

P R A C E O R Y G I N A L N E
ginekologia

Genotypowanie onkogennych wirusów brodawczaka ludzkiego u kobiet z rozpoznaniem HG SIL

Genotyping of oncogenic human papilloma viruses in women with HG SIL diagnosis

Kędzia Witold^{1,2}, Pruski Dominik^{1,2}, Józefiak Agata², Rokita Wojciech³, Spaczyński Marek¹

¹ Klinika Onkologii Ginekologicznej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu

³ Oddział Położnictwa i Ginekologii, Szpital Kielecki NZOZ Św. Aleksandra, Kielce.

Streszczenie

Wstęp: Wraz z rozwojem profilaktyki pierwotnej raka szyjki macicy, czyli szczepień przeciwko wybranym, onkogennym typom HPV, rośnie znaczenie badań epidemiologicznych rozpowszechnienia poszczególnych typów wirusów brodawczaka ludzkiego. Częstość zakażenia HPV zmienia się w zależności od lokalizacji geograficznej danej populacji. Skuteczność profilaktyki pierwotnej skierowanej przeciwko HPV 16, 18 w kontekście obniżania zachorowalności na raka szyjki macicy, będzie zależała m. in. od rozpowszechnienia tych typów w danej populacji oraz wirusów zbliżonych antygenowo, które w części obejmie odporność krzyżowa.

Cel pracy: Identyfikacja najczęściej występujących, onkogennych typów HPV u kobiet z rozpoznaniem HG SIL pochodzących z Polski Środkowo-Zachodniej celem oceny zasadności rozwoju profilaktyki pierwotnej.

Materiał: Na potrzeby testu molekularnego identyfikującego obecność DNA 13 typów wirusów onkogennych pobrano wymazy szczoteczką cyto-brush od 76 kobiet z rozpoznaniem CIN 2 lub CIN 3 (HG SIL). Pacjentki zakwalifikowane do badań były diagnozowane w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu. Pacjentki pochodziły z centralnej i zachodniej części Polski.

Metoda: Każdy materiał komórkowy, w którym za pomocą metody Amplicor HPV (Roche Diagnostics) identyfikowano obecność DNA HPV onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego był kolejno poddawany genotypowaniu molekularnemu za pomocą testu Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics).

Wyniki: Do pięciu najczęściej występujących onkogennych typów HPV zaliczono w kolejności wykrywania: 16, 33, 18, 31, 56. Razem te pięć typów wirusa stanowiło 75,86% (88/116) wszystkich wykrytych wirusów brodawczaka ludzkiego.

Wnioski:

1. Do grupy najczęściej występujących genotypów HPV, u kobiet z HG SIL, mieszkających w Polsce Środkowo-Zachodniej należą kolejno: HPV 16, HPV 33, HPV 18, HPV 31, HPV 56.
2. Dwa typy HPV 16 i 18 przeciwko, którym skierowane są szczepienia profilaktyczne, należą do grupy trzech genotypów HPV najczęściej identyfikowanych w zmianach CIN 2, CIN 3, rozpoznawanych u kobiet w Polsce Środkowo-Zachodniej.

Słowa kluczowe: **genotyp HPV / epidemiologia HPV / LG SIL / rak szyjki macicy / profilaktyka pierwotna /**

Adres do korespondencji:

Witold Kędzia

Klinika Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu

60-535 Poznań, ul. Polna 33

tel. 61 841 93 30; fax 61 841 94 65

e-mail: onko@gpsk.am.poznan.pl

Otrzymano: 10.06.2010
Zaakceptowano do druku: 20.09.2010

Abstract

Introduction: Development of primary prevention of cervical cancer, in other words a vaccination against selected, oncogenic HPV types, entails an increasing importance of epidemiological studies and prevalence of various types of human papilloma virus. The incidence of HPV varies depending on the geographic location of the population. The effectiveness of primary prevention against HPV 16, 18, in the context of reducing the incidence of cervical cancer will depend, among others, on the prevalence of these types in the population and virus-like antigens, which are partially cross-resistant.

Objective: Identification of the most frequent, oncogenic HPV types in women with HG SIL diagnosis from Central and Western Poland to assess the merits of the development of primary prevention.

Material: For the purpose of molecular tests identifying the presence of 13 DNA oncogenic virus types, swabs were taken with the cyto-brush from 76 women diagnosed with CIN 2 or CIN 3 (HG SIL). Patients eligible for the study were diagnosed at the Laboratory of Pathophysiology of Uterine Cervix, Gynecology and Obstetrics Clinical Hospital of Karol Marcinkowski University of Medical Sciences. Patients came from Central and Western parts of Poland.

Method: Cell material in which the method of Amplicor HPV (Roche Diagnostics) identified the presence of DNA of oncogenic HPV types was in each case subsequently subjected to genotyping using the molecular test - Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics).

Results: Five most common oncogenic HPV types in order of detection included: 16, 33, 18, 31, 56. Together, these five types of virus comprised 75,86% (88/116) of all detected HPV types.

Conclusions:

1. In women from Central and Western Poland, diagnosed with HG SIL, the most common HPV genotypes were HPV 16, HPV 33, HPV 18, HPV 31, HPV 56.
2. Two HPV types 16 and 18, against which vaccinations are directed, belong to the group of three genotypes of HPV most commonly identified in the evolution of CIN 2, CIN 3 diagnosed in women from Central and Western Poland.

Key words: **HPV / genotype HPV / epidemiology / HG-SIL /
/ uterine cervical cancer / primary prevention /**

Wstęp

Szacuje się, że ponad 90% raków szyjki macicy rozpoznawanych co roku na świecie rozwija się w wyniku przetrwałej infekcji wywołanej 12 onkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego. Wśród nich, na uwagę zasługują szczególnie dwa szeroko rozpowszechnione genotypy HPV 16 i 18, które inicjują powstanie 70,9% raków szyjki macicy [1].

Kolejność zmian wywołanych infekcją wirusową, prowadzących do powstania nowotworu obejmuje: zakażenie incydentalne, zakażenie przetrwałe, śród nabłonkową neoplazję niskiego stopnia CIN 1/LG SIL (*cervical intraepithelial neoplasia 1/low grade squamous intraepithelial lesion*), śród nabłonkową neoplazję średniego CIN 2 i dużego stopnia CIN 3, które łącznie określa się jako HG SIL (*cervical intraepithelial neoplasia 2, 3/high grade squamous intraepithelial lesion*). Możliwy jest także rozwój nowotworu od zmiany typu HG SIL z pominięciem LG SIL, lub inicjacja karcinogenezy bez opisanych etapów poprzedzających, określanych mianem neoplazji. Możliwość ta występuje ekstremalnie rzadko. Rozwój raka szyjki macicy na zasadzie stopniowego nasilenia śród nabłonkowej neoplazji jest do pewnego etapu samoistnie odwracalny. Szacuje się, że 60% CIN 1, 40% CIN 2 i około 30% CIN 3 może ulec samoistej regresji bez podejmowania leczenia. Z drugiej strony ocenia się, że ponad 30% zmian HG SIL ulega progresji w ciągu kilku lat do raka przedinwazyjnego i inwazyjnego. Jednym z czynników, mających niewątpliwie wpływ na kierunek zmian jest typ wirusa, który je wywołał.

Obecnie uważa się, że wirusami dynamicznie sprzyjającymi progresji neoplazji są typy: 16, 18, 45, 31, 33 dla raka płaskonabłonkowego oraz 16, 18, 45 dla raka gruczołowego.

Epidemiologia wirusa brodawczaka ludzkiego jest w znacznym stopniu uzależniona od regionu geograficznego, w którym zamieszkuje badana w kierunku obecności HPV populacja. Z całą pewnością oprócz wymienionych powyżej klasycznych typów HPV obdarzonych silnymi właściwościami onkogennymi, również inne genotypy HPV mają duże znaczenie w rozwoju zmian typu HG SIL i wyżej zaawansowanych.

Cel pracy

Identyfikacja najczęściej występujących, onkogennych typów HPV u kobiet z rozpoznaniem HG SIL pochodzących z Polski Środkowo-Zachodniej celem oceny zasadności rozwoju profilaktyki pierwotnej.

Materiał

Na potrzeby testu molekularnego identyfikującego obecność DNA 13 typów wirusów onkogennych pobrano wymazy szczoteczką *cyto-brush* od 76 kobiet z rozpoznaniem CIN 2 lub CIN 3 (HG SIL). Pacjentki zakwalifikowane do badań były diagnozowane w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu. Pacjentki pochodziły z centralnej i zachodniej części Polski. Rozpoznanie CIN 2 lub CIN 3 formułowano w wyniku przeprowadzonej kolposkopii i biopsji miejsc podejrzanych.

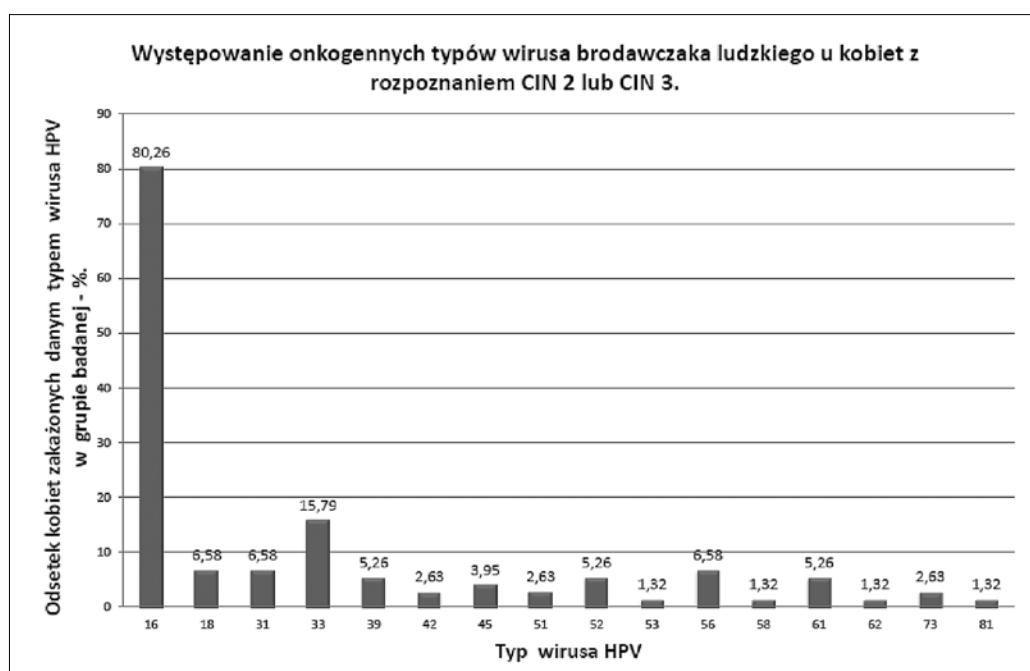
Metoda

Każdy materiał komórkowy, w którym za pomocą metody Amplicor HPV (Roche Diagnostics) identyfikowano obecność DNA HPV onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego był kolejno poddawany genotypowaniu molekularnemu, za pomocą testu Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics).

Genotypowanie onkogennych wirusów brodawczaka ludzkiego u kobiet z rozpoznaniem HG SIL.

Tabela 1. Wyniki genotypowania wirusów brodawczaka ludzkiego u 76 kobiet z rozpoznaniem CIN 2 lub CIN 3 (HG SIL), gdzie n – liczba wykrytych genotypów danego wirusa, % – dotyczy odsetka kobiet zakażonych danym typem wirusa w grupie badanej liczącej 76 pacjentek.

Typ HPV	16	18	31	33	39	42	45	51	52	53	56	58	61	62	73	81	83	84
n	61	5	5	12	4	2	3	2	4	1	5	1	4	1	2	1	2	1
%	80,26	6,58	6,58	15,79	5,26	2,63	3,95	2,63	5,26	1,32	6,58	1,32	5,26	1,32	2,63	1,32	2,63	1,32



Wykres 1. Porównanie liczby wykrytych genotypów onkogennych HPV wśród 76 kobiet z rozpoznaniem CIN 2, CIN 3.

Badanie to oparte jest na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z zastosowaniem primerów biotynylowanych komplementarnych do sekwencji w obrębie polimorficznego obszaru genu L1 oraz hybrydyzacji z sondami – oligonukleotydowymi swoistymi dla DNA 37 typów HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 i CP6108 oraz genu β globiny.

Wyniki

Do pięciu najczęściej występujących onkogennych typów HPV zaliczono w kolejności wykrywania: 16, 33, 18, 31, 56. Razem te pięć typów wirusa stanowiło 75,86% (88/116) wszystkich wykrytych wirusów brodawczaka ludzkiego.

(Wykres 1).

Dyskusja

W najnowszej, trzeciej edycji raportu WHO/ICO 2010, wydanej przez *HPV Information Center* nie przytoczono danych dotyczących rozpowszechnienia poszczególnych genotypów HPV u kobiet z rozpoznaniem śródnamionkowej neoplazji szyjki macicy niskiego stopnia LG SIL oraz HG SIL zamieszkałych w Polsce [2]. Dane takie, przytaczano natomiast dla takich państw europejskich jak Czechy, czy Niemcy i częściowo Węgry [3, 4, 5].

Niniejsza praca ma na celu zmianę tej sytuacji. Wraz z rozwojem profilaktyki pierwotnej opartej o szczepienia kobiet przeciwko wybranym, onkogennym typom HPV, zaczęto zadawać sobie pytania o skuteczność tych działań w obniżaniu zachorowalności na raka szyjki macicy oraz o opłacalność powszechnego wdrożenia tego rodzaju profilaktyki. Danych o skuteczności szczepień dostarczają badania kliniczne oraz rejestry zbierające informacje dotyczące ewentualnego rozwoju patologii szyjki macicy u osób szczepionych.

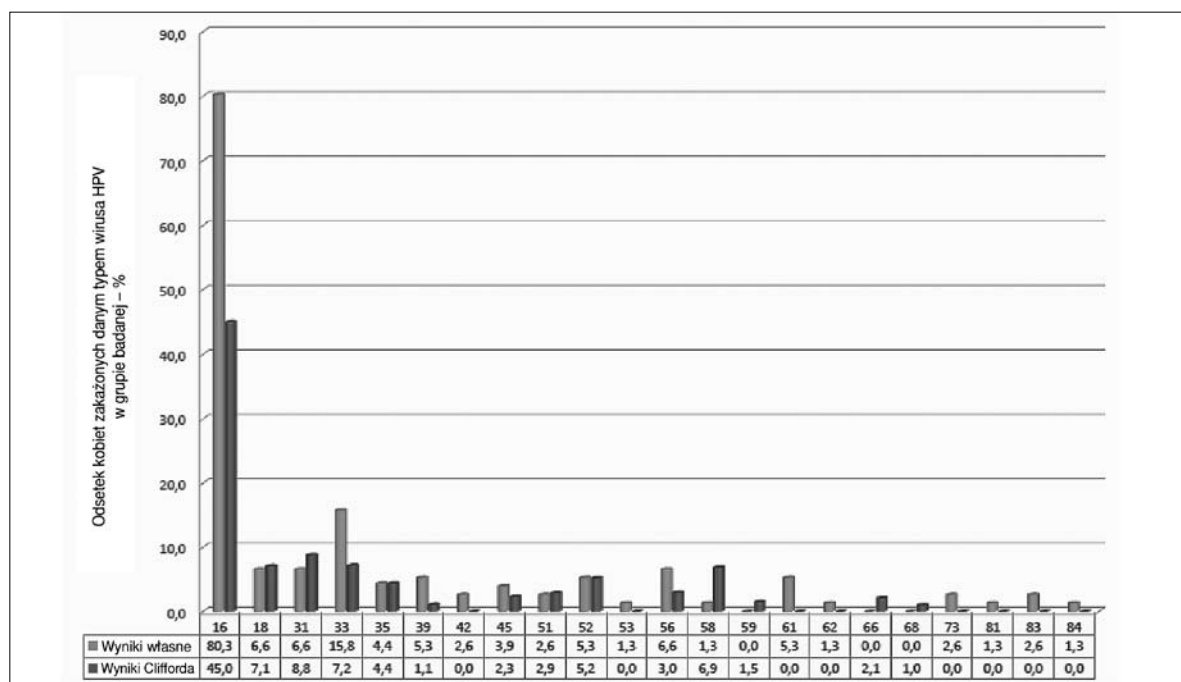
Kędzia W, et al.

