

Okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV in

testiranje HPV v cervikalnem presejalnem programu

Eda Vrtačnik Bokal

Uvod

Okužba s HPV spada med najpogostejše spolno prenosljive okužbe (SPO) v populaciji. V evropskih državah je ocenjena stopnja okužbe 15–20 %, v ZDA tudi do 70 % in v skupini s povečanim tveganjem za SPO v Afriki celo do 95 % (1). Tako prevalenca okužbe s HPV v cervikalnih celicah kot prevalenca raka materničnega vratu (RMV) v populaciji je tesno povezana s starostjo žensk, čeprav se starostna struktura med okužbo HPV in RMV zelo razlikuje. Prevalenca okužbe HPV je velika med mladimi, medtem ko se invazivni RMV praviloma ne razvije pred 30. letom starosti. Najvišja prevalenca okužbe HPV je okoli 25. leta starosti, RMV pa po 40. letu starosti (2).

Epidemiološki podatki in izjemen napredek v molekularni biologiji z novimi biološkimi tehnikami so bistveno pripomogli k pojasnitvi karcinogeneze RMV. Ta nova dognanja so pomembno vplivala tudi na spremembo in dopolnitev presejalnih cervikalnih metod. Z uvedbo testiranja HPV v cervikalni presejalni program smo vstopili v obdobje, ko se približujemo optimalnemu odkrivanju predrakavih lezij, ki jih z minimalno invazivnim zdravljenjem lahko v celoti odstranimo. Tretji, verjetno največji doprinos napredka molekularne znanosti na področju HPV, pa predstavlja razvoj in uvajanje cepiva HPV.

Zgradba HPV

HPV so majhni, goli, ikozaedrično somerni virusi, ki v premeru merijo približno 55 nm. Sestavljeni so iz dvojnovijačnega, krožnega genoma in virusnega beljakovinskega plašča, imenovanega kapsida, ki ga sestavljajo velike (L1) in majhne strukturne plaščne beljakovine (L2).

Virusni genom sestavljajo kodirajoča in nekodirajoča območja. Kodirajoča delimo na območje L (angl. late, pozno) in območje E (angl. early, zgodnje). Genom sestavlja šest zgodnjih genov E in 2 pozna gena L. Geni E kodirajo nestrukturne ali zgodnje beljakovine (E1, E2, E4, E5, E6, E7), gena L pa strukturne ali pozne beljakovine (L1 in L2) (3, 4).

Karcinogeneza, povzročena z visokorizičnimi genotipi HPV

Znano je, da so RMV in predrakave spremembe na materničnem vratu povezane z dolgotrajno okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV, ki so del zelo heterogene skupine virusov, ki jih razvrščamo v različne virusne genotipe glede na skladnost nukleotidnih zaporedij. 30–40 genotipov HPV redno ali občasno okuži spolovila in jih razvrščamo v dve skupini:

- genotip HPV 6 in 11 povzročata anogenitalne bradavice, ki redko maligno spremenijo, zato jih uvrščamo v nizkorizične oz. neoncogene genotipe HPV;
- genotipe HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 in 82, ki jih uvrščamo med visokorizične genotipe HPV in so povezani z RMV vulve in rektuma pri ženski ter z rakom penisa in rektuma pri moških (5).

Najtesnejša povezava obstaja med RMV in visokorizičnimi genotipi HPV, saj je v bioptičnem materialu RMV HPV prisoten v 100 %, v bioptičnem materialu predrakavih sprememb – cervikalnih intraepitelijskih neoplazijah (CIN II in CIN III) – pa v 90 %. Najpogostejši visokorizični genotip HPV pri RMV je genotip 16 (50–60 %), nato HPV 18 (10–12 %), drugi pa so zastopani sporadično (6).

Za onkogenost HPV je pomemben način razmnoževanja virusov, ki je odvisen od navzočnosti virusnih beljakovin in od stopnje zrelosti gostiteljevih epitelijskih celic. Ključni pomen pri karcinogenezi je vključevanje DNA visokorizičnih genotipov HPV v humani genom. Zaradi razmnoževanja HPV v povrhnjih epitelijskih celicah nastane za HPV značilni citopatski učinek, imenovan koilocitoza (7, 8).

