

# Genotypowanie wirusów brodawczaka ludzkiego u kobiet z CIN 1

## Human papilloma virus genotyping in women with CIN 1

Kędzia Witold<sup>1,2</sup>, Józefiak Agata<sup>2</sup>, Pruski Dominik<sup>1,2</sup>,  
Rokita Wojciech<sup>3</sup>, Marek Spaczyński<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Onkologii Ginekologicznej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup> Pracownia Patofizjologii GPSK w Poznaniu

<sup>3</sup> Oddział Położnictwa i Ginekologii, Szpital Kielecki NZOZ Św. Aleksandra, Kielce

### Streszczenie

**Wstęp:** Rak szyjki macicy pozostaje problemem diagnostycznym i terapeutycznym w Polsce. Pomimo postępu w tworzeniu aktywnej profilaktyki onkologicznej w naszym kraju, nowotwór ten pod względem wysokości współczynników zachorowalności i umieralności stawia nas na jednym z ostatnich miejsc w Unii Europejskiej. Nadzieję na poprawę sytuacji stwarza uzupełnienie profilaktyki wtórnej o profilaktykę pierwotną, czyli szczepienia przeciwko HPV 16, 18. Epidemiologia poszczególnych typów HPV różni się w zależności od lokalizacji geograficznej badanej populacji. W Polsce, dotąd nie dysponujemy wiarygodnymi danymi o udziale wybranych, onkogennych typów HPV w tworzeniu patologii szyjki macicy. Wiedza ta umożliwi oszacowanie potencjalnej skuteczności profilaktyki pierwotnej wraz z oceną opłacalności ekonomicznej jej wprowadzenia.

**Cel pracy:** Identyfikacja najczęściej występujących, onkogennych typów HPV u kobiet z rozpoznaniem CIN 1, pochodzących z Polski Środkowo-Zachodniej.

**Materiał:** W toku przeprowadzonych badań dokonano genotypowania 13 typów wirusów brodawczaka ludzkiego u 126 kobiet DNA HPV pozytywnych, z rozpoznaniem CIN 1.

**Metoda:** Każdy materiał komórkowy, w którym identyfikowano obecność DNA HPV 13 typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego był kolejno poddawany genotypowaniu molekularnemu za pomocą testu Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics) na obecność 37 genotypów HPV.

**Wyniki:** Do pięciu najczęściej występujących onkogennych typów HPV zaliczono w kolejności wykrywania: 16, 33, 18, 31, 45. Razem te pięć typów wirusa stanowiło 92,05% (139/151) wszystkich wykrytych wirusów brodawczaka ludzkiego.

### Adres do korespondencji:

Witold Kędzia

Klinika Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu

60-535 Poznań, ul. Polna 33

tel. 61 841 92 71, fax 61 841 94 65

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

Otrzymano: 15.06.2010  
Zaakceptowano do druku: 01.09.2010

Kędzia W, et al.

**Wnioski:** U kobiet z rozpoznaniem CIN 1, pochodzących z Polski Środkowo-Zachodniej, stwierdzono najczęstsze występowanie HPV 16 (53,97%), a następnie odpowiednio HPV 33 (21,3%), HPV 18 (16,67%), HPV 31 (10,32%), HPV 45 (7,94%), HPV 52 (1,59%).

Profilaktyka pierwotna oparta o szczepienia przeciwko HPV 16 i 18 powinna zapewnić ochronę przed zakażeniem dwoma z trzech najczęściej występujących genotypów HPV, u kobiet z rozpoznaniem CIN 1 w Polsce Środkowo-Zachodniej.

Słowa kluczowe: **genotypy HPV / epidemiologia HPV / śródnabłonkowa neoplazja niskiego stopnia CIN 1 / rak szyjki macicy / profilaktyka pierwotna raka szyjki macicy /**

## Abstract

**Introduction:** Cervical cancer remains a considerable diagnostic and therapeutic problem in Poland. Despite progress in creating an active cancer prevention program in our country, Poland occupies one of the last places in the EU in terms of cervical cancer morbidity and mortality. Supplement of secondary prevention of primary prophylaxis – HPV 16, 18 vaccination, offers hope for improvement of the situation. Epidemiology of individual HPV types differs, depending on the geographical location of the study population. So far in Poland, we have had no reliable data on the participation of selected oncogenic HPV types in the development of cervical pathology.

**Objective:** Identification of the most frequent, oncogenic HPV types in women diagnosed with CIN 1, from the Central and Western Poland.

**Material:** In the course of the conducted studies, genotyping of 13 types of human papilloma virus has been done in 126 HPV DNA-positive women diagnosed with CIN 1.

**Method:** Each cell material in which the presence of HPV DNA identified 13 types of oncogenic human papillomavirus was subsequently subjected to genotyping using the molecular test – Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics).

**Results and conclusion:** In women from the Central and Western Poland diagnosed with CIN 1, HPV 16 (53,97%) was the most common, followed by HPV 33 (21,3%), HPV 18 (16,67%), HPV 31 (10,32%), HPV 45 (7,94%), HPV 52 (1,59%).

Current HPV vaccines are designed to protect against two of the three most common genotypes, in women diagnosed with CIN 1 in Central and Western Poland.

Key words: **HPV genotypes / HPV epidemiology / low grade cervical intraepithelial neoplasia – CIN 1 / cervical cancer / primary prevention for cervical cancer /**

## Wstęp

Pomimo stopniowego obniżania zachorowalności na raka szyjki macicy spowodowanego głównie efektywnością badań profilaktycznych, nowotwór ten wciąż stanowi ogromny problem diagnostyczny i terapeutyczny w Europie.

W roku 2004 europejskie rejestry onkologiczne odnotowały 34 300 nowych zachorowań i 16 300 zgonów spowodowanych rakiem szyjki macicy [1].

Według *Agency for Research on Cancer*, Polskę cechuje wciąż wysoka zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy. Najwyższa liczba zgonów w przeliczeniu na 100 tys. kobiet dotyczy Rumunii (13,7) i Litwy (10,0) [2]. Niższe wartości standaryzowanego współczynnika umieralności zamykające się w przedziale od 7,50-8,99 odnoszą się do Bułgarii i Łotwy. Polska pod kątem zgonów spowodowanych rakiem szyjki macicy jest oceniana na równi z Estonią i Austrią. Umieralność w tych trzech krajach ocenia się na 6,00-7,49 na 100 tys. kobiet [3, 4, 5].

Podstawowym czynnikiem inicjującym rozwój raka szyjki macicy jest przetrwała infekcja wywołana onkogennymi typami HPV.

Według danych opublikowanych w Raporcie WHO z 2007 roku, w Europie Środkowo-Wschodniej, do najczęściej występujących onkogennych typów HPV u kobiet z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego należą: HPV 16, HPV 31, HPV 18 i HPV 66 [4]. Natomiast identyfikacja molekularna obecności HPV u chorych na raka szyjki macicy wykazała, że najczęściej wykrywa się typy HPV: 16, 18, 45 i 31 [2, 6].

Wiarygodne dane o rozpowszechnieniu poszczególnych typów HPV w Europie Środkowo-Wschodniej mogą mieć wymierne znaczenie zarówno dla planowania skutecznej profilaktyki pierwotnej jak również opracowania nowych narzędzi diagnostycznych.

## Cel pracy

Identyfikacja najczęściej występujących, onkogennych typów HPV u kobiet z rozpoznaniem CIN 1 pochodzących z Polski Środkowo-Zachodniej, celem oceny zasadności rozwoju profilaktyki pierwotnej przeciwko HPV 16 i 18.

## Materiał

Na potrzeby testu molekularnego identyfikującego obecność DNA 13 typów wirusów onkogennych pobrano wymazy szczoteczką *cyto-brush* od 126 kobiet z rozpoznaniem CIN I. Pacjentki zakwalifikowane do badań były diagnozowane w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu. Pacjentki pochodziły z centralnej i zachodniej części Polski. Rozpoznanie CIN 1 formułowano w wyniku przeprowadzonej kolposkopii i biopsji miejsc podejrzanych.

## Metoda

Każdy materiał komórkowy, w którym identyfikowano obecność DNA HPV 13 typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego był kolejno poddawany genotypowaniu molekularnemu za pomocą testu *Linear Array HPV Genotyping* (Roche Diagnostics).

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  $\beta$  globiny.

## Wyniki

Do pięciu najczęściej występujących onkogennych typów HPV zaliczono w kolejności wykrywania: 16, 33, 18, 31, 45. Razem te pięć typów wirusa stanowiło 92,05% (139/151) wszystkich wykrytych wirusów brodawczaka ludzkiego. (Tabela I, wykres 1).

## Dyskusja

W roku 2003 Clifford i wsp. opublikowali meta-analizę 53 doniesień naukowych opisujących występowanie poszczególnych, onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL wg TBS [7].

Prawie połowa analizowanych danych, bo aż 49% pochodziła z Europy, reszta badań dotyczyła Ameryki Północnej (29%), Afryki i Azji (3%). Autorzy publikacji zwracali uwagę na fakt różnej interpretacji i jakości badań cytologicznych, weryfikacji histopatologicznej oraz czułości i swoistości wykorzystanych metod detekcji molekularnej obecności DNA HPV HR. Genotypowanie wyników wyłącznie LSIL/DNA HPV HR pozytywnych, których wyszukano 5910, wykazało najczęstszą identyfikację

typu – 16 HPV (26%), a następnie – 31 HPV (12%), – 51 HPV (11%), – 53 HPV (10%), – 56 HPV (10%), – 52 HPV (9%), – 18 HPV (9%), – 66 HPV (9%) i – 58 HPV (8%).

U pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym LSIL stwierdzono również wiele innych typów HPV, które wykryto u 5% badanych. Na kształt uzyskanych w tej meta-analizie danych wpływ miał niewątpliwie fakt, że tylko 36% analizowanych pacjentek miało potwierdzoną histologicznie obecność CIN I, czyli zmiany LG SIL (*low grade squamous intraepithelial lesion*).

Wśród pozostałych 64% były z pewnością nieistotne klinicznie zakażenia incydentalne, połączone z rozległą koilocytozą, widoczną cytologicznie, i histologicznie. Porównanie wyników Clifforda z danymi przedstawionymi w ramach niniejszej pracy dowodzi przede wszystkim najczęstszego występowania zakażenia lub obecności DNA HPV 16 u kobiet z podejrzeniem lub faktycznym rozwojem CIN I. Kolejna zgodność obu doniesień to obecność wśród 9 najczęściej występujących typów onkogennych HPV, wirusów oznaczonych jako 31, 18, 52, 66, 58. Zaskakujący jest brak w meta-analizie typów 33, 45, które według licznych doniesień zajmują stosunkowo wysokie miejsce w porównaniach opisujących ich częstość występowania u kobiet z LSIL lub LG SIL. (Tabela II).

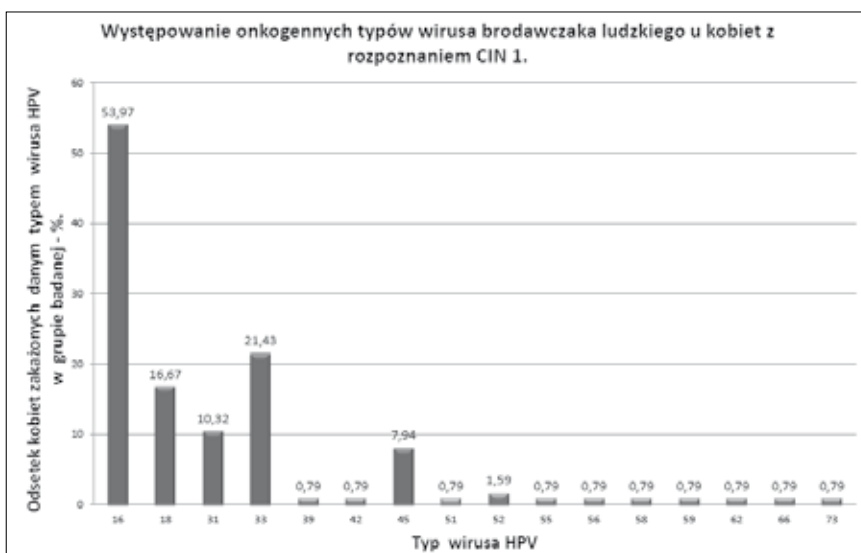
**Tabela II.** Porównanie meta-analizy (53 ośrodki badawcze, 5910 kobiet z LSIL) z wynikami własnymi. Poszczególne typy HPV wymienione w kolejności częstości wykrywania [7].

Meta-analiza N = 5910 kobiet LSIL (36% CIN 1)	N = 126 kobiet z CIN 1
TYPY HPV:	TYPY HPV:
16	16
31	33
51	18
53	31
56	45
52	52
18	51, 56, 58, 66
66	
58	

**Tabela I.** Wyniki genotypowania wirusów brodawczaka ludzkiego u 126 kobiet z rozpoznaniem CIN 1, gdzie n-liczba wykrytych genotypów danego wirusa, % – dotyczy odsetka kobiet zakażonych danym typem wirusa w grupie badanej liczącej 126 pacjentek.

Typ HPV	16	18	31	33	39	42	45	51	52	55	56	58	59	62	66	73
N	68	21	13	27	1	1	10	1	2	1	1	1	1	1	1	1
%	53,97	16,67	10,32	21,43	0,79	0,79	7,94	0,79	1,59	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79

Kędzia W, et al.



Wykres 1. Porównanie liczby wykrytych genotypów onkogennych HPV wśród 126 kobiet z rozