бременните жени. При 40 от тях самостоятелно, само по един тип, при останалите 31 родилки - смесена инфекция от два до четири HPV типа. По честота най-разпространени са: от нискорисковите - 6, 11, 42 и др., от среднорисковите - 53 и 82; а от високорисковите типове - 16, 31, 52, 56, 18, 45, 66 и др.*

9. *При 54 новородени от майки с регистрирана HPV инфекция при 5 новородени (9.26%) бяха намерени предимно високорискови типове HPV (16, 18, 31 и 56), които присъстват и при майката и за които може да се приеме, че са предадени по време на родовия процес.*

10. *Нашето проучване потвърждава ниската диагностична значимост на цитологичното и колпоскопско изследване за откриване на морфологични промени свързани с наличието на цервикална HPV инфекция.*

8.ПРИНОСИ

СПРАВКА

за приносите в дисертационния труд

1. За пръв път в България извършихме проучване разпространението на високо, средно и нискорисковите генотипове HPV сред бременни жени.

2. За пръв път в България оценихме динамиката на HPV статуса за високо, средно и нискорисковите генотипове преди и след приключване на бременността.

3. За пръв път у нас констатирахме взаимовръзката на някои клинично индуцирани промени и рискови фактори свързани с наличие на HPV инфекция по време на бременност и в пуерпералния период.

4. За пръв път в България изследвахме за наличие на вертикална трансмисия на HPV инфекция от майка на новородено.

5. За пръв в България проучихме клиничната значимост на цитологичното и колпоскопско изследване при жени с положителен HPV статус на маточната шийка по време и след приключване на бременността

6. На основание на получените резултати предложихме оптимизирана схема за цервикална онкопрофилактика при бременни с HPV инфекция.

Реализирани за периода научни публикации:

-**С. Георгиев,** В. Златков Проучване честотата на ХПВ инфекция, разпределение на вирусите типове и индивидуалните клинични промени при бременни. Честота на вирусно предаване от майката към плода. Medical брой 6 юни 2014, стр 68-71.

-**С. Георгиев**, Human papilloma virus. Medical брой 10 октомври 2014, стр 74-76.

-**С. Георгиев**, Ал. Савов, П. Костова, В. Златков. ХПВ инфекция и бременост. Medical брой 40 април 2017. стр. 76/77.

-**С. Георгиев**, В. Златков. Оценка на ефективността на SILAUT вагинален крем при лечение на лезии с ХПВ патология. Medical брой 40. стр. 78-80.

-**С. Георгиев**, Ал. Савов, П. Костова, В. Златков ДИАГНОСТИЧНА ЗНАЧИМОСТ НА ЦИТОЛОГИЧНОТО И КОЛПОСКОПСКОТО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ОЦЕНКА ХПВ СТАТУСА НА МАТОЧНАТА ШИЙКА ПРИ БРЕМЕННИ. Акушерство и гинекология 2017. Брой 56, 3‘2017. стр. 4-8.

С. Георгиев, Ал. Савов, П. Костова, В. Златков ОСОБЕНОСТИ НА HPV ИНФЕКЦИЯТА ПРИ БРЕМЕННИ. Акушерство и гинекология 2017. Брой 56, 5‘2017. стр. 41-45.

-

-**Georgiev Sasho**, Savov Alexey, Kostova Petya, Frandeva Bella, Kostov Ivan, Zlatkov Victor. Frequency and characteristics of HPV cervical infection during pregnancy and postpartum and the role of smoking as a predisposing factor. “Доклади на БАН” 2017г. (прието за печат Протокол № 8/26.09.2017).

Участия в научни прояви:

-СИМПОЗИУМ АКУШЕР-ГИНЕКОЛОЗИ

23 април 2016г., ж-л ,,RIU Pravets Resort Golf & SPA", гр. Правец

Поведение на ХПВ вирусите- разбирането днес

Модератор: проф. Д-р Асен Николов, д.м.н.

(ХПВ инфекция и бременност – др. С. Георгиев СБАЛАГ ,,Майчин дом", София)

-ХХ-та ЮБИЛЕЙНА НАЦИОНАЛНА ГИНЕКОЛОГИЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ

Х. ,,Рила", Боровец, 16-18.03.2017.

ПРОУЧВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА ХПВ ИНФЕКЦИЯ И ИНДУЦИРАНИ КЛИНИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ БРЕМЕННИ

(С. Георгиев, А. Савов, В. Златков, София)

Спечелен научн Грант, свързан с темата на дисертационния труд **– № 34-Д по проект № 26–Д към МУ София** и тема на Гранта ,,Проучване честотата на ХПВ инфекция, разпределение на вирусните типове и индуцираните клинични промени при бременни. Честотата на вирусно предаване от майката към плода.''

Оценка от класирането - висока.

9. КНИГОПИС

1. Андонов П. Възможна етиологична връзка между някои ракови заболявания на гениталите и папиломни вируси. Акушерство и гинеколотия. С25, 3, 81-88. 1985.(94.)
2. Грозданов П. Молекулярно епидемиологично проучване на инфекцията с ЧПВ при пациентки с ЦИН. Доктор, БАН, 2011, 192.
3. Доганов А., П. Костова, М. Боянова, Д. Велчева, В. Цончева, К. Майнхард, В. Златков. Пилотно проучване на RNA-HPV тест при диагностиката на епителните изменения на маточната шийка. Акуш и гинекол. 51, 2012, 3, 22-24.
4. Драганов П. А. Ганчева, П. Костова, В.Златков, З. Кълвачев. Молекулярна диагностика на предракови изменения на маточната шийка, причинени от ЧПВ. Transportna medicina, 25: 89-92
5. Драганов П. Молекулярно – вирусологични проучвания на доброкачествени предракови и ракови изменения , причинени от човешки папилома вируси. Дисертация НЦЗПБ. София 2006. (29.)
6. Драганов, П., З. Кълвачев. Молекулярни техники за откриване, идентифициране и анализ на човешки папиломни вируси (HPVs). Акуш. и гинекол., 43: 2004, 6, 38-43.
7. Златков Б.В. Проучване на епитела на маточната шийка при жени с начална бременност. Дисертационен труд за присиждане на научна степен „доктор по медицина”. София 1995 г. (90.)
8. Златков В, Златкова П.К. Профилактика , скрининг и ваксини при предрака и рака на маточната шийка. Българска издателска къща. 2006. (41.)
9. Златков, В. Генитални папиломни инфекции. В: Сексуална медицина. Актуални проблеми, 2014. Под. ред. На: Ч.Славов, Здр. Каменов. Арбилис ООД, 2014, 399-405).
10. Златков, В., А. Доганов, П. Костова, М. Боянова, Д. Велчева, В. Цончева, К. Майнхард. Проучване диагностичната стойност на РНК-базиран HPV тест (NucliSens EasyQ HPV) като прогностичен фактор при диагнозата и лечението на предраковите изменения на маточната шийка. Проект № ТК-55/08, ФНИ, София, 49-54, 2012г..
11. Златков, В., П. Костова. Нова редакция на международната колпоскопска терминология: Барселона – 2002. Акуш и гинекол., 42: 2003, 6, 44-46.

