

Molekulovogenetická diagnostika ľudského papilomavírusu (HPV) a monitorovanie pacientok s HPV

Alexandra Oravcová, Andrea Kucková, Renata Lukačková

Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Ľudské papilomavírusy (HPV) sa považujú za závažný etiologický faktor, zodpovedný za viac ako 99,7 % všetkých cervikálnych karcinómov, pričom 14 typov HPV je považovaných za onkogénne. Práve perzistentná infekcia vysokorizikovými HPV typmi vedie k zmene epitelových buniek, k vývoju prekancerózných lézií, prípadne až k vzniku cervikálneho karcinómu. Za obdobie od 1. januára do 31. decembra 2017 sme mali k dispozícii 3 463 pacientok, ktoré podstúpili cervikálne cytologické vyšetrenie a následne molekulovogenetickú diagnostiku HPV na báze DNA, testom cobas® 4 800 HPV (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA), a na báze mRNA, testom Aptima HPV Assay (Hologic, CA, USA). Cieľom našej štatistickej analýzy bolo vyhodnotenie expresie hrHPV pri oboch molekulových metódach, a zároveň sledovať koreláciu s jednotlivými cytologickými nálezmi. V budúcnosti by práve skorá detekcia HPV v bunkách krčka maternice zaručila lepšiu prognózu a následne aj efektívnejšiu liečbu prekanceróz u pacientky.

Kľúčové slová: HPV, CIN, cobas® 4800 HPV, Aptima HPV Assay, skrining rakoviny krčka maternice

Molecular – genetic diagnostics of Human Papillomavirus (HPV) and monitoring of HPV patients

Human papillomaviruses (HPV) are considered to be a significant etiological factor responsible for over 99.7 % of all cervical carcinomas, while 14 of HPV types being considered as oncogenic. Persistent infection by high-risk HPV types leads to epithelial cell changes, to the development of precancerous lesions, eventually to cervical carcinoma. For the period from January 1 to December 31, 2017, we analysed 3463 patients who underwent of cervical cytology examination and then DNA-based HPV molecular diagnostics were screened by cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA) and based mRNA, were screened by Aptima HPV assay (Hologic, CA, USA). Our statistical analysis aimed to evaluate the expression of hrHPV in both molecular methods and their correlation with individual cytological findings. In the future, early detection of HPV in cervical cells would ensure better prognosis and, consequently, more effective treatment of precancerous conditions in a patient.

Keywords: HPV, CIN, cobas® 4800 HPV, Aptima HPV Assay, cervical screening

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 72 – 79

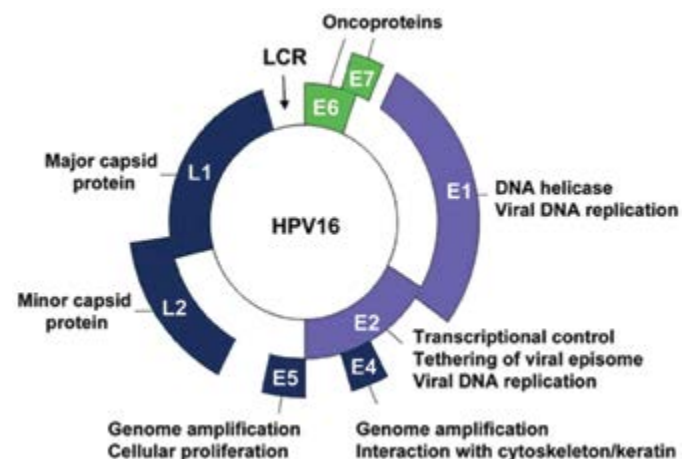
Úvod

V súčasnosti sa ľudský papilomavírus (HPV – Human Papillomavirus) považuje za základný etiologický faktor spôsobujúci rakovinu krčka maternice, pretože bez infekcie HPV nie je možný vývoj prekancerózných stavov s následným progresom do cervikálneho karcinómu. Ľudské papilomavírusy sa zaraďujú do čeľade *Papillomaviridae*, pričom ide o malé neobalené dvojlátkové DNA vírusy s genómom veľkosti približne 8 000 bp. Patria medzi epiteliotropné vírusy zodpovedné za cytopatický efekt kožného a slizničného epitelu. Genóm vírusu (**obrázok 1**) obsahuje 8 – 10 génov a skladá sa z troch funkčných oblastí – nekódujúca regulačná oblasť (LCR – long control region), oblasť so skoro prepisujúcimi sa génmi (Early genes) E1, E2, E3, E4, E5, E6 a E7 a oblasť s neskor prepisujúcimi sa génmi (Late genes) – L1 a L2, ktoré kódujú majoritný a minoritný vírusový kapsidový proteín a tvoria až 85 – 90 % celkovej hmotnosti vírusu. Regulačná oblasť obsahuje väzbové miesta pre vírusové proteíny E1 a E2, promotory (P1, P2, P3 a P4) a väzbové miesta pre transkripčné faktory. Oblasť so skoro prepisujúcimi sa génmi obsahuje gény pre regulačné proteíny E1 – E8. Proteíny E1 a E2 sú zodpovedné za replikáciu a transkripciu vírusu, E4 je neskorý proteín, ktorý uvoľňuje nové vírusové častice

z hostiteľskej bunky. Multifunkčný proteín E5 spolu s onkogénnymi proteínmi E6 a E7 ovplyvňuje mechanizmus regulácie bunkového cyklu^(1,2).

Celkovo existuje viac ako 200 rôznych druhov HPV schopných infikovať ľudský organizmus⁽³⁾, z toho 30 – 40 druhov je sexuálne prenosných, schopných infekcie predovšetkým

Obrázok 1. Genóm HPV 16⁽⁵⁾



viacvrstvého dlaždicového epitelu krčka maternice, kde sa následne podieľajú na vzniku nádorových procesov v anogenitálnej oblasti. Na základe typu hyperplastickej lézie epitelu možno HPV rozdeliť do dvoch skupín – HPV infikujúce kožu a HPV infikujúce sliznicu. Na základe stupňa korelácie medzi infekciou HPV a vývojom rakoviny krčka maternice sú jednotlivé typy papilomavírusov rozdelené do dvoch kategórií – 1. lrHPV (nízkorizikové typy HPV) a 2. hrHPV (vysokorizikové typy HPV). LrHPV sú zodpovedné za vznik benígnych nádorov vo forme genitálnych bradavicovitých výrastkov, papilómov a kondylómov. Najčastejšie vyskytujúce sa LrHPV typu 6 a 11 sú prítomné vo viac ako 70 % *condylomata accuminata*, pričom ostatných 30 % kondylómov spôsobujú zvyšné LrHPV. HrHPV dávajú podklad vzniku cervikálnych dysplázií, prípadne až invazívneho karcinómu krčka maternice⁽¹⁾. Taktiež sú spájané s orálnymi alebo inými anogenitálnymi malignitami. Zo všetkých 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) je známe, že typy HPV 16 a HPV 18 predstavujú približne 70 % prípadov rakoviny krčka maternice⁽⁴⁾. Bolo zistené, že hrHPV zohrávajú dôležitú úlohu nielen pri vzniku cervikálneho karcinómu, ale aj v etiológii iných malignít, karcinómu penisu, konečníka, kože, prípadne niektorých malignít horných dýchacích ciest.