Znano je, da se RMV razvije po različnih stopnjah predrakavih sprememb ploščatega epitelijskega (CIN), ki jih lahko ugotovimo vsaj 10 let pred pojavom invazivnega karcinoma. Ženske s predrakavimi spremembami materničnega vratu bistveno pogosteje zbolijo za RMV kot ženske brez takšnih sprememb (9).

Testi za določanje visokorizičnih genotipov HPV

Najpogostejši testi, ki jih uporabljamo za določanje visokorizičnih genotipov HPV, so testi tekočinske hibridizacije *Hybrid Capture II* (HC II) (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA) in testi na podlagi verižne reakcije s polimerazo (PCR).

Hybrid Capture II (HC II)

Test HC II uporabljamo za rutinsko diagnostiko okužbe s HPV in ima dovoljenje za uporabo v humani medicini. Metoda temelji na tekočinski hibridizaciji dolgih sintetičnih lovk RNA s tarčno DNA HPV.

Z uporabo prve generacije HC I je bilo mogoče prepoznati 5 nizkorizičnih genotipov HPV (6, 11, 42, 43 in 44) in 9 visokorizičnih genotipov HPV (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 in 56). Test so ocenili kot zelo specifičen, vendar premalo občutljiv. Kmalu so razvili drugo generacijo testa *Hybrid Capture II* z izboljšano občutljivostjo, v katerem so spremenili sestavo nekaterih reagentov in vključili štiri lovke za prepoznavanje dodatnih štirih visokorizičnih genotipov HPV (39, 58, 59 in 68). Test HC II je preprost, hiter in v primerjavi s HC I doseže 10-krat večjo občutljivost. Pomanjkljivost metode je, da ne opredeljuje posameznih genotipov HPV (10).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je najpogosteje uporabljena metoda *in vitro* za pomnoževanje izbranega dela nukleotidnega zaporedja. PCR je trenutno najbolj občutljivejša metoda za dokazovanje okužbe s HPV in genotipizacijo

HPV (11). Značilna heterogenost nukleotidnih zaporedij različnih genotipov HPV je onemogočila razvoj enostavnih univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov in protokola PCR za odkrivanje vseh genotipov HPV(12, 13, 14).

Testiranje HPV

Zaradi znanstvene potrditve povezave med dolgotrajno okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV in nastankom predrakavih oz. rakavih sprememb ter zaradi pomanjkljivosti citološkega testiranja kot presejalne metode je prav testiranje HPV tisto, ki izboljšuje presejalne cervikalne algoritme pri odkrivanju predrakavih celic, pri obravnavanju mejno spremenjenih brisov in pri obravnavanju žensk s CIN visoke stopnje.

Primarno testiranje HPV visokorizičnih genotipov kot nadzor kakovosti citološkega cervikalnega testiranja

Problem pri citološkem testiranju predstavlja razmeroma visoka stopnja lažno negativnih rezultatov. Pri revizijah citoloških brisov bolnic, obolelih za RMV (pri katerih so bili predhodni citološki brisi normalni), brise prekvalificirajo v nenormalne tudi v 80 % primerov, kar kaže na velik subjektivni vpliv pregledovalca brisa. Istočasno pa so vsi ti revidirani brisi praviloma HPV-pozitivni (15), kar še potrjuje smiselnost uvedbe primarnega testiranja HPV (diagram 1) v deželah s slabo urejeno citološko infrastrukturo.

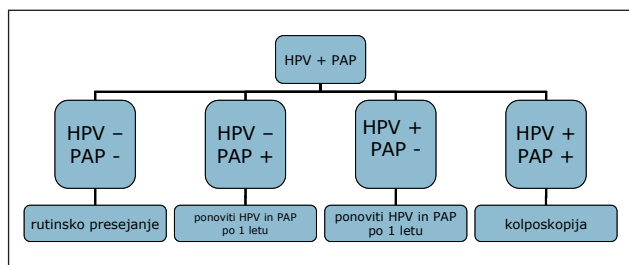


Diagram 1. Model algoritma istočasnega primarnega HPV testiranja in citološkega testiranja.

Prvotni model primarnega testiranja HPV so še razvili (16) (diagram 2) in vključili genotipizacijo za HPV 16 in HPV 18, ki sta najpogostejša genotipa pri RMV. To izpopolnjeno primarno testiranje HPV še natančneje zazna ženske, ki imajo povečano tveganje za razvoj predrakavih in rakavih sprememb.