12. Карагьозов И., Дундаров С., Макавеева В., Димова Р. Генитални инфекции, причинени от Човешки папиломен вирус. Медицина и физкултура.София. 1-130, 1989. (95.)
13. Карагьозов, А. Колпоскопски промени на маточната шийка след раждане. Акуш. и гинек., С., 13: 1974, 6, 431 - 434.
14. Карагьозов, И. Колпскопски и хистологично атипичен епител на маточната шийка при жени под 26 годишна възраст. Автореферат на дисертация, Доктор на медицинските науки, София, 1988.
15. Карагьозов, И., В. Макавеева. Койлоцитнадисплазия на маточната шийка. Акуш. и гинек., 23: 1984, 1, 66 - 71.
16. Костова, П., В. Златков.Бетезда системата: нова ревизия на терминологията от 2001 г. Акуш и гинекол., 43: 2004, 4, 52-55.
17. Кълвачев З. (ред.), Драганов П, Ганчева А, Георгиев Д, Димова Д, Матеев Г, Алтънкова И, Тодоров И. Човешки папиломни вируси. DIAGNOSIS PRESS: София, 2006, 148.
18. Кълвачев З., Драганов П., Минков Л., Иванов И., Димова Д., Шишков С. HPVи спонтанни аборти: Резултати от вирусологично проучване. Акушерство и гинекология. Брой 6. 2007. (37)
19. Минчева А. Човешки папилома вируси в предракови и ракови лезии на женските генитали. Молекулно генетични изследвания и диагностика чрез молекулна хибридизация. Автореферат на дисертация. София 1991. (97.)
20. Минчева А., Карагьозов И., Славчев Б., Василев Н., Макавеева В. Доказване на ДНК на ЧПВ в цервикални интраепителни неоплазии и инвазивни карциноми на маточната щийка чрез ДНК- ДНК ин-ситу хибридизация. Акушерство и гинекология., С., 31: 20-22-, 1992.(98.)
21. Минчева А., Славчев Б., Карагьозов И., Василев Н., Макавеева В. Доказване на човешка папиломавирусна ДНК в генитални лезии със или без колпоскопски атипизъм. Акушерство и гинекология. С., 27: 41-44. 1990 (96.)
22. Прендивил Уолтър, Джийн Ритер, Силвио Тати, Лео Туигс. Колпоскопия. Медицина и физкултура 2006. Английско издание на Elsevier Limited, Oxford, United Kigdom 2003. (66.)

23. Цанев, К. Маточна шийка. В: Цитологична диагностика., Под ред.: Ив. Вълков., Мед. и физк., София, 1989, 167 - 207.
24. Ahdoot D, Van Nostrand KM, Nguyen NJ, Tewari DS, Kurasaki T, DiSaia PJ, Rose GS:The effect of route of delivery on regression of abnormal cervical cytologic findings in the postpartum period. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 1116–1120.
25. Amant F, K. Van Calsteren, M. Halaska et al. Gynecologic cancer in pregnancy: Guidelines of an International consensus meeting. Int J Gyn Cancer. 19: 2009, S1, 1-12.
26. Anderson, M. C., J. A. Jordan., A. R. Morse., F. Sharpe. A text and atlas of integrated colposcopy. Chapman & Hall Medical., London, 1992, 1 - 235.
27. Anderson,M. et al. A text and atlas of integrated colposcopy. Chapman & Hall Medical., London, 1992, 1-235.
28. Antoinette A, Brink TP, Snijders PJF et al. HPV testing in cervical screening. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol; 20:253–266, 2005.
29. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG "The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses". J. Virol. 74 (24): 11636–41. (2000).
30. Armbruster-Moraes, E., L. M. Ioshimoto., E. Leao., M. Zugaib. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic women with cervikal lesions. Gynecol. Oncol., 54: 1994, 152 - 158.
31. Ault KA "Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital tract". Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology2006: 1–5.
32. Bakri YN, Akhtar M, al-Amri A. Carcinoma of the cervix in a pregnant woman with negative Pap smears and colposcopic examination. Acta Obstet Gynecol Scand. 1990;69(7-8):657-8.
33. Baldauf JJ, Dreyfus M, Ritter J, Philippe E. Colposcopy and directed biopsy reliability during pregnancy: a cohort study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1995;62:31-6)
34. Baron, Samuel. Medical microbiology (4. ed.). Galveston, Texas: Univ. of Texas Medical Branch. (1996).
35. Baseman J, Koutsky L. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol 32:S16–S24, 2005.

36. Bauer H.M., C.E. Greer, M. Manos - PCR application for genital papillomavirus infections diagnosis. In: Diagnostic molecular pathology. A practical approach. Ed. By C.S. Herrington, J.O.'D. McGee: IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1992, 428-447.
37. Beby-Defaux A, Bourgoin A, Ragot S, Battandier D, Lemasson J, Renaud O, Bouguermouh S, Vienne MML, Agius G. Human papillomavirus infection of the cervix uteri in women attending a Health Examination Center of the French social security. J Med Virol 73:262–268, 2004.
38. Biswas C. et al. Detection of human papillomavirus type 16 early-gene transcription by reverse transcription-PCR is asscociated with abnormal cervical cytology. J. Clin. Microbiol. 35: 1997, 6, 1560-1564.
39. Borzacchiello G. Bovine papillomavirus infections in animals. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Page 673-679. FORMATEX 2007.
40. Bosch F, Qiao Y-L, Castellsague´ X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. Int J Gynecol Obstetrics 94:S8–S21, 2006.
41. Bruni Laia, Mireia Diaz, Xavier Castellsague , Elena Ferrer, F. Xavier Bosch, and Silvia de Sanjose.Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. The Journal of Infectious Diseases 2010; 202(12):1789–1799.
42. Brun-Micaleff E, Coffy A, Rey V, Didelot MN, Combecal J, Doutre S, Daurès JP, Segondy M, Boulle N. Cervical cancer screening by cytology and human papillomavirus testing during pregnancy in French women with poor adhesion to regular cervical screening. J Med Virol. 86(3):536-45. Mar; 2014.
43. Burd E (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 16:1-17.
44. Carter John Venetia Saunders. Virology. Principles and applications. Wiley 2007.
45. Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical cancer: A review. Austr and New Zealand. J. Obstet. And Gynecol. 51:103-108, (2011).
46. Castellsagué Xavier, Teresa Drudis, Maria Paz Cañadas, Anna Goncé, Ramón Ros, José M Pérez, M Jesús Quintana, Jesús Muñoz, Ginesa Albero, Silvia de Sanjosé and F Xavier

Bosch. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. BMC Infectious Diseases, 9:74 doi:10.1186/1471-2334-9-74 2009.

47. Castillo S. Cervical heath awareness month: everything you need to know about preventing and treating cervical cancer. http://www.medicaldaily.com/
48. Chan PK, Chang AR, Tam WH, Cheung JL, Cheng AF Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection: comparison between pregnant women and non-pregnant controls. J Med Virol 67(4):583–588 (2002).
49. Chaturvedi, Anil; Maura L. Gillison "Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer". In Andrew F. Olshan. Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer (1st ed.). New York: Springer. 2010.
50. Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. J Infect. S0163-4453(12)00310-6, (2012).
51. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. APMIS. 118(6-7):422-49, (2010).
52. Chung SM, Son GH, Nam EJ, Kim YH, Kim YT, Park YW, Kwon JY Mode of delivery influences the regression of abnormal cervical cytology. Gynecol Obstet Invest. 2011;72(4):234-8)
53. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. Vaccine. 24 Suppl 3:S3/26-34. (2006).
54. Clifford GM, S. Gallus, R. Herrero et al. Worldwide distribution of HPV types in cytologicalli normal women in the IARC HPV prevalence survey: a pool analysis. Lancet 366: 2005, 991-998.
55. Costa MC, Bornhausen Demarch E, Azulay DR, Périssé AR, Dias MF, Nery JA. Sexually transmitted diseases during pregnancy: a synthesis of particularities. An Bras Dermatol. 85(6):767-82, (2010).
56. Creasman WT.Cancer and pregnancy. Ann N Y Acad Sci. ;943:281-6. 2001.
57. Cuzick, J. et al. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cerviacl screening program. Health Technology Assessment 3, 1999, 1-196.

58. Dallenbach-Hellweg,G., H.Poulsen. Atlas of histopathology of the cervix utery. Springer Verlag, Berlin, 1990, 1-188.
59. de Sanjosé S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B,et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional survey. Lancet Oncol. 2010;11:1048–56.
60. De Villiers, EM., C. Fauquet, TR. Broker, HU. Bernard, H. zur Hausen. Classification of papillomaviruses. Virology. 324: 2004, 1, 17-27.
61. De. Petrilo, A. D., D. E. Townsend., C. P. Morrow., G. M. Lickrish., Ph. J. Di Saia., M. Roy. Colposcopic evaluation of the abnormal Papanicolaou test in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 121: 1975, 4, 441 - 445.
62. Del Amo, J., et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. Sex Transm Infect. 81: 2005, 79-84
63. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. J Clin Virol. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
64. Draganov P1, Todorov S, Todorov I, Karchev T, Kalvatchev Z. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 70(3):469-73. 2006.
65. Economos, K., N. P. Veridiano., I. Delke., M. L. Collando., M. L. Tancer. Abnormal cervical cytology in pregnancy: a 17 years experience. Obstet. Gynecol., 81: 1993, 6, 915 - 918.
66. Ferenczy, A. and Franco, E. L. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol 3, 11–16, (2002).
67. Ferlay, J., et al., GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No.5, Version 2.0. IARC Press, Lyon, 2004.
68. Fife KH, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR, Hansell R. Cancer-associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 174(5):1487–1493, (1996).
69. Franco EL, E. Duarte-Franco, A. Ferenczy. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ. 165: 2001, 739-740.
70. Gajewska M, Marianowski L, Wielgos M, Malejczyk M, Majewski S. The occurrence of genital types of human papillomavirus in normal pregnancy and in pregnant women with

pregestational insulin dependent diabetes mellitus. Neuro Endocrinol Lett 26(6):766–770, (2005).

71. Ganchev, G., V. Zlatkov, P. Kostova. In situ hybridization for human papillomavirus as a method for predicting the evolution of cervical intraepithelial neoplasias in pregnant women. (paper), Anticancer Research, Int. J. of Cancer Res. and Treatment, 15, 1995, 5A, Abstr. No 468, p.1816-1817.
72. Georgiev D., P. Grozdanov, B. Slavchev, I. Karageozyozov, A. Galabov, D. Toncheva. Frequency of HPV types in Bulgarian women with cervical cancer. Int. J. Gynocol. Obstet., 15: 2003 131-137.
73. Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. Virology. 1977 Feb;76(2):569-80.
74. Grozdanov P, V. Zlatkov, G. Ganchev, I. Karagiosov, D. Toncheva, AS Galabov. Detection and genotyping of Human Papillomaviruses in Bulgarian patients for the period of 2009-2010. Biotechnol.&Biotechnol. 25: 2011, 4, Suppl., 85 - 87.
75. Grozdanov P, V. Zlatkov, G. Ganchev, I. Karagiosov, D. Toncheva, AS Galabov. HPV prevalence and type distribution in women with normal or abnormal Pap smear in Bulgaria. J Med Virol. 86: 2014, 11, 1905 -1910.
76. Guerra, B., P. De Simone., C. Mastroianni.,S. Bianchi., C. Zanardi., L. Bovicelli. Human papillomavirus in pregnancy. The Cervix & l. f. g. t., 9: 1991, 81 - 85.
77. Gustafsson L, Sparén P, Gustafsson M, Wilander E, Bergström R, Adami HO. Efficiency of organised and opportunistic cytological screening for cancer in situ of the cervix. Br J Cancer 1995;72:498-505.
78. Hannigan, E. V., Cervical cancer in pregnancy. Clin. Obstet. Gynecol., 33: 1990, 4, 837 - 845.
79. Hatch, K. D., Handbook of colposcopy. Diagnosis and treatment of lower genital tract neoplasia and HPV infection. Little, Brown and Company., Boston, 1989, 1 - 89.
80. Heley S. Human papillomavirus: beware the infection you can't see, Australian family Physician. 32: 2003; 5, 311-315
81. Hellberg D, Nilsson S, Grad A, et al. Behavior of cervical intraepithelial neoplasia associated with various human papillomavirus types. Arch Gynecol Obstet 1993; 252: 119 - 128.

82. Hiller, T., Iftner T., The papilloma virus. In: HPV handbook. Ed. By: W. Pendiville, Ph. Davies. Taylor & Francis. 2004, 11-26.
83. Hong JN, Berggren EK, Campbell SL, Smith JS, Rahangdale L. Abnormal cervical cancer screening in pregnancy and preterm delivery. Paediatr Perinat Epidemiol. Jul;28(4):297-301. 2014.
84. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. Arch Pathol Lab Med. 2003 Aug;127(8):940-5.
85. IARC Monographs. The evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Vol. 64, IARC, IARC Press, Lyon, 1995, 379.
86. Jach R, Galarowicz B, Huras H, Pawlik D, Basta T, Streb J, Wolski H, Ludwin A, Ludwin I Vertical transmission of HPV in pregnancy. A prospective clinical study of HPV-positive pregnant women. . Ginekol Pol. 2014 Sep;85(9):672-6.
87. Kashimura, M., Y. Matsuura., M. Shinohara., S. Baba., K.Obara., H. Fujiwara., H. Sato. Comparative study of cytology and punch biopsy incervical intraepithelial neoplasia during pregnancy. ActaCytol., 35: 1991, 1, 100 - 104.
88. Kim YH, Park JS, Norwitz ER, Park JW, Kim SM, Lee SM, Park CW, Kim BJ, Koo JN, Oh IH, Song YS. Genotypic prevalence of human papillomavirus infection during normal pregnancy: a cross-sectional study. J Obstet Gynaecol Res. 40(1):200-7, Jan; 2014.
89. Kirkup,W., A Singer Colposcopy in the management of the pregnant patient with abnormal cervical cytology. Br. J. Obstet. Gynecol. 87. 1980. 322-325.
90. Kitchener, H. C. United Kingdom colposcopy survey, British Society for colposcopy and cervical pathology. Br. J. Obstet. Gynaecol., 98: 1991, 11, 1112 - 1116.
91. Kiviat, N. B., L. A. Koutsky., D. A. Galloway., D. A. Vernon., M. L. Peterson., P. E. Mc. Elhose., S. J. Pendras., C. E. Stevens., K. K. Holmes., Comparison of southern transfer hybridization and dot filter hybridization for detectio of cervical human papillomavirus infectin with typs 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35. Am. J. Clin. Pathol., 94: 1990, 5, 561 - 565.
92. Koskimaa HM, Waterboer T, Pawlita M, Grénman S, Syrjänen K, Syrjänen S. Human papillomavirus genotypes present in the oral mucosa of newborns and their concordance with maternal cervical human papillomavirus genotypes. J Pediatr. 2012 May;160(5):837-43.

93. Koss, L. G. Current concepts of intraepithelial neoplasia in the uterine cervix. Appl. Pathol., 5: 1987, 7 - 18.
94. Koss, L. G. The Papanicolaou test for cervica cancer detection. A triumph and a tragedy. J. A. M. A., 261: 1989, 5, 737 - 743.
95. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU; Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine.N Engl J Med. 2002 Nov 21;347(21):1645-51.
96. Kreimer, Aimee R.; Clifford, Gary M.; Boyle, Peter; Franceschi, Silvia "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review". Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 14 (2): 467–475.2005.
97. Lee, Eun Hee et al. “Prevalence and Distribution of Human Papillomavirus Infection in Korean Women as Determined by Restriction Fragment Mass Polymorphism Assay.” Journal of Korean Medical Science 27.9 (2012): 1091–1097. PMC. Web. 4 Dec. 2016.
98. Liu P, Xu L, Sun Y, Wang Z The prevalence and risk of human papillomavirus infection in pregnant women. Epidemiol Infect. 142(8):1567-78. Aug , 2014.
99. Llewelyn M.B. Nucleotide sequence determination of DNA. In: Dianostic molecular pathology. A practical approach. Ed by: C.S. Herrington, J.O.’D. McGee IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1992, 428-448.
100. Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. pp. 2231–2264.
101. Lundvall, L. Comparison between abnormal cytology, colposcopy and histopathology during pregnancy. Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 68: 1989, 447 - 452.
102. Malinova M. Human papillomavirus infection and pregnancy Akush Ginekol (Sofiia). 2015;54 Suppl 2:14-8.
103. Marsan, C., J. Jacquemier., P. Sabatier., B. Seradour. Enquete epidemiologique sur les lesions virales et CIN du col: etude multicentrique retrospective dans des centres publiques et prives. Arch. Anat. Cytol. Path., 38: 1990, 5 - 6, 215 - 225.

104. Martinelli M., A. Zappa, S. Bianchi, E. Frati, D. Colzani, A. Amendola,2 and E. Tanzi. Human papillomavirus (HPV) infection and genotype frequency in the oral mucosa of newborns in Milan, Italy. Clinical Microbiology and Infection European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 18, E197–E199. 2012.

105. Mayrand M.-H. et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. J. Clin. Microbiol, 38: 2000, 3388-3393.

106. Medeiros LR, Ethur AB, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, Mylius LC Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. Cad Saude Publica, 21:1006-1015, (2005).

107. Meisels, A., M. C. Cardero., C. Morin. Cervical condyloma planum. Clin. Derm., 3: ,1985, 4, 114 - 123.

108. Merckx M, Liesbeth WV, Arbyn M, Meys J, Weyers S, Temmerman M, Vanden Broeck D. Transmission of carcinogenic human papillomavirus types from mother to child: a meta-analysis of published studies. Eur J Cancer Prev. 2013 May;22(3):277-85.

109. Modern Colposcopy: Textbook and Atlas Second edition 1990.

110. Morrison EA, Gammon MD, Goldberg GL, Vermund SH, Burk RD. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. Int J Gynaecol Obstet 54(2):125–130, (1996).

111. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. JAMA 2001;285:2995-3002.

112. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol 19(1–2):1–5, (2000).

113. Munoz, N., F. X. Bosch., K. V. Shah., A. Meheus., (Eds). The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. (I. A. R. C Scientific Publications No. 119), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1992, 1 - 288.

114. Muñoz, N; Bosch, F. X.; De Sanjosé, S; Herrero, R; Castellsagué, X; Shah, K. V.; Snijders, P. J.; Meijer, C. J.; "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer", International Agency for Research on Cancer Multicenter

Cervical Cancer Study Group (2003), The New England Journal of Medicine348 (6): 518–27.

115. Nahhas, W. A., M. A. Clark., M. Brown. 'Abnormal' Papanicolaou smears and colpscopy in pregnancy: ante- and post-partum findings. Int. Gynecol. Cancer., 3: 1993, 239 - 244.

116. Nathanson, Neal. Viral pathogenesis. Lippincott-Raven. p. 1997.

117. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical / vaginal cytological diagnoses. J. A. M. A., 262: 1989, 7, 931 - 934.

118. Nayel MA, Shaker OG, Hosni AN, Hosni HN, Khalifa SE, Shazly AF. Human papillomavirus (HPV) in Egyptian females: study by cytology, histopathology, colposcopy and molecular diagnosis of high risk types.Malays J Pathol. 2016 Dec;38(3):257-266.

119. Nobbenhuis M, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC, Rozendaal L, Bezemer PD, Voorhorst FJ et al High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum. Br J Cancer 87:75–80, (2002).

120. Núñez-Troconis J, Delgado M, González J, Velásquez J, Mindiola R, Whitby D, Conde B, Munroe DJ. Human papillomavirus falsepositive cytological diagnosis in lowg rade squamous intraepithelial lesion. Invest Clin. 2009 Dec;50(4):447-54.

121. Nuovo, G. J. Human papillomavirus DNA in genital tract lesion histologically negative for condylomata. Am. J. Surg. Pathol., 14: 1990, 7, 643 - 651.

122. Ortiz, R., M. Newton. Colposcopy in the management of abnormal cervical smears in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 109: 1971, 1, 46 - 49.

123. Ostergard, D. R. The effect of pregnancy on the cervical squamocolumnar junction in patients with abnormal cervical cytology. Am. J. Obstet. Gynecol., 134: 1979, 7, 759 - 760.

124. Ostergard, D. R., R. K. Nieberg. Evaluation of abnormal cervical cytology during pregnancy with colposcopy. Am. J. Obstet. Gynecol., 134: 1979, 7, 756 - 758. 83 стр

125. Papanicolaou G. New Cancer Diagnosis," the Third Race Betterment Conference in Battle Creek, MI, 1928.

126. Parikh S, Brennan P, Boffetta P. Meta-analysis of social inequality and the risk of cervical cancer. Int J Cancer 105: 687–69, 2003.

127. Park Hyun, Si Won Lee, In Ho Lee, Hyun Mee Ryu, A Reum Cho, Young Soon Kang, Sung Ran Hong, Sung Soon Kim, Seok Ju Seong, Son Moon Shin and Tae Jin Kim. Rate of

vertical transmission of human papillomavirus from mothers to infants: Relationship between infection rate and mode of delivery.. Virology Journal, 9:80 2012.

128. Peroni,M. Colposcopia e fisiopatologia cervico-vaginale. Testo atlante. Poli Industria Chimica., Milano, 1991, 1-235.

129. Peter L. Stern and Margaret A. Stanley. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. Biology and Immunology. Oxford medical publication 1994.

130. Petry K, Luyten A, Justus A, Iftner A, Strehlke S, Reinecke-Luthge A, Grunwald E, Schulze-Rath R, Iftner T.. Prevalence of high-risk HPV types and associated genital diseases in women born in 1988/89 or 1983/84— Results of WOLVES, a population based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. BMC Infect Dis 13:135, 2013.

131. Philippe,E., C.Charpin. Pathologie gynecologique et obstetricale., Masson, Paris, 1992, 38-39.

132. Raffaella Ghittoni, Rosita Accardi, Susanna Chiocca and Massimo Tommasino Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. ecancer 9 526 2015.

133. Rahul Dixit, Chintan Bhavsar, and Y. S. Marfatia. Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. Indian J Sex Transm DisJan-Jun; 32(1): 50–52, . 2011.

134. Ramondetta L. NCI-designated cancer centers urge HPV vaccination for the prevention of cancer. http://hpv-vaccines.net

135. Reid R. M., Greenberg D., Lorincz., Jenson A. B., Laverty M., Husain Y. Daoud., Zado B., White T., Cantor D., Goidrath M. Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection. Am. J. Obstet. Gynecol., 164: 6, 1461 – 1471, 1991.

136. Resnick, R. et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. J. Natl. Cancer Inst., 82: 1990, 1477-1484.

137. Richard E. Shope and E. Weston Hurst. "Infectious Papillomatosis of Rabbits." J Exp Med. 1933 Oct 31; 58(5): 607–624.

138. Richart R.. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. Obstet. Gynecol., 75: 131-132, 1990.

139. Robertson, A. J., J. M. Anderson., J. S. Beck., R. A. Burnett., S. R. Howatson., F. D. Lee., A. M. Lessells., K. M. Mc Laren., S. M. Moss., J. G. Simpson., G. D. Smith., H. B. Tavadia., F. Walker. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy speciments. J. Clin. Pathol., 42: 1989, 231 - 238.

140. Rombaldi Renato L, Eduardo P Serafini, Jovana Mandelli, Edineia Zimmermann and Kamille P Losquiavo. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. Virology Journal, 5:106 doi:10.1186/1743-422X-5-106. 2008.

141. Roy, M., A. Meisels., M. Fortier., C. Morin., M. Casas-Cordero., C. G. Robitaille. Vaginal condylomata: a human papillomavirus infection. Clin. Obstet. Gynecol., 24: 1981, 2, 461 - 483.

142. Roy, M., C. Morin., M. Casas-Cordero., Al. Meisels. Human papillomavirus and cervical lesions. Clin. Obstet. Gynecol., 26: 1983, 4, 949 - 967.

143. Salcedo MM, Damin AP, Agnes G, Pessini SA, Beitune PE, Alexandre CO, Schmeler KM, da Silveira GP. Prevalence of human papillomavirus infection in pregnant versus non-pregnant women in Brazil. Arch Gynecol Obstet. 2015 Dec;292(6):1273-8.

144. Schiffman, M. H., H. M. Bauer., A. T. Lorincz., M. M. Manos., J. C. Byrne., A. G. Glass., D. M. Cadell., P. M. Howley. Comparison of southern blot hybridization and polymerase chain reaction method for the detection of human papillomavirus DNA. J. Clin. Microbiol., 29: 1991, 3, 573 - 577.

145. Schiller JT, Day PM, Kines RC.Current understanding of the mechanism of HPV infection. Gynecol Oncol. 2010 Jun;118(1 Suppl):S12-7.

146. Scott ME, Shvetsov YB, Thompson PJ, Hernandez BY, Zhu X, Wilkens LR, Killeen J, Vo DD, Moscicki AB, Goodman MT. Cervical cytokines and clearance of incident human papillomavirus infection: Hawaii HPV cohort study. Int J Cancer. 2013 Sep 1;133(5):1187-96.

147. Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in yong children. Semin Pediatr Infect Dis. 16(4):306-16, (2005).

148. Siristatidis C, Vitoratos N, Michailidis E, Syciotis C, Panagiotopoulos N, Kassanos D, Salamalekis E: The role of the mode of delivery in the alteration of intrapartum pathological cervical cytologic findings during the postpartum period. Eur J Gynaecol Oncol 2002; 23: 358–360.

149. Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A The Prevalence of Human Papillomavirus between the Neonates and Their Mothers Biomed Res Int. 2015;2015:126417.

150. Song F,Wang Y,Wang T. Natural evolution and clinical management of cervical Intraepithelial neoplasia during pregnancy and postpartum. Int J Gynecol Obstet; 107: S345, 2009.

151. Sowjanya Pavani, Meenkashi Jain, Usha Rani Poli, S Padma, Manik Das, Keerti V Shah, BN Rao, Radha Rama Devi, Patti E Gravitt and Gayatri Ramakrishnar.Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. BMC Infectious Diseases20055:116.

152. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.

153. Stenvall H, Wikstro¨m I, Wilander E. High prevalence of oncogenic human papilloma virus in women not attending organized cytological screening. Acta Derm Venereol 87:243–245, 2007.

154. Stern, P. L., M. A. Stanley., (Eds.). Human papillomaviruses and cervical cancer. Biology and immunology. Oxford University Press, New York, 1994, 1 - 226.

155. Strinic T, Bukovic D, Karelovic D, Bojic L, Stipic I: The effect of delivery on regression of abnormal cervical cytologic findings. Coll Antropol 2002; 26: 577–582.

156. Syrjänen KJ. Human papillomavirus lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. Obstet Gynecol. Nov;62(5):617-24. 1983.

157. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. APMIS. 118(6-7):494-509, (2010).

158. Syrjannen, K., S. Pyrhonen. Immunoperoxydase demonstration of HPV in dysplastic lesions of uterine cervix. Arch. Gynec., 233: 1982,1, 53 - 61.

159. Talebian, F., A. Shayn., B. A. Krumholz., V. S. Palladino., L. I. Mann. Colposcopic evaluation of patientts with abnormal cervical cytology. Obstet. Gynecol., 49: 1977, 6, 670 - 674.

160. Teixeira LO, Amaral SC, Finger-Jardim F1, da Hora VP, Gonçalves CV, Soares MA, de Martinez AM Frequency of Human Papillomavirus in the placenta, in the colostrum and in the umbilical cord blood. Rev Bras Ginecol Obstet. 2015 May;37(5):203-7.

161. The International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. The 14thWorld Congress of Cervical Pathology and Colposcopy July 5, 2011. http://www.ifcpc.org/images/docs/nomenclature7-11.pdf

162. Tidy, J. A., W. P. Mason., P. J. Farrell. A new and sensitive method of screening for human papillomavirus infection. Obstet. Gynecol., 74: 1989, 3, part 1, 410 - 414.

163. Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of mucosal human papillomavirus (HPV) infection and HPV -associated diseases. Public Health Genomics. 2009;12(5–6):291–307.)

164. Uribarren-Berrueta O, Sánchez-Corona J, Montoya-Fuentes H, Trujillo-Hernández B, Vásquez C Presence of HPV DNA in placenta and cervix of pregnant Mexican women. Arch Gynecol Obstet. 285(1):55-60, (2012).

165. Villa L. et al. Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand polymorphysm analysis. J. Infect. Dis. 168: 1993, 610-617.

166. Voidăzan Septimiu, Morariu Silviu-Horia* , Căpâlnă Mihai, Mărginean Claudiu, Dobreanu Minodora. The Prevalence and Distribution of High Risk Human Papillomavirus Genotypes in Patients with Dysplastic Lesions: a Population Study Acta Medica Marisiensis 2015;61(4):314-319.

167. Von Krogh, G., E. Rylander., (Eds.). Genitoanal papilloma virus infection. A survey for the clinician. Conpharm A. B., Karlstad, 1989, 9 - 329.

168. Weyn C, Thomas D, Jani J, Guizani M, Donner C, Van Rysselberge M, Hans C, Bossens M, Englert Y, Fontaine V. Evidence of human papillomavirus in the placenta. J Infect Dis. 203(3):341-3, (2011).

169. WHO, Bulgaria.Human Papillomavirus and Related Cancers; Summary Report Update, January 29, 2010.

170. Yoshida K, Furumoto H, Abe A, Kato T, Nishimura M, Kuwahara A, Maeda K, Matsuzaki T, Irahara M.The possibility of vertical transmission of human papillomavirus through maternal milk. Obstet Gynaecol.2011Aug;31(6):503-6.

171. Yue He, Yu-Mei Wu, Qun Zhao, Tong Wang, Fang Song and Li Zhu. High-risk human papilloma virus management in pregnancy with cervical intraepithelial neoplasia during

pregnancy and postpartum in China. J. Obstet. Gynaecol. Res. Vol. 40, No. 2: 538–544, February 2014.

172. Zoa Assoumou S, Ndjoyi Mbiguino A, Mabika Mabika B, Nguizi Ogoula S, El Mzibri M, Khattabi A, Ennaji MM. (Human papillomavirus genotypes distribution among Gabonese women with normal cytology and cervical abnormalities. Infect Agent Cancer. 2016 Jan 15;11:2. doi: 10.1186/s13027-016-0046-0.

173. Zuo Z, Goel S, Carter JE. Association of cervical cytology and HPV DNA status during pregnancy with placental abnormalities and preterm birth. Am J Clin Pathol. 136(2):260-5, (2011).

174. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dörries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. Int J Cancer. 1974 May 15;13(5):657-64.

175. Златков, В., П. Костова. Профилактика, скрининг и ваксини при предрака и рака на маточната шийка. Българска издателска къща, София, 1996, 149.

176. Dodin-Dewailly, S, J.Brisson, M.Roy., M. Fortier., C. Bouchard. Cytologie cervico – vaginale et condylomes. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 20: 1991, 519-524.

177. Карагьозов И., Карагьозов А. Основи на колпоскопията. Издателство „Медицина и физкултура” 1983.

10.ПРИЛОЖЕНИЯ

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ДНК АНАЛИЗ

„Проучване честотата на HPV инфекция, разпределението на вирусните типове и индуцираните клинични промени при бременни. Честота на вирусно предаване от майката към плода."

Име:_____

Дата на раждане: _____ Дата на посещение: _____

Телефон/ GSM: _____ e-mail: _____

Получих консултация с подробни разяснения относно всички вълнуващи ме въпроси и давам биологичен материал:
за изолиране на ДНК/ РНК и извършване на ДНК анализ по повод:
_____

Процедурата по вземане на материала носи допустимия минимален риск, за който съм информиран(а).

Давам съгласие да се вземат биологични проби от моите непълнолетни деца за ДНК анализ на горепосоченото заболяване.

Име:	*дата на раждане:*	*пол*
1. _____	_____	___
2. _____	_____	___

Информиран съм, че:

- Участието ми в настоящото изследване е напълно доброволно.

- Съгласието или отказът ми да участвам в изследването по никакъв начин няма да повлияе на лечението ми.

- Имам право да прекратя участието си в изследването по всяко време, като информирам писмено водещия изследовател на проекта.

- Биологичният материал (цервикален секрет, влагалищен секрет, секрет от езика, вътрешната страна на бузите, твърдото небце и аногенитална област) ще се използва за извличане на ДНК, която ще се използва в ДНК изследването. ДНК-пробата ще бъде обозначена с код, който да гарантира анонимността ми. Моето име и историята на заболяването ми ще бъдат достъпни само за насочващия ми лекар и за изследователския екип на проекта, които носят отговорност за запазване на пълна конфиденциалност.

- Разбирам, че ДНК анализът може да даде информация, която би била от полза за диагностиката на моето заболяване (или заболяването на член от моето семейство), като получената информация ще ми бъде предоставена лично в писмен вид.

- Резултатите ми са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след моето писмено съгласие.

- **Беше ми изяснено, че неизползваното количество ДНК ще бъде съхранявано и използвано за нуждите на качествен контрол, за необходими контролни анализи. Изразявам съгласието си, взетата от мен проба, както и резултатите от анализите да бъдат използвани за научни цели и разработки и публикувани в научни списания, при условие че се изпълнява лекарската тайна и данните са защитени.**

Дата:_____ Подпис:_____

ГЕНИКА
ГЕНЕТИЧНА МЕДИКО-ДИАГНОСТИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ

ЧАСТ ОТ

ГЕНОМЕН ЦЕНТЪР
БЪЛГАРИЯ

Лабораторно изследване

Дата
Пациент
(данни от ЛИС)



756148729

Материал за изследване:	Тампон
Метод на изследване:	Качествен ДНК анализ - PCR/real-time PCR

Резултати от ДНК анализ:

Показател	Резултат
Човешки папилома вирус – високо/средно/нискорискови типове – детекция и генотипиране на 33 типа	
Високорискови типове	
HPV 16	
HPV 18	
HPV 31	
HPV 33	
HPV 35	
HPV 39	
HPV 45	
HPV 51	
HPV 52	
HPV 56	
HPV 58	
HPV 59	
HPV 66/68	
Среднорискови типове	
HPV 53	
HPV 73	
HPV 81	
HPV 82	
Нискорискови типове	
HPV 6	
HPV 11	
HPV 40/61	
HPV 42	
HPV 43/44	
HPV 54/55	
HPV 70	
HPV 57/71	
HPV 72	
HPV 84/26	

- Край на справката -

СБАЛАГ " МАЙЧИН ДОМ " ЕАД

ФИШ ЗА ЦИТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

Пациентка _____ год._____

Адрес _____

Изпратена от кабинет/клиника/болница:_____

Амбулаторен № _____ Порцио № _____ Церв. канал № _____

ПРМ: _____ Бременност /срок/:_____ Менопауза от /срок/: _____

Клинични симптоми: _____

Досегашни резултати от цитонамазка №: _____

Досегашни резултати от хистология №: _____

Колпоскопия  Диагноза_____

Хормонотерапия ☐ да ☐ не вид_____ курсове_____

Лъчетерапия ☐ да ☐ не вид_____ курсове_____

Вътрематочен песар: ☐ да ☐ не

Терапия на маточната шийка: ☐ да ☐ не

☐ Електро ☐ Термо ☐ Крио ☐ Лазер колко пъти:_____ кога:_____

Конизация на м. шийка /кога/_____ Хист. диагноза № _____

дата _____ Лекуващ лекар:_____

/име, подпис/

СБАЛАГ " МАЙЧИН ДОМ " ЕАД

Цитоморфологична лаборатория

До _____

/кабинет, клиника, болница/

Амб. № _____

РЕЗУЛТАТ № _____

от цитологично изследване на материал от порцио № _____ церв. канал № _____

на пациентка _____ год. _____

ГРУПА ПО ПАПАНИКОЛАУ: ☐ I ☐ II ☐ IIIA ☐ IIIБ ☐ IV ☐ V

БЕТЕЗДА ТЕРМИНОЛОГИЧНА СИСТЕМА:

АДЕКВАТНОСТ НА ЦИТОНАМАЗКАТА:

☐ А. Задоволителна

☐ Б. Задоволителна, но ограничена от: ___ ☐ кръв ☐ микроорганизми ☐ левкоцити

☐ В. Незадоволителна поради: _____ ☐ лоша фиксация ☐ липса на плоски клетки

☐ липса на ендоцервикални елементи:

☐ цилиндрични клетки, слуз

☐ метапластични клетки

причини за Б и В:

КАТЕГОРИИ:

А. ☐ *Клетки в норма*

Б. ☐ *Клетъчни промени свързани с:*

☐ трихомони ☐ кандида ☐ "clue cels" ☐ коки ☐ бактерии ☐ HSV ☐ CMV

☐ атрофия ☐ радиация ☐ маточни песари ☐ други_____

В. Плоскоклетъчни Интраепителни Лезии /ПИЛ/:

☐ Атипични с неясна степен ☐ Нискостепенни: ☐ с HPV ☐ без HPV

☐ Високостепенни ПИЛ ☐ Плоскоклетъчен карцином

Г. Клетъчни промени в жлезните клетки:

☐ Ендометриални при жени в менопауза ☐ Атипични, с неясна степен

☐ Аденокарцином - ☐ ендоцервикален ☐ ендометриален ☐ извънматочен

☐ с неясен произход

Д. ☐ *Други малигнени тумори*

Допълнително описание _____

Препоръки: ☐ колпоскопия ☐ биопсия ☐ цервикално абразио ☐ сепарирано абразио

Следваща намазка: ☐ след 1м. ☐ 3м. ☐ 6м. ☐ 12м. друг срок: _____

*Дата*___ _____ *Цитолог:* _____

Патоморфологична
лаборатория при
СБАЛАГ "МАЙЧИН ДОМ" ЕАД
гр. София

До .....
клиника, сектор, етаж

РЕЗУЛТАТ

от хистопатологично изследване

№.....

Хистопатологичното изследване на изпратения от Вас материал,

взет от ..... на пациентката
орган

..... год.

с клинична диагноза .....

получен на ..... показа:

Хистологична находка и диагноза:

Дата: .....

Лекар: .....
/собствено и фамилно име/

Изпраща
.....
/клиника, сектор, кабинет/

До патоморфологична
лаборатория при
СБАЛАГ "МАЙЧИН ДОМ" ЕАД
гр. София

ИСКАНЕ ЗА ПАТОЛОГО-ХИСТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

на материал взет от ..... год.
собствено, бащино, фамилно име

адрес ..... професия .....
град, улица, №

материалът е взет от ..... чрез .....
орган

фиксиран в ..... Ист. заб. № .....

Кратки клинични данни: последна редовна менструация и т. н.

Клинична диагноза:

Проведено лечение (хормони, рентгенова терапия .....
какво, кога, по каква схема

Предишни биопсични изследвания или операции, във връзка с настоящето
заболяване .....
кога, къде, резултат

.....

Дата: .....

Лекар: .....
подпис /собствено, фамилно име/

Патоморфологична
лаборатория при
СБАЛАГ "МАЙЧИН ДОМ" ЕАД
гр. София

До .....
клиника, сектор, етаж

РЕЗУЛТАТ

от хистопатологично изследване

№.....

Хистопатологичното изследване на изпратения от Вас материал,

взет от ..... на пациентката
орган

.....

с клинична диагноза .....

получен на ..... показа:

Хистологична находка:

Диагноза:

Дата: .....

Лекар: .....
подпис /собствено и фамилно име/

Упътване:

1. Вписвайте елементарните клинични данни, имащи значение за морфолога: първи ден на последната менструация, продължителност на евентуална аменорея, характер и продължителност на евентуално кръвотечение.

2. Количество и особености на материала.

3. Специални въпроси към патолога. При оперативен материал - кой точно орган (тръба, яйчник) или зона да бъдат изследвани.

4. Фиксатор - 10% формалин или 70% алкохол - в отношение 10 пъти повече от материала. В банката (по възможност с филтърна хартия на дъното) първо се поставя фиксатора и после материала.

5. Банката се затваря стегнато, етикетира и подписва с името на пациентката.

6. Материалът се предава лично на лаборант.

Дата на въвеждане: _ _._ _._ _ _ _ Изследвано лице Код №

СПЕЦИАЛИЗИРАНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

ЦИТОЛОГИЧЕН РЕЗУЛТАТ [4]

Група по Папаниколау (Pap): ☐ **I** [4.1] / ☐ **II** [4.2] / ☐ **IIIA** [4.3] / ☐ **IIIБ** [4.4] / ☐ **IV** [4.5] / ☐ **V** [4.6]

Допълнително описание:.....

VIA (ВИЗУАЛНА ИНСПЕКЦИЯ С ОЦЕТНА КИСЕЛИНА) [5]

☐ тест негативен [5.1] ☐ тест позитивен [5.2] ☐ съмнение за карцином [5.3]

VILI (ВИЗУАЛНА ИНСПЕКЦИЯ С ЛУГОЛОВ РАЗТВОР) [6]

☐ тест негативен [6.1] ☐ тест позитивен [6.2] ☐ съмнение за карцином [6.3]

КОЛПОСКОПИЯ [7]

Находка [7.0]:
☐ нормална [7.0.1] / ☐ лек атипизъм [7.0.2] / ☐ тежък атипизъм [7.0.3] / ☐ карцином [7.0.4]

Особености [7.1]:
- ☐ *Невидима ГПЦЕ* [7.1.1]
  - ☐ видима лезия [7.1.1.1]
  - ☐ невидима лезия [7.1.1.2]
- ☐ *Видима ГПЦЕ* [7.1.2]
  - ☐ видима лезия [7.1.2.1]
  - ☐ невидима лезия [7.1.2.2]

Последваща терапия [7.2]:
- ☐ не [7.2.1]
- ☐ да [7.2.2]:
  - ☐ електрокоагулация [7.2.2.1]
  - ☐ конизация [7.2.2.2]
  - ☐ LHT [7.2.2.3]
  - ☐ LHR [7.2.2.4]
  - ☐ друга [7.2.2.5]

ХИСТОЛОГИЧЕН РЕЗУЛТАТ [8]

Биопсия [8.1]:
(№...../.....)
☐ Нормален епител [8.1.1]
☐ Абнормен епител [8.1.2]
☐ Хронично възпаление [8.1.3]
☐ с HPV/койлоцити [8.1.4]
☐ Лека дисплазия [8.1.5]
☐ Умерена дисплазия [8.1.6]
☐ Тежка дисплазия [8.1.7]
☐ CIS [8.1.8]
☐ Ca (плоскоклетъчен) [8.1.9] стадий:.....
☐ Ca (аденокарцином) [8.1.10]

Допълнително описание:.....

Окончателен след лечение [8.2]:
(№...../.....)
☐ Нормален епител [8.2.1]
☐ Абнормен епител [8.2.2]
☐ Хронично възпаление [8.2.3]
☐ с HPV/койлоцити [8.2.4]
☐ Лека дисплазия [8.2.5]
☐ Умерена дисплазия [8.2.6]
☐ Тежка дисплазия [8.2.7]
☐ CIS [8.2.8]
☐ Ca (плоскоклетъчен) [8.2.9] стадий:.....
☐ Ca (аденокарцином) [8.2.10]

Допълнително описание:.....

РАБОТЕН ФИШ

Дата на въвеждане: _ _._ _._ _ _ _ Изследвано лице Код № | | | | | |

ЛИЧНИ ДАННИ НА ИЗСЛЕДВАНОТО ЛИЦЕ:
Име: ЕГН:
Адрес:
Телефон:
СОЦИАЛНА АНАМНЕЗА [1]
Семейно положение [1.1]: ☐ неомъжена [1.1.1] / ☐ омъжена [1.1.2] / ☐ разведена [1.1.3] / ☐ вдовица [1.1.4] / ☐ разделена [1.1.5] / ☐ друго [1.1.6].....
Образование [1.2]: ☐ без образование[1.2.1] / ☐ начално[1.2.2] / ☐ основно[1.2.3] / ☐ средно[1.2.4] / ☐ средно-специално[1.2.5] / ☐ полувисше[1.2.6] / ☐ висше[1.2.7] / ☐ друго[1.2.8].....
Социална група [1.3]: ☐ безработна [1.3.1] / ☐ работничка [1.3.2] / ☐ земеделка [1.3.3] / ☐ служаща [1.3.4] / ☐ свободна професия [1.3.5] / ☐ домакиня [1.3.6] / ☐ учаща [1.3.7] / ☐ пенсионерка [1.3.8] / ☐ друго [1.3.9].....
МЕНСТРУАЛНА, СЕКСУАЛНА И РЕПРОДУКТИВНА ФУНКЦИИ; АНТИКОНЦЕПЦИЯ [2]
Менструация [2.1]: ☐ менархе на ..... години [2.1.1] / ☐ в менопауза от ..... години [2.1.2] ☐ ПРМ .....[2.1.3] Менструален цикъл през ..... дни [2.1.4], с продължителност ..... дни [2.1.5] Особености: ☐ не [2.1.6] / ☐ да [2.1.7] .....
Репродуктивна функция [2.2]: брой бременности: ..... [2.2.1]; брой аборти: ..... [2.2.2]; брой раждания: ..... [2.2.3], от тях по вагинален път:.....[2.2.3.1] / от тях по вагинален път с оперативна намеса.....[2.2.3.2] / чрез цезарово сечение.....[2.2.3.3]
Промискуитет [2.3]: начало: ..... години [2.3.1]; брой: .....[2.3.2] / ☐ отказ от отговор [2.3.3]
Антиконцепция [2.4]: ☐ не [2.4.1] / ☐ да [2.4.2]; ако да – най-често използвания метод: ☐ презерватив [2.4.2.1] / ☐ таблетки [2.4.2.2] / ☐ спирала [2.4.2.3] / ☐ прекъснат полов акт [2.4.2.4] / ☐ календарен метод [2.4.2.5] / ☐ друг [2.4.2.6] ..... продължителност на прилагане [2.4.3]: ..... години [2.4.3.1]; ..... месеци [2.4.3.2]
СПЕЦИАЛИЗИРАНА АНАМНЕЗА [3]
Минали сексуално-трансмисивни заболявания [3.1]: ☐ не [3.1.1] / ☐ да [3.1.2] / ☐ не зная [3.1.3]; Ако да, посочете какви:..... Имали ли сте генитални брадавици/кондиломи? [3.2]: ☐ не[3.2.1] / ☐ да [3.2.2] / ☐ не зная [3.2.3] Имали ли сте партньор с брадавици/кондиломи? [3.3]: ☐ не [3.3.1] / ☐ да [3.3.2] / ☐ не зная [3.3.3]
Минали заболявания на маточната шийка: *Имали ли сте разкъсване на маточната шийка при раждане* [3.4]: ☐ не [3.4.1] / ☐ да [3.4.2] / ☐ не зная [3.4.3], ако да, било ли е възстановено: ☐ не [3.4.2.1] / ☐ да [3.4.2.2] / ☐ не зная [3.4.2.3] *Имали ли сте раничка на маточната шийка* [3.5]: ☐ не [3.5.1] / ☐ да [3.5.2] / ☐ не зная [3.5.3], ако да, от колко време: ..... [3.5.2.1] *Провеждали ли сте лечение* [3.6]: ☐ не [3.6.1] / ☐ да [3.6.2] / ☐ не зная [3.6.3], ако да, с какъв метод: ☐ коагулация с ел. ток/лазер [3.6.2.1] / ☐ конизация [3.6.2.2] / ☐ друг [3.6.2.3].....
Предишни резултати [3.7]: хистология .....[3.7.1] HPV типизиране .....[3.7.2] Друго.....[3.7.3]