Korelácia medzi HPV infekciou a rakovinou krčka maternice

Je preukázané, že ľudský papilomavírus zodpovedá za viac ako 99,7 % všetkých prípadov cervikálneho karcinómu⁽⁶⁾. Samotná infekcia cervikálnych epitelových buniek vysokorizikovými typmi HPV má odlišné formy. Môže ísť o prechodnú infekciu, ktorá je asymptomatická a nepreukazuje žiadnu prítomnosť patologických zmien v epitelových bunkách krčka maternice, respektíve preukazuje len prítomnosť benígnych bradavíc až po vysokoinvazívny cervikálny karcinóm, ktorý je výsledkom práve perzistentnej či transformujúcej sa infekcie. Práve perzistentná infekcia je základnou príčinou cervikálneho karcinómu a jeho prekursorov – cervikálnych intraepitelových neoplázií (CIN), ktoré predstavujú zmenu v bazálnych epitelových bunkách s následným vývojom prekancerózných lézií a v konečnom dôsledku aj so vznikom cervikálneho karcinómu⁽¹⁾.

Hoci perzistentná infekcia hrHPV sa považuje za hlavnú príčinu cervikálneho karcinómu a jeho prekursorových lézií, veľmi nízke percento infekcií hrHPV sa vyvinie až do štádia cervikálneho karcinómu. Sexuálne prenosná infekcia ľudským papilomavírusom nie je v žiadnom prípade ojedinelou záležitosťou, avšak vo viac ako v 90 % prípadov infikovaných žien vznikne imunitná odpoveď, ktorá následne potlačí infekciu v priebehu 6 až 24 mesiacov bez akýchkoľvek dlhodobých zdravotných následkov⁽⁷⁾. Infekcia ktorýmkoľvek typom HPV môže vyvolať vznik cervikálnych intraepitelových neoplázií, ktoré však po potlačení infekcie imunitným systémom zvyčajne zaniknú. Vzhľadom na to, že vírus je v populácii prenosný jednoduchým spôsobom, infekcia HPV je pomerne častá záležitosť, pričom sa odhaduje, že až 80 % sexuálne aktívnej populácie je infikovaných ešte pred dosiahnutím 50. roku života⁽⁶⁾. Čo sa týka prevalencie HPV, tá je najvyššia u mladých žien do 25 rokov⁽⁸⁾, avšak najvyšší výskyt rakoviny krčka maternice je u žien okolo 40. roku života.

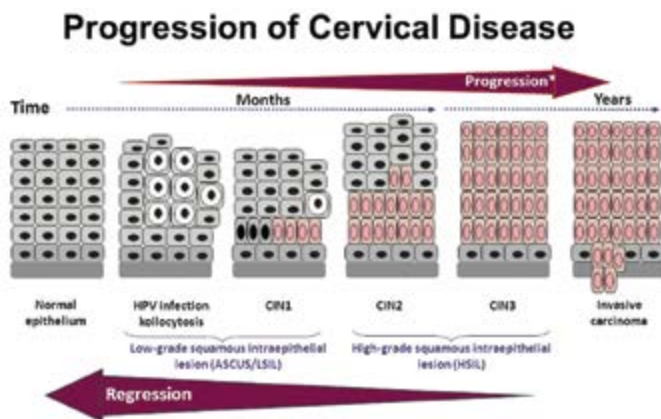
Rakovina krčka maternice sa zaraďuje medzi druhé najčastejšie onkologické ochorenie u žien v celosvetovom rebríčku a tretie v Európe, pričom je jedným z ochorení, ktoré postihuje vo všeobecnosti najmä ženy v produktívnom veku⁽⁹⁾. Je považované za ochorenie, ktoré je ako jedno z mála onkologických ochorení ľahko diagnostikovateľné a rovnako aj efektívne liečiteľné. Takmer 90 % všetkých úmrtí na rakovinu krčka maternice prislúcha práve rozvojovým krajinám, čo odráža rozdiely v dostupnosti cervikálneho skríningu a prevalencie infekcie HPV. Hlavným rizikovým faktorom vzniku cervikálneho karcinómu je vysoká promiskuita, s ktorou súvisí sexuálne prenosná infekcia HPV. Medzi ďalšie rizikové faktory patrí aj tehotenstvo v nízkom veku, fajčenie, trvalé užívanie antikoncepcie, socioekonomický status a imunitná odpoveď⁽¹⁰⁾.

Cervikálna intraepitelová neoplázia a karcinogéza

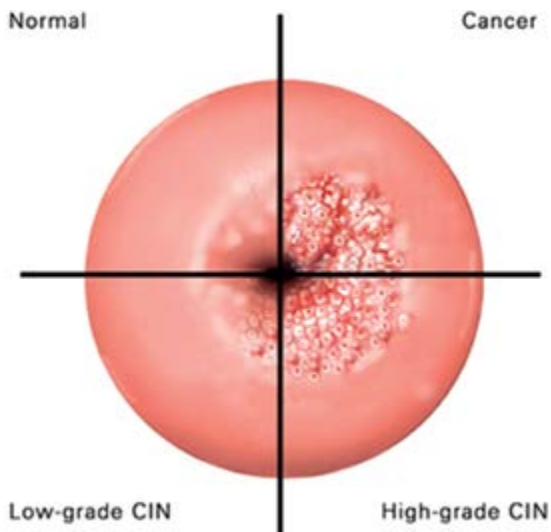
Karcinogéza cervikálneho karcinómu je niekoľkostupňový proces, v prvom rade sprevádzaný infekciou HPV, perzistenciou vírusu vo forme epizómu a jeho následnou linearizáciou a integráciou do hostiteľského genómu. Len čo je genóm HPV v priebehu karcinogézy integrovaný do chromozómu hostiteľskej bunky, výsledkom je okamžitá expresia onkogénnych proteínov E6 a E7. Nadmerná expresia onkogénneho proteínu E6 zrýchľuje degradáciu nádorového supresorového proteínu p53 a väzba onkogénneho proteínu E7 inaktivuje tumorsupresorový proteín pRB. Schopnosť proteínov E6 a E7 viazať a deregulovať bunkové regulátory proteínových komplexov vedie počas proliferácie k aktivácii malígnej transformácie indukovanej HPV⁽¹¹⁾. Strata funkcie nádorových supresorov prispieva k procesu malígnej transformácie, pretože vo vysokej miere ovplyvňujú proliferáciu buniek a následnú diferenciáciu a apoptózu. Z tohto dôvodu onkogénne proteíny E6 a E7 prispievajú k progresii karcinómu krčka maternice, avšak ich transkripčná schopnosť bola preukázaná výlučne pri hrHPV, pri ostatných typoch HPV ich onkogénna aktivita preukázaná nebola⁽¹¹⁾. Malígna transformácia je proces sprevádzaný vývojom cez cervikálne intraepitelové neoplázie (CIN) charakterizované abnormálnou bunkovou proliferáciou.