Hipotetyczną opłacalność powszechnego wdrożenia szczepień przeciwko HPV, można oszacować dla danego regionu geograficznego czy państwa, znając dane o skuteczności profilaktyki pierwotnej chroniącej bezpośrednio przed zakażeniem HPV 16 i 18 i krzyżowo przed innymi typami wirusa oraz dysponując wiarygodnymi danymi epidemiologicznymi o rozpowszechnieniu poszczególnych genotypów HPV w danej populacji. Dla oceny spodziewanego spadku występowania u kobiet patologii szyjki macicy niezbędna jest wiedza o udziale poszczególnych genotypów HPV w powstawaniu zmian typu LG SIL (CIN 1), HG SIL (CIN 2, CIN 3) i raka płaskonabłonkowego czy gruczolowego szyjki macicy. Jak już wspomniano powyżej najnowszy, tegoroczny raport WHO/ICO zawiera kompletny zbiór danych obrazujących epidemiologię poszczególnych genotypów HPV z podziałem na LG SIL, HG SIL i raki dla większości krajów Eu-

ropy Zachodniej. Dane te stały się punktem wyjścia analiz ekonomicznych dla poszczególnych regionów Europy, które mają decydujące znaczenie dla ewentualnego wprowadzenia tam profilaktyki pierwotnej opartej o szczepienia przeciwko HPV, jako opłacalne uzupełnienie profilaktyki wtórnej. Stąd też w trakcie toczącej się dyskusji o znaczeniu pierwotnej profilaktyki raka szyjki macicy dla Polski, należy w pierwszym rzędzie podjąć starania o poznanie rzeczywistej sytuacji epidemiologicznej dotyczącej genotypów HPV inicjujących karcinogenezę szyjki macicy wśród kobiet mieszkających w naszym kraju. Według często cytowanej publikacji Clifforda i wsp. z roku 2003 omawiającej epidemiologię poszczególnych typów HPV w zmianach typu HG SIL, do najczęściej identyfikowanych genotypów należą HPV 16 (45,0%), HPV 31 (8,8%), HPV 33 (7,2%), HPV 18 (7,1%), HPV 58 (6,9%) i HPV 52 (5,2%), (Wykres 2) [6].

Tabela II. Porównanie wyników meta-analizy Clifforda i wsp. oraz badań własnych dotyczące częstości identyfikacji genotypów HPV u kobiet z rozpoznaniem HG SIL.

Meta-analiza częstości występowania genotypów HPV, u kobiet z rozpoznaniem HG SIL. n = 4338		Częstość występowania genotypów HPV, u kobiet z rozpoznaniem HG SIL. n = 76	
HPV 16	45,0%	HPV 16	80,26%
HPV 31	8,8%	HPV 33	15,79%
HPV 33	7,2%	HPV 18 HPV 31 HPV 56	6,58%
HPV 18	7,1%		
HPV 58	6,9%		
HPV 52	5,2%	HPV 39 HPV 52 HPV 61	5,26%
HPV 35	4,4%		
HPV 56	3,0%		
HPV 51	2,9%	HPV 45	3,95%
HPV 45	2,3%	HPV 42, 51, 62, 73, 83	2,63%



Wykres 2. Porównanie częstości występowania genotypów HPV u kobiet z HGSIL wg meta-analizy Clifforda i wsp. oraz badań własnych.

Genotypowanie onkogennych wirusów brodawczaka ludzkiego u kobiet z rozpoznaniem HG SIL.

Na dziesiątym miejscu pod względem częstości występowania wśród kobiet z HG SIL, Clifford i wsp. umieścili typ 45 HPV (2,3%). Wartość tej meta-analizy wyznacza skala materiału będącego przedmiotem oceny. Clifford i wsp. poddali analizie 4338 rozpoznanych histopatologicznie zmian typu HG SIL czyli CIN 2 i CIN 3 wśród, których było: 729 CIN 2, 1733 CIN 2/CIN 3, 1824 CIN 3, 52 CIN 3/ *Ca in situ*. Wartość porównawcza tego badania dla badań własnych wynika z faktu, że zdecydowana większość przypadków HG SIL, analizowana przez Clifforda i wsp. pochodziła od kobiet mieszkających w Europie. Drugą populacją analizowaną pod kątem częstości występowania HPV, stanowiły kobiety z rozpoznaną zmianą typu HG SIL, mieszkające w Ameryce Północnej i Środkowej.

Wyniki uzyskane w toku realizacji niniejszej pracy wykazały znaczną zbieżność z danymi opublikowanymi w meta-analizie Clifforda i wsp. Wśród kobiet z rozpoznaną zmianą typu HG SIL, mieszkających w Polsce Środkowo-Zachodniej kolejność występowania poszczególnych genotypów wirusa brodawczaka przedstawia się następująco: HPV 16 – 80,26%, HPV 33 – 15,79%, HPV 18, 31, 56 – 6,58%, HPV 39, 52, 61 – 5,26%.

Reasumując, wśród ośmiu najczęściej identyfikowanych genotypów HPV, u kobiet ze zmianą typu HG SIL, oba źródła zgodnie wskazują na HPV 16, 33/31, 18. Typ HPV 45, który w meta-analizie Clifforda i wsp. zajął jak już wspomniano dziesiąte miejsce, w badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy został ujęty na miejscu dziewiątym. (Tabela II).

Analizując dane porównawcze przedstawione w tabeli II, należy stwierdzić, że ocena zasadności prowadzenia profilaktyki pierwotnej raka szyjki macicy w Polsce powinna być oparta w głównej mierze o skuteczność tejże profilaktyki w zapobieganiu rozwojowi zakażenia przetrwałego wywołanego wirusem brodawczaka ludzkiego typu 16, 31, 33 i 18. Wiodącą rolę wymienionych powyżej genotypów HPV w inicjacji karcinogenezy potwierdza również ich identyfikacja w zmianach typu LG SIL, wśród kobiet z tym rozpoznaniem mieszkających w Polsce Środkowo-Zachodniej. Analiza 126 rozpoznanych zmian typu LG SIL/CIN 1 wykazała, że najczęściej wywołane są one przez HPV 16 (53,97%), HPV 33 (21,3%), HPV 18 (16,67%), HPV 31 (10,32%). Zakażenia HPV 45 identyfikowane w 7,94% zmian LG SIL, występują znacznie rzadziej w zmianach typu HG SIL (2,63%) [7]. Wydaje się, że typ 45 wirusa w populacji kobiet żyjących w Europie Środkowej, w tym w Polsce nie należy do grupy wirusów najczęściej inicjujących proces rozwoju śródnowłonkowej neoplazji w obrębie szyjki macicy. Przedwczesne wydaje się jednak deprecjonowanie roli genotypu 45 HPV w rozwoju raka szyjki macicy wśród kobiet zamieszkujących na terenie Polski i Europy Środkowo-Wschodniej. Przytaczane we wspomnianym raporcie WHO/ICO dane dotyczące identyfikacji typów HPV u kobiet z rakiem szyjki macicy zawierają następującą kolejność genotypów wirusów w zależności od częstości występowania: HPV 16 – 57,8 %, HPV 18 – 14,6% i na pozycji trzeciej HPV 45 – 4,7%. Dwa genotypy wirusa 31 i 33 zajmujące wysoką trzecią i czwartą pozycję pod względem częstości identyfikacji w HG SIL w badaniach własnych oraz drugą i trzecią pozycję w meta-analizie Clifforda i wsp. raport WHO/ICO klasyfikuje odpowiednio na czwartej (HPV 31) i szóstej pozycji (HPV 33), u kobiet z rakiem szyjki macicy, mieszkających w Polsce.

Wy tłumaczenie fenomenu nadspodziewanie silnych właściwości onkogennych typu 45, które objawiają się dopiero na etapie

raka, a nie neoplazji nawet wysokiego stopnia można wytłumaczyć następująco. Po pierwsze typ HPV 45 stanowi jeden z trzech najczęściej identyfikowanych wirusów brodawczaka ludzkiego powodujących rozwój raka gruczołowego szyjki macicy. Liczne dane pochodzące z całego świata wskazują na niepokojący trend wzrostu zachorowalności na raki gruczołowe szyjki macicy, przy stopniowym obniżaniu się częstości występowania raków płaskonabłonkowych. Do ich rozpoznania najczęściej dochodzi na etapie zaawansowanej karcinogenezy, a nie zmian typu LG lub HGSIL. Wzrost obecności raka gruczołowego szyjki macicy oznacza analogicznie wzrost częstości występowania zakażenia HPV 45. Po drugie, nie można również wykluczyć, że typ 45 HPV rzadziej w porównaniu do innych wirusów ulega samoistnej regresji zakażenia. Na koniec, należy stwierdzić, że światowe statystyki dotyczące krajów Europy Środkowej, w tym szczególnie Polski opierają się na niepełnych, nielicznych i nieaktualnych danych. Cytowany wielokrotnie raport WHO/ICO przytacza częstość identyfikacji poszczególnych genotypów w rakach szyjki macicy u kobiet mieszkających w Polsce w oparciu o dwie publikacje z 2002 roku i jedną z roku 2000 [8, 9, 10]. Warto zauważyć, że jedna z tych publikacji pochodzi z Ginekologii Polskiej. Pomimo wszystko, koniecznością wydaje się uzupełnienie niniejszej pracy oraz poprzednich publikacji dotyczących identyfikacji genotypów HPV w zmianach typu LG SIL, o aktualną analizę epidemiologiczną typów HPV w rakach szyjki macicy kobiet mieszkających w Polsce i Europie Środkowej.

Wnioski

1. Do grupy najczęściej występujących genotypów HPV, u kobiet z HG SIL, mieszkających w Polsce Środkowo-Zachodniej należy kolejno: HPV 16, HPV 33, HPV 18, HPV 31, HPV 56.
2. Dwa typy HPV 16 i 18 przeciwko, którym skierowane są szczepienia profilaktyczne, należą do grupy trzech genotypów HPV najczęściej identyfikowanych w zmianach CIN 2, CIN 3, rozpoznawanych u kobiet w Polsce Środkowo-Zachodniej.

Praca zrealizowana z funduszy KBN: N406 046 31/1358

Piśmiennictwo

1. Munoz N, Bosch X, Sanjose S, [et al.]. The International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Eng J Med*. 2003, 348, 518-527.
2. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer 2010 <http://www.who.int>.
3. Tachezy R, Hamsiková E, Hájek T, [et al.]. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol*. 1999, 58, 378-386.
4. Klug S, Hukelmann M, Hollwitz B, [et al.]. Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *J Med Virol*. 2007, 79, 616-625.
5. Szoke K, Sápy T, Krasznai Z, [et al.]. Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities. *J Med Virol*. 2003, 71, 585-592.
6. Clifford G, Smith J, Aguado T, [et al.]. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003, 89, 101-105.
7. Kędzia W, Jóźefiak A, Pruski D, [i wsp.]. Genotypowanie wirusów brodawczaka ludzkiego u kobiet z CIN 1. *Ginekol Pol*. 2010, 81, 664-667.
8. Dybikowska A, Licznarski P, Podhajska A. HPV detection in cervical cancer patients in northern Poland. *Oncol Rep*. 2002, 9, 871-874.
9. Liss J, Łukaszyk K, Gulczyński J, [et al.]. The incidence of human papilloma virus (HPV) DNA in patients with cervical carcinoma from Gdansk region. *Ginekol Pol*. 2002, 73, 740-744.
10. Piróg E, Kleter B, Olgac S, [et al.]. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000, 157, 1055-1062.