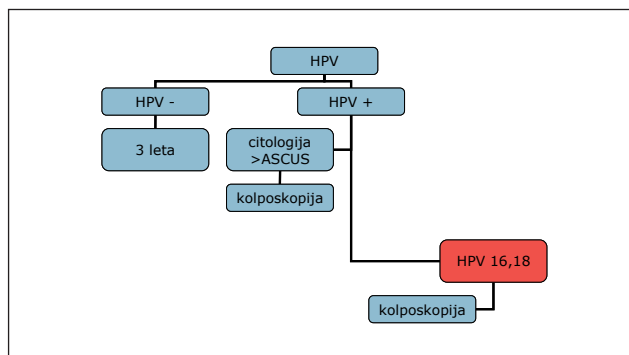


Diagram 2. Model algoritma primarnega HPV testiranja.

Za morebitno uvedbo primarnega testiranja v cervikalni presejalni program bodo potrebni dodatni izračuni učinkovitosti vložka, ki se bodo glede na različne dežele razlikovali prav zaradi velikega razlikovanja v kakovosti opravljanja citološke dejavnosti. Predvideva pa se, da bi se začetni povečani stroški za uvedbo testiranja HPV v cervikalni presejalni program poravnali s podaljševanjem presejalnega intervala na 3–5 let pri HPV-negativnih ženskah z normalno citologijo, pri katerih je tveganje za nastanek predrakavih sprememb ali RMV bistveno manjše kot pri ženskah z normalno citologijo in neznanim statusom HPV.

Vsekakor pa bi primarno testiranje HPV najbolj pripomoglo pri odkrivanju predrakavih žleznih sprememb in adenokarcinoma, ki je zlasti povezan z dolgotrajno okužbo z visokorizičnim genotipom HPV 18, citologija pa ima pri odkrivanju omenjenih predrakavih sprememb zelo majhno občutljivost in specifičnost. Če je ženska več kot eno leto HPV-pozitivna, z negativno citologijo in negativno kolposkopsko vodeno biopsijo, je treba napraviti abrazijo cervikalnega kanala in tako čim hitreje priti do diagnoze (15).

Testiranje HPV pri obravnavanju mejno patoloških citoloških brisov (abnormalne ploščate celice, blago diskariotične celice)

Med vsemi algoritmi, ki vključujejo testiranje HPV, je algoritem z uvedbo testiranja HPV pri obravnavanju mejno patoloških citoloških brisov (abnormne in blago diskariotične celice) najbolj izdelan in ga tudi najbolj uporabljajo v klinični praksi, predvsem v ZDA, vedno pogosteje pa tudi v evropskih državah (17). Ženske z mejno patološkimi citološkimi brisi in HPV-pozitivnim statusom so tiste, pri katerih je povečano tveganje za predrakave in rakave spremembe, medtem ko je tveganje pri HPV-negativnih zanemarljivo in jih lahko kontroliramo čez eno leto, nekateri (15) pa priporočajo celo normalno testiranje čez 3 leta. Tako se izognemo preobremenitvi cervikalnega presejalnega programa z mejno patološkimi brisi in ponavljanjem citoloških brisov pri HPV-negativnih ženskah na 6 mesecev (15, 18). Glavna prednost omenjenega obravnavanja je bistveno zmanjšanje cervikalnih brisov po 6 mesecih, saj je 65 % žensk (15), v Sloveniji pa 74 % (18) z mejno patološkimi citološkimi brisi in HPV-negativnim statusom, ki ne potrebujejo kontrole po 6 mesecih.

Torej, tako v Sloveniji kot tudi drugod po svetu predstavlja spremljanje bolnic s ponavljajočimi mejno spremenjenimi citološkimi brisi (abnormne in blago diskariotične celice) klinični in javni zdravstveni problem (15, 18), predvsem zaradi slabe občutljivosti in specifičnosti citološkega testiranja za odkrivanje predrakavih sprememb (19). Občutljivost citoloških testov je slaba zaradi napak pri odvzemu materiala, ker se abnormne celice količinsko ne prenesejo na razmaz ali pa zaradi subjektivnih napak ocenjevalca pri vrednotenju. Občutljivost citoloških testov za odkrivanje CIN II in CIN III se giblje med 40 in 80 %. Poleg tega citološko presejanje ni zanesljivo pri odkrivanju sprememb žleznega epitelijskega adenokarcinoma, kar tudi prispeva k naraščanju incidence RMV (15).

Zaradi velike prevalence prehodnih okužb z visokorizičnimi genotipi HPV pri ženskah, mlajših od 30 let, in spontanega izginevanja virusa v 80 % v prvem letu po okužbi, priporočajo uvajanje testa za visokorizične genotipe HPV pri ženskah, starejših od 30 ali celo 35 let. Tako priporočilo je v letu 2003

izdala tudi FDA (Food and Drug Administration, ZDA).

Testiranje HPV in genotipizacija HPV za sledenje zdravljenja predrakavih sprememb

Na splošno genotipizacija HPV, dokazanih v predrakavih in rakavih spremembah, ni potrebna, ker zdravljenje ni odvisno od rezultatov genotipa HPV. Za klinično uporabo popolnoma zadostuje testiranje HPV, ki potrди prisotnost ali odsotnost okužbe HPV z visokorizičnimi genotipi. Genotipizacija HPV ima mogoče manjšo prednost v smislu prognostičnega ocenjevanja. Potrditev prisotnosti istega genotipa HPV pred in po zdravljenju predrakavih sprememb pomeni, da zdravljenje ni bilo uspešno in je zato potreben zelo skrben nadzor, ker so to bolnice s povečanim tveganjem za razvoj rakavih sprememb (15, 20).

Sklepi

1. Testiranje HPV visokorizičnih genotipov predstavlja koristno metodo v cervikalnem presejalnem programu za preprečevanja RMV v smislu nadzora kakovosti cervikalne citologije, za triažo žensk z mejno spremenjenimi cervikalnimi citološkimi brisi (abnormne in blago diskriotične celice) in za ocenjevanje uspešnosti kirurškega zdravljenja predrakavih sprememb.

2. Ženske, ki so HPV-pozitivne po operativnem posegu in pri katerih je potrjen genotip HPV 16 ali 18, potrebujejo dodaten nadzor, ker je pri njih povečano tveganje za razvoj RMV.

3. Abrazijo cervikalnega kanala naredimo pri tistih ženskah, ki imajo več kot eno leto potrjeno okužbo z genotipom HPV 18, vendar je pri njih citološki bris normalen. Te ženske imajo povečano tveganje za nastanek predrakavih žlezni celic, ki jih s citološkim brisom velikokrat prezremo.

Viri

1. Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assesment of causality. *J Nat Cancer Inst Monogr* 2003; 3–13.
2. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244–65.
3. Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 1994; 37: 143–9.
4. zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Ann Rev Mikrobiol* 1994; 48: 427–7.
5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–27.
6. Stanley M. HPV vaccines. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2006; 20: 279–93.
7. Ledwaba T, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. *Biol Chem* 2004; 385: 671–82.
8. Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J* 1993; 7: 872–9.
9. Morrison EAB. Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 172–180.
10. Poljak M, Brenčič A, Seme K, Vince A, Marin IJ. Comparative evaluation of first- and second-generation. Digene Hybrid Capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 796–7.
11. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
12. Poljak M, Seme K, Gale N. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Adv Anatomic Pathol* 1998; 5: 216–34.
13. Manos MM, Ting Y, Wright DK et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209–14.
14. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000; 88: 125–34.
15. Brink A. HPV testing in cervical screening. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2006; 20: 253–66.
16. Cuzics J. If HPV becomes the primary screening test, what are the best adjunctive test? *EUROGIN* 2006.19.
17. Tristram A. HPV information needs. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2006; 20: 267–77.
18. Vrtačnik Bokal, Rakar S, Možina A, Poljak M. Human papillomavirus infection in relation to mild dyskaryosis in conventional cervical cytology. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005; 26: 39–42.
19. Vrtačnik Bokal, Rakar S, Jančar N, Možina A, Poljak M. Role of human papillomavirus testing in reducing the number of surgical treatments for precancerous cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005; 26: 427–30.
20. Jančar N, Rakar S, Poljak M, Fujs K, Kocjan BJ, Vrtačnik Bokal E. Efficiency of three surgical procedures in eliminating high-risk human papillomavirus infection in women with precancerous cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2006; 27: 239–42.