Prekancerózne zmeny krčka maternice sú sledované prostredníctvom cervikálneho cytologického vyšetrenia zo steru buniek z krčka maternice. Najčastejším miestom vzniku spomínaných prekancerózných lézií, respektíve nádorových stavov, je miesto medzi dlaždicovým a cylindrickým epitelom v mieste transformačnej zóny, kde vírus infikuje bunky bazálnej vrstvy epitelu cez mikroskopické poranenia alebo priamym kontaktom⁽¹²⁾. Takéto zmeny sú na základe histológie klasifikované ako cervikálne intraepitelové neoplázie (CIN), ktoré sa rozdeľujú do troch štádií: CIN I (dysplázia mierneho stupňa), CIN II (dysplázia stredného stupňa) a CIN III (ťažká dysplázia zahrňujúca aj karcinóm *in situ*) (**obrázok 2**). Pri histologickom náleze CIN I sú viditeľné zmeny v dolnej tretine epitelu s porušením diferenciácie buniek. Pri CIN II sa nachádzajú abnormálne bunky v dolných dvoch tretinách epitelu, pričom zmeny v epitelových bunkách sú rovnaké ako pri histologickom štádiu CIN I. V prípade ťažkej dysplázie označovanej ako CIS (*carcinoma in situ*) alebo CIN III/CIS ide o poruchu diferenciácie buniek v celej vrstve epitelu⁽¹¹⁾ (**obrázok 3**).

Obrázok 2. Progresia cervikálnych lézií po infekcii HPV⁽¹³⁾



Obrázok 3. Porovnanie jednotlivých nálezov na krčku maternice⁽²⁰⁾



Cytologický cervikálny skrining

Rakovina krčka maternice sa vo všeobecnosti považuje za ochorenie skriningom dobre sledovateľné, pretože prekancerózy sa vyvíjajú v pomerne dlhom časovom horizonte a sú ľahko liečiteľné. V súčasnosti sú k dispozícii prebiopické metódy ako cytologický skrining, respektíve sledovanie prítomnosti infekcie HPV, ktoré slúžia na diagnostiku prekanceróz. Ide o pomerne lacné, pacientku nezaťažujúce a zároveň dostatočne efektívne metódy. Jednou z nich je práve cytologický cervikálny skrining, ktorý slúži na vyšetrenie populácie žien s cieľom detekcie bunkových abnormalít skôr, ako môžu progredovať až na úroveň prekanceróz alebo ranných štádií cervikálneho karcinómu. Spolu s kolposkopiou a diagnostikou prítomnosti hrHPV patria medzi diagnostické metódy podieľajúce sa na odhalení dysplastických zmien na krčku maternice. Štandardné cytologické vyšetrenie náteru epitelových buniek krčka maternice (PAP test) je už mnoho rokov štandardnou skriningovou metódou znižujúcou výskyt rakoviny krčka maternice o 60 – 90 % a úmrtnosť až o 90 %. Obmedzením tohto testu je však pomerne nízka senzitivita, ktorá sa približuje k 50 %, a to najmä v interpretácii atypických skvamóznych buniek neznámeho pôvodu

(ASC-US) a skvamózne intraepitelových lézií nízkeho stupňa (L-SIL)⁽¹⁸⁾, ako aj výrazný podiel nehodnotiteľných vzoriek. Z tohto dôvodu bol ako súčasť cervikálneho skriningu, ktorý interpretuje jednotlivé nálezy podľa Bethesda systému⁽¹⁴⁾, zaradený test na detekciu prítomnosti vysokorizikových typov ľudských papilomavírusov. Základom cervikálnej cytológie je ster špeciálnou odberovou kefkou, ktorý obsahuje epitelové bunky z povrchu endocervixu, exocervixu, epitelové bunky transformačnej zóny. Dnes máme k dispozícii dva odlišné spôsoby cytologického vyšetrenia. Klasická (konvenčná) cytológia zahŕňa odber buniek z transformačnej zóny krčka maternice sterom pomocou odberových špachtlí a štetčiek, následným natretím buniek na cytologické podložné sklíčko, kde nasleduje okamžitá fixácia buniek na báze alkoholických roztokov (metylalkohol, izopropylalkohol) a v laboratóriu polychromatické farbenie podľa Papanicolaouovej metódy. Ako súčasť cytologického vyšetrenia sa dnes dostáva do popredia inovatívny typ cytologického vyšetrenia – Liquid Based Cytology (LBC) alebo cytológia na tekutom základe. Tento druh odberového systému posunul cytologické vyšetrenie na vyššiu úroveň, pretože výhodou tejto metódy je čistejší cytologický materiál v porovnaní s klasickou (konvenčnou) cytológiou, rovnako to, že 2- až 4-násobne zvyšuje záchyt premalígných lézií. Výhodou je takisto fakt, že z materiálu tej istej vzorky možno vyšetriť HPV, aj HSV, *Chlamydia trachomatis* alebo *Neiserie gonorrhoeae*.

V podmienkach Slovenskej republiky (SR) má každá pacientka vo veku 23 – 64 rokov v rámci preventívnej gynekologickej prehliadky nárok na cervikálny cytologický skrining, pričom periodicita je nasledovná: prvé dva odbory cervikálnej cytológie sú v ročnom intervale. V prípade negativity týchto dvoch cytologických nálezov sa pokračuje v trojročnom intervale do veku 64 rokov. Skrining sa vo veku 64 rokov ukončí, ak budú posledné tri cytologické nálezy negatívne. V prípade pozitívneho nálezu je interval kontrolnej cytológie 3 až 6 mesiacov, respektíve je odporučené kolposkopické vyšetrenie, histologické vyšetrenie a testovanie prítomnosti vysokorizikových typov ľudských papilomavírusov⁽¹⁵⁾.

Laboratórna diagnostika ľudského papilomavírusu (HPV)

Diagnostika prítomnosti infekcie HPV prostredníctvom molekulo-genetickej laboratórnej diagnostiky môže byť realizovaná testovaním na báze DNA alebo mRNA. V oboch prípadoch HPV testovania je sledovaná prítomnosť 14 vysokorizikových typov HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68). HPV je na Slovensku diagnostikované ženám nad 30 rokov s cytologickým nálezom ASC-US, po konizačných a ablačných výkonoch na krčku maternice, ktoré boli vykonané z dôvodu liečby dysplázie alebo mikroinvazívneho karcinómu cervix, respektíve v iných prípadoch podľa indikácie lekára so špecializáciou onkológia v gynekológii.

cobas® 4800 HPV

Prítomnosť HPV infekcie na úrovni DNA je testovaná prostredníctvom molekulo-genetickej laboratórnej diagnostiky technológiou cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA), ktorý deteguje amplikóny HPV DNA dlhé 200 bp majoritného kapsidového proteínu L1 u 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) zo steru

epitelových buniek krčka maternice⁽¹⁶⁾. Identifikovaná prítomnosť oblasti vírusovej DNA potvrdzuje prítomnosť HPV, čo však neznamená jednoznačne aktivitu vírusu a v mnohých prípadoch môže byť samovoľne potlačený imunitným systémom hostiteľa bez akýchkoľvek sprievodných príznakov, čo na druhej strane často vedie k falošne pozitívnym výsledkom metódy. Ide o automatizovaný kvalitatívny test na použitie *in vitro* detekcie hrHPV. Založený je na súbežnej extrakcii HPV a celulárnej DNA, amplifikácii PCR sekvencií cieľovej DNA so súčasnym použitím HPV a β -globínových špecifických komplementárnych prímernov a na detekcii flouorescenčne značených HPV a β -globínových špecifických oligonukleotidových detekčných sond prostredníctvom Real-Time PCR technológiou LightCycler® 480⁽¹⁶⁾. Následne sa extrakciu, amplifikáciu a detekciu β -globínu testovací proces ukončí. Vo výsledku sú typy HPV 16 a 18 detegované samostatne ako pozitívne alebo negatívne a ostatných 12 hrHPV typov je detegovaných spoločne.

Test je indikovaný ako súčasť skríningu pacientov s cytologickým nálezom ASC-US na určenie potreby kolposkopie, respektíve na identifikáciu prítomnosti genotypov HPV 16 a HPV 18, pretože ich detekcia je odporúčaná na sledovanie žien, ktoré sú pozitívne na hrHPV a zároveň s cytologicky negatívnymi výsledkami, žien vo veku nad 30 rokov spolu s PAP testom ako súčasť cervikálneho skríningu, ako aj na určenie prítomnosti hrHPV a na identifikáciu prítomnosti typov HPV 16 a HPV 18⁽¹⁶⁾.

Aptima HPV Assay

Aptima HPV Assay je amplifikačný test cieľovej sondy nukleovej kyseliny na *in vitro* kvalitatívnu detekciu E6 a E7 vírusovej mRNA zo 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68)⁽¹⁷⁾. Test nerozlišuje medzi 14 hrHPV, nezisťuje prítomnosť HPV DNA, ale deteguje integráciu vírusového genómu a genetické zmeny v epitelových bunkách krčka maternice. Inak povedané, deteguje prítomnosť hrHPV, ktorých DNA sa už v hostiteľských bunkách exprimuje a v plnej miere sa môže prejavovať karcinogénny efekt vírusu. V tomto prípade ide o detekciu perzistentnej infekcie hrHPV, pri ktorej je takmer istý progres nádorového procesu v epitelových bunkách krčka maternice. Keďže expresia onkogénnych proteínov E6 a E7 pri hrHPV typoch mení funkcie bunkových proteínov p53 a pRB, je dôležité sledovať ich expresiu, pretože vedie k narušeniu kontrolných bodov bunkového cyklu v zmysle malígnej transformácie. Aj z tohto dôvodu sú mRNA testy vhodnejšie pri predikcii CIN2.

Mechanizmus Aptima HPV Assay zahŕňa tri hlavné kroky, ktoré sa vykonávajú v jednej skúmavke: zachytenie cieľa a jeho amplifikácia pomocou transkripčne sprostredkovanej amplifikácie (Transcription – Mediated Amplification – TMA), následná detekcia amplikónov pomocou testu hybridizačnej ochrany (Hybridization Protection Assay – HPA)⁽¹⁷⁾. Detekcia amplikónov je realizovaná próbou jednoreťazovej nukleovej kyseliny chemiluminiscenčne a značené próby špecificky hybridizujú a amplikónom. Značené sondy nukleovej kyseliny hybridizujú špecificky s amplikónom. Selektívna reagencia následne rozlišuje hybridizovanú sondu od nehybridizovanej deaktiváciou značenia nehybridizovanej sondy. Počas detekčného kroku je svetlo vyžarované z označených

hybridov RNA : DNA, merané ako fotónové signály v luminoimetrii, a intenzita je hlásená ako relatívne svetelné jednotky (RLU). Výsledok je interpretovaný ako pozitívny, negatívny alebo invalidný.

Použitie testu je indikované pri nejasných cytologických nálezoch ASC-US, ASC-H alebo u žien starších ako 30 rokov aj pri opakovanom náleze L-SIL. Taktiež po liečbe prekanцерóz, na posúdenie konečného výsledku liečby, respektíve na posúdenie, či je u pacientok vhodné pokračovať v ďalšej diagnostike kolposkopiou alebo biopsiou.

Materiál a metódy

Výber a charakteristika súboru

Do súboru bolo zaradených spolu 3 463 pacientok, ktoré boli vyšetované v časovom období od 1. januára 2017 do 31. decembra 2017. Z celkového ročného súboru pacientok, ktoré v našom laboratóriu diagnostikovali na prítomnosť hrHPV metódou na báze DNA alebo mRNA, boli do súboru zaradené len tie, ktoré podstúpili diagnostiku HPV raz za rok bez ohľadu na opakovaný odber. Štatistická analýza taktiež zahŕňala iba pacientky testované na prítomnosť hrHPV, ktorých bunkové stery z endocervixu a exocervixu boli odobraté do odberovej súpravy ThinPrep Pap Test (Preserv Cyt® Solution), pričom pri vyšetrení prítomnosti HPV bolo takmer každá pacientka podstúpila cervikálne cytologické vyšetrenie a cytologické výsledky boli interpretované podľa Bethesda klasifikačného systému.

Testovanie na báze DNA bolo realizované na 2 126 vzorkách a testovanie na báze mRNA bolo uskutočnené na 1 337 vzorkách. Molekulovogenetickú analýzu zameranú na detekciu prítomnosti L1 génu metódou na úrovni DNA sme vykonali u každej z nich, pričom cytologické vyšetrenie bolo uskutočnené celkovo u 2 113 pacientok. V 6 prípadoch nebolo cytologické vyšetrenie realizované a v 7 prípadoch bola adekvátnosť vzorky nedostačujúca na uskutočnenie analýzy z dôvodov prítomnosti krvi, zápalových elementov, hlienov, pomliaždených buniek, prípadne nesprávnym odberom.

Molekulovogenetickú analýzu zameranú na detekciu prítomnosti perzistentnej HPV infekcie metódou na úrovni mRNA sme vykonali u každej z nich, pričom cytologické vyšetrenie bolo uskutočnené u 1 327 pacientok. V 7 prípadoch bolo cytologické vyšetrenie nerealizované vôbec a v 7 prípadoch bola adekvátnosť vzorky nedostačujúca na uskutočnenie analýzy.

Odber biologického materiálu

Biologický materiál na molekulovogenetickú diagnostiku prítomnosti hrHPV možno odobrať do odberovej súpravy Thin Prep Pap Test (Preserv Cyt® Solution) alebo do odberovej súpravy Aptima® Cervical Specimen Collection Kit. Vzorky odobraté do odberových nádobiek Preserv Cyt® Solution sú stabilné a vhodné na HPV analýzu maximálne 30 dní po odbere. LBC sa uchováva pri laboratórnej teplote. Vzorky odobraté do prepravnej súpravy Aptima® sú stabilné a vhodné na HPV analýzu maximálne 30 dní po odbere, ak sú uchovávané pre teplotu 2 – 8 °C, a maximálne 14 dní po odbere, ak sú uchovávané pri laboratórnej teplote.

Metódy

Na oddelení lekárskej genetiky v Medirexe, a. s., máme dostupné dve testovacie platformy, platformu cobas® 4800 HPV od firmy Roche Molecular Diagnostics (CA, USA) a Aptima HPV Assay z firmy Hologic (CA, USA), pričom obe metódy sú schopné detegovať prítomnosť 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Prístroj cobas® 4800 deteguje amplikóny HPV DNA dlhé 200 bp majoritného kapsidového proteínu L1 metódou Real-Time PCR. Aptima HPV Assay test deteguje HPV E6 a E7 mRNA onkogénnych transkriptov. Pokým cobas® 4800 deteguje hrHPV na úrovni DNA, Aptima HPV Assay deteguje hrHPV onkogénnu mRNA expresiu a je navrhnutý na špecifickejšie vyhodnotenie pri identifikácii významných hrHPV infekcií, ktorá vedie k CIN 2 až CIN 3⁽¹⁸⁾.

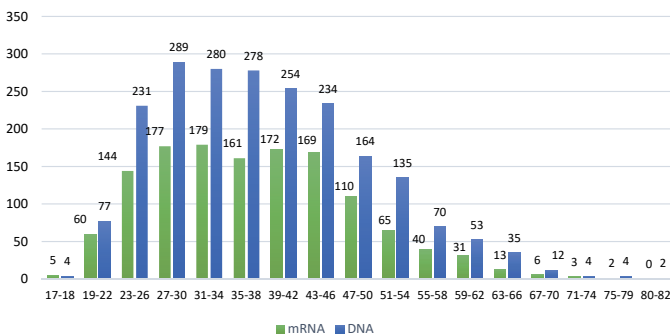
Výsledky a štatistické vyhodnotenie

Cieľom štatistického vyhodnotenia bolo monitorovanie jednotlivých nálezov HPV infekcie a korelácia s cytologickými nálezmi u pacientok analyzovaných molekulovogenetickou diagnostickou metódou cobas® 4800 HPV a Aptima HPV Assay.

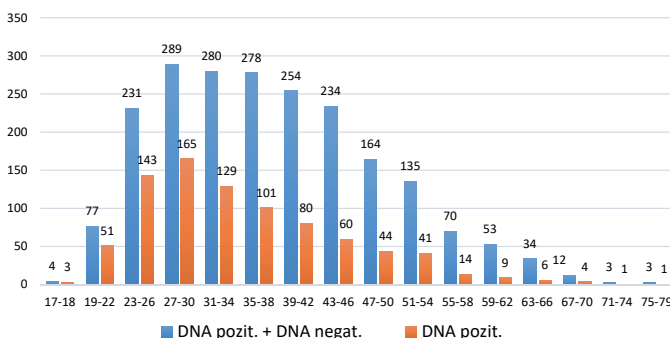
Diskusia

Predmetom našej štatistickej analýzy bolo vyhodnotenie prítomnosti HPV infekcie pacientok s prítomnou, respektíve neprítomnou vysokorizikovou infekciou HPV. Infekcia hrHPV typmi je zodpovedná za vznik cervikálneho karcinómu, ktorého incidencia a mortalita je napriek mnohým preventívnym a skrínovým vyšetreniam stále vysoká.

Graf 1. Počet a vekové rozloženie pacientok testované DNA a mRNA HPV testom



Graf 2. Pomer zastúpenia pacientok v rámci vekových skupín vzhľadom na DNA pozitívne pacientky v porovnaní so všetkými pacientkami testovanými na prítomnosť HPV DNA



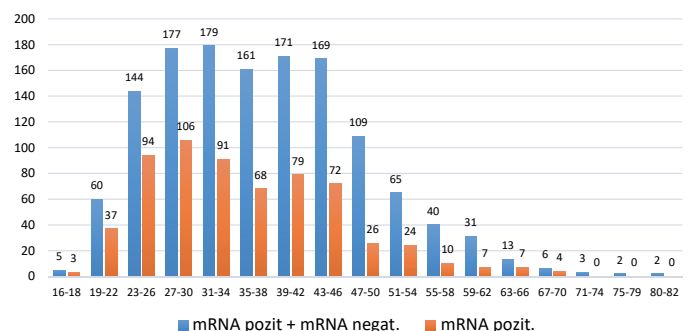
HPV testovanie

V predloženej súbore sme analyzovali spolu 3 463 pacientok, pričom so známym výsledkom z cytologického vyšetrenia sme analyzovali celkovo 3 440 pacientok. Molekulovogenetickú analýzu cobas® 4800 HPV sme použili na identifikáciu prítomnosti hrHPV, a to v kategórii HPV 16, HPV 18 a ostatných hrHPV typov, prípadne infekcie viacerými hrHPV typmi súčasne. V druhom prípade sme vyšetřovali naše pacientky metódou Aptima HPV Assay, s cieľom zistenia prítomnosti perzistentnej formy vírusovej infekcie prostredníctvom detekcie expresie onkogénnych proteínov E6 a E7 mRNA HPV. V roku 2017 sme však nezaznamenali na našom oddelení žiadnu pacientku, ktorá by mala pozitívny nádorový nález – Ca (PAP V). Pre obe testovacie platformy boli celkové pomery hrHPV pozitívnych približne rovnaké a signifikantne podobné rovnako, ako udáva súbor podľa Ovestad et al., 2011⁽¹⁸⁾.

Prevalencia 14 hrHPV typov identifikovaných pomocou oboch detekčných metód viditeľne klesá s rastúcim vekom. Najväčšie zastúpenie mali pacientky vo veku 27 – 34 rokov, čo môžeme sledovať **na grafe 1**, ktorý porovnáva počet a vekové rozloženie pacientok testovaných DNA HPV testom a mRNA HPV testom. Na druhej strane môžeme sledovať, že najnižšia prevalencia HPV pacientok je 67 – 79 rokov. S porovnateľnými údajmi sme sa stretli aj pri pilotnej štúdii, kde autori poukazujú na to, že prevalencia HPV identifikovaná prístrojom cobas® 4800 HPV taktiež klesá s rastúcim vekom⁽²¹⁾. Pri identifikácii HPV bola prítomnosť hrHPV identifikovaná u 30,5 % žien vo veku 21 – 24 rokov, ale vo veku 40 – 44 rokov prevalencia klesla na 7,6 % a pri ženách nad 70 rokov klesla prevalencia HPV na 5 %. Podobné zníženie prevalencie HPV s rastúcim vekom zistili aj pri detekcii HPV 16 a HPV 18⁽¹⁹⁾.

Práve **graf 1** poukazuje na to, že v našom súbore sa nachádzali ženy od 17 do 79 rokov, pričom priemerný vek nami vyšetřených žien bol v čase odberu vzorky 38 rokov. Najširšie zastúpenie v analýze mali ženy vo veku 27 – 46 rokov. Na druhej strane **graf 2** zobrazuje zastúpenie jednotlivých vekových skupín a poukazuje na prítomnosť vírusovej infekcie potvrdenej testovaním prítomnosti DNA HPV vzhľadom na počet všetkých testovaných vzoriek. Prítomnosť vírusovej infekcie bola DNA HPV testom potvrdená pri 853 vzorkách, čo zodpovedalo 40 % všetkých vyšetřovaných vzoriek, **graf 3** poukazuje na prítomnosť aktívnej formy vírusovej infekcie detegovanej metódou na úrovni mRNA, ktorá bola potvrdená

Graf 3. Pomer zastúpenia pacientok v rámci vekových skupín vzhľadom na mRNA pozitívne pacientky v porovnaní so všetkými pacientkami testovanými na prítomnosť mRNA HPV

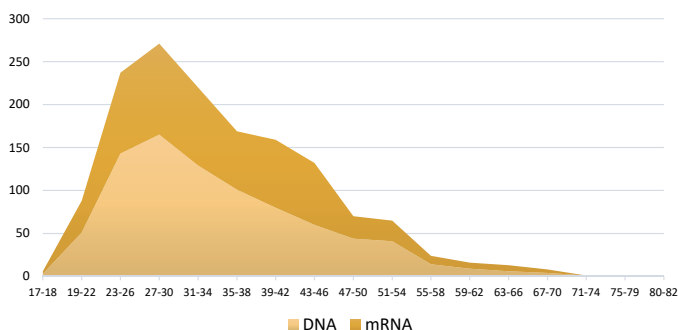


celkovo pri 628 vzorkách, čo predstavovalo 47 % všetkých vyšetrovaných vzoriek. Najväčšie zastúpenie HPV pozitívnych pacientok bolo vo vekovej kategórii od 23 do 24 rokov, a to pri oboch testovacích platformách. Priemerný vek sa však mierne odlišoval, a to nasledovne: pri DNA HPV teste bol priemerný vek v čase odberu vzorky 33 rokov (minimálny vek: 17, maximálny vek: 79) a pri mRNA HPV teste bol priemerný vek v čase odberu vzorky 35 rokov (minimálny vek: 17, maximálny vek: 82) (**graf 4**).

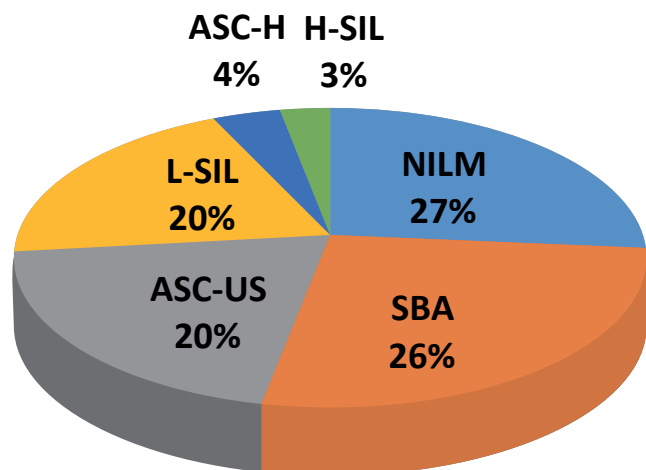
Cytológia vs HPV testovanie

Celkovo bolo v našom súbore zaznamenaných až 53 % vzoriek, ktoré mali výsledky z cervikálnej cytológie negatívne (**graf 5**). Z tohto počtu 27 % vzoriek malo negatívny cytologický nálež NILM a 26 % vzoriek bolo s cytologickým nálezom abnormálnych skvamózných buniek, čo sa však považuje za negatívne vzhľadom na neprítomné cervikálne intraepitelové neoplázie (CIN). V porovnaní so štúdiou, kde bolo analyzovaných 46 887 žien vo vekovom rozpätí 21 – 93 rokov, boli nálezy vo viac ako 90 % negatívne v zmysle intraepitelovej lézie a malignity⁽¹⁹⁾. Prevalencia cytologického nálezu ASC-US a L-SIL bola 20 %, pričom najnižšiu prevalenciu mali cytologické nálezy ASC-H a H-SIL, 4 % a 3 %. V porovnaní so štúdiou máme vyššie percento pacientok s nálezom H-SIL a ASC-H, čo je však spôsobené omnoho nižším počtom analyzovaných vzoriek.

Graf 4. Počet a vekové rozloženie výlučne pozitívnych pacientok testovaných na prítomnosť HPV (DNA) a testovaných na prítomnosť aktívnej formy vírusovej infekcie (mRNA)



Graf 5. Porovnanie jednotlivých cytologických náleзов bez ohľadu na výsledok molekulovogenetického vyšetrenia HPV

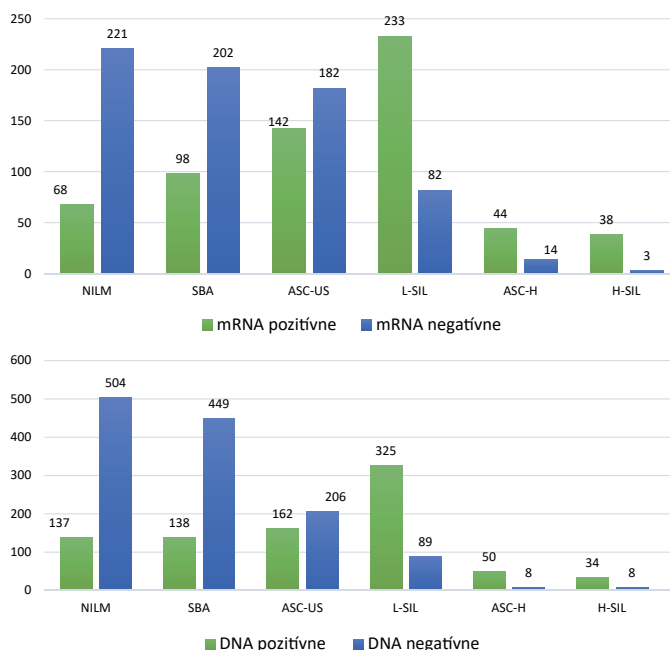


Podiel žien pozitívnych na prítomnosť vírusovej infekcie identifikovanej DNA HPV testom stúpa s nárastom stupňa cervikálnej cytológie. Ženám s cytologickým nálezom L-SIL, ASC-H a H-SIL je preukázaný vyšší počet pozitívnych prípadov oproti negatívnym prípadom (**graf 6**). Z celkového počtu 441 žien s nálezom L-SIL, bola HPV DNA pozitivita zaznamenaná v 80 % prípadov a mRNA HPV pozitivita v 74 % prípadov. Taktiež pri náleze ASC-H sme zaznamenali 86 % (DNA) a 76 % (mRNA) a náleze H-SIL – 81 % (DNA) a 93 % (mRNA). Takisto v porovnaní so štúdiou, kde ženy s nálezom CIN 1 predstavovali 65,5 % a s nálezom CIN 2 83,3 % a CIN 3 92,6 %.

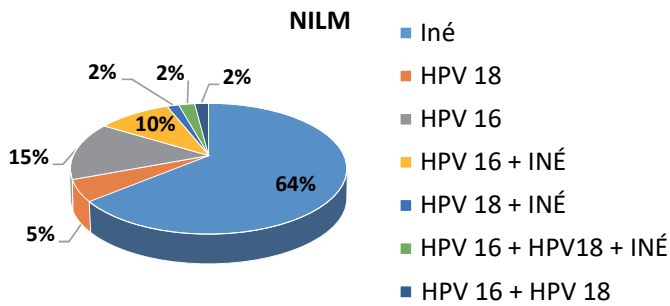
V analyzovanom súbore pacientok bola hrHPV DNA detegovaná v 846 prípadoch, čo predstavuje 40 % z celkového súboru. U žien s cytologickými nálezmi NILM, SBA, ASC-US prevažujú HPV negatívne výsledky. Najčastejšie bola detegovaná kategória tzv. iných HPV v 513 prípadoch, čo predstavuje 61 %. Ďalšia najčastejšie detegovaná bola infekcia typom HPV 16 a koinfekcia HPV 16 spolu s niektorým z iných hrHPV. Kombinácia HPV 16 a HPV 18 bola prítomná len u 0,7 % všetkých pacientok. Pomocou molekulárno-genetického testu cobas® 4800 HPV u pacientok s negatívnou cytológiou (NILM) nebola hrHPV DNA identifikovaná vo väčšine prípadov. V 90 prípadoch bola prítomná DNA ostatných hrHPV, v 2 prípadoch prislúchal výsledok kombinácii HPV 18 s ostatnými hrHPV a kombinácii HPV 16 a HPV 18 (**graf 7**).

U cytologicky negatívnych pacientok bola z celkového súboru 641 žien prítomná infekcia HPV u 137. HrHPV boli diagnostikované v 90 prípadoch, naproti tomu HPV 18 s ostatnými hrHPV a HPV 16 s HPV 18 len v 2 prípadoch. Cytologické výsledky SBA (**graf 8**) korelujú s cytologickými výsledkami NILM. No s týmto výsledkom sa v žiadnom z prípadov nevykytla kombinácia HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV. HPV negatívne výsledky predstavujú 76 %.

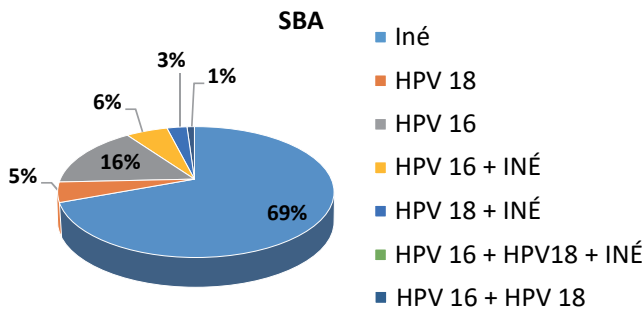
Graf 6. Zastúpenie pozitívnych a negatívnych HPV pacientok vzhľadom na jednotlivé cytologické nálezy



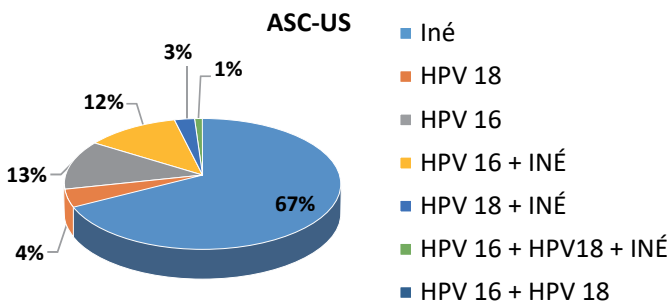
Graf 7. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze NILM



Graf 8. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze SBA



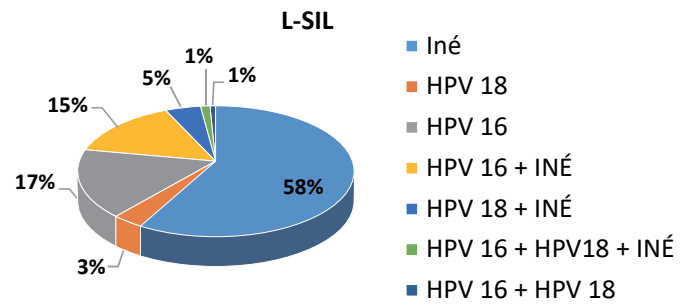
Graf 9. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze ASC-US



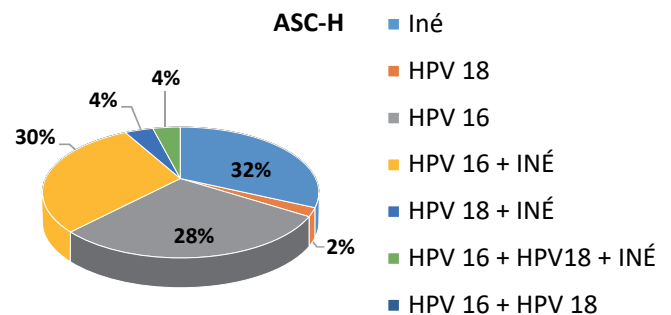
V 364 steroch cytologicky diagnostikovaných ako **ASC-US** bola identifikovaná vírusová DNA ostatných hrHPV v 109 prípadoch, v 20 prípadoch HPV 16 a HPV 16 s ostatnými hrHPV, v 7 prípadoch HPV 18, v 5 prípadoch kombinácia HPV 18 a ostatných hrHPV. Len v 1 prípade kombinácia všetkých hrHPV. Kombinácia HPV 16 s HPV 18 sa nevyskytla u žiadnej pacientky (**graf 9**). Najviac však boli HPV negatívne pacientky.

U 414 pacientok s diagnostikovaným **L-SIL** nebola hrHPV detegovaná v 89 prípadoch, v 190 bola preukázaná DNA ostatných hrHPV a len v jednom prípade kombinácia HPV 16 s HPV 18 (**graf 10**). U pacientok s cytologickým nálezom **ASC-H** sa približne v rovnakom zastúpení vyskytovali ostatné hrHPV, HPV 16 a HPV 16 v kombinácii s hrHPV. Ani

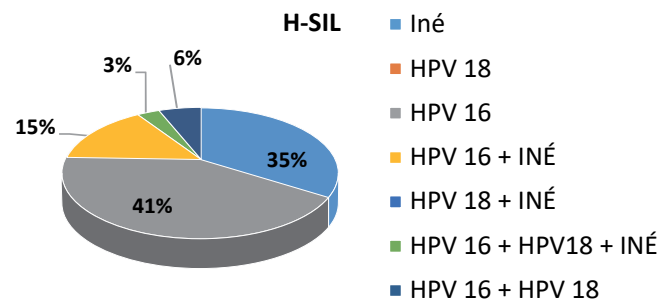
Graf 10. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze L-SIL



Graf 11. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze ASC-H



Graf 12. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze H-SIL



u jednej z pacientok sa nedetegovala súčasná prítomnosť HPV 16 s HPV 18 (**graf 11**). Cytologický nález **H-SIL** bol najviac asociovaný s prítomnosťou HPV 16. V žiadnom výsledku nebola pozorovaná prítomnosť HPV 18 a HPV 18 v kombinácii s ostatnými hrHPV (**graf 12**).

Z našich výsledkov vyplýva, že test Aptima HPV Assay má významne vyššiu špecificitu v predikcii CIN 2 v porovnaní s testom cobas® 4800 HPV (2,6 % vs 1,6 %) ⁽¹⁸⁾. Rovnaká priaznivá špecificita zistená oboma testovacími platformami bola potvrdená aj u Ge et al., 2017. Neustále nové vznikajúce štúdie naznačujú, že mRNA HPV testy sú vo všeobecnosti špecifickejšie (97 %) ako DNA testy, najmä pri detekcii cervikálnych lézií vyšších stupňov ^(16,19).

Záver

Napriek tomu, že cytológia je zatiaľ neoddeliteľnou súčasťou skríningu rakoviny krčka maternice, má niekoľko limitov. Patrí tam pomerne nízka reprodukovateľnosť pri nálezoch ASC-US a L-SIL, nízka špecifickosť ASC-US pre kancerózne nálezy, nutnosť vyššej frekvencie skríninových kontrol, ktorá musí byť minimálne 2 – 3 roky a falošná negativita až do 30 %. V porovnaní s cytológiou má HPV test vyššiu a dlhšie trvajúcu prediktívnu hodnotu, znižuje incidencia karcinómu už počas 4-5 rokov, má o 20 – 45 % vyššiu senzitivitu pre detekciu CIN, ale nižšiu špecifitu (HPV pozitivita je asi 2x

častejšia)⁽²²⁾. Negatívny výsledok DNA HPV testu taktiež poskytuje istotu, že CIN 3 sa nevyvinie v priebehu 3 rokov, na rozdiel od negatívnej cytológie.

V blízkej budúcnosti však môžeme očakávať zmenu v skríninovom programe rakoviny krčka maternice. Cytologické vyšetrenie bolo za posledné roky pre mnohé ženy základným bodom prevencie, avšak z dôvodu nízkej senzitivity tohto vyšetrenia pri detekcii závažných prekanceróz bude nahradené senzitívnejším skríninovým molekulovogenetickým vyšetrením, ktoré deteguje prítomnosť hrHPV typov u pacientky.

LITERATÚRA

1. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science* 2006; 110(5): 525-541.
2. Belleudi F, Nanni M, Raffa S, Torrisi MR. HPV16 E5 deregulates the autophagic process in human keratinocytes. *Oncotarget* 2015; 6(11): 9370.
3. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology* 2010; 11(11): 1048-1056.
5. <https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOVJ-5-80/FIGURE/F1/>
6. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, et al. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 2013; 445(1-2): 224-231.
7. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews* 2003; 16(1): 1-7.
8. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 2015; 64(RR-03): 1.
9. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24: S52-61.
10. Ogbonna FS. Knowledge, attitude, and experience of cervical cancer and screening among Sub-saharan African female students in a UK University. *Annals of African medicine* 2017; 16(1): 18.
11. Gadducci A, Barsotti C, Cosio S, et al. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. *Gynecological Endocrinology* 2011; 27(8): 597-604.
12. Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *Journal of virology* 1991; 65(1): 292.
13. <https://slideplayer.com/slide/6096296/>
14. Chorny JA, Frye TC, Fisher BL, Remmers CL. Human papillomavirus detection with genotyping by the cobas and Aptima assays: Significant differences in HPV 16 detection?. *Diagn Cytopathol* 2018; 46(7): 568-571.
15. Redecha M, Korbel M. Rakovina maternicového krčka a možnosti jej prevencie. *Ambulantná terapia* 2007; 5(3-4): 176-180.
16. http://www.roche.sk/content/dam/roche_slovakia/sk_SK/documents/cobas_4800_HPV_test_sk.pdf
17. https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/AW-14517-001_003_01.pdf
18. Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, et al. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN2–3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN2–3. *Gynecologic oncology* 2011; 123(2): 278-283.
19. Wright Jr TC, Stoler MH, Behrens CM, et al. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *American journal of obstetrics and gynecology* 2012; 206(1): 46-e1.
20. <https://www.kkh.com.sg/HealthPedia/Pages/GynaecologicalCancersCervical.aspx>
21. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder, et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2011; 103(5): 368-383.
22. Rebolj M, Bonde J, Preisler S, et al. Human papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women aged 30 years and above. *PLoS One* 2016; 11(1): e0147326.
23. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, et al. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *International journal of cancer* 2013; 132(1): 101-108.

Mgr. Alexandra Oravcová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: alexandra.oravcova@medirex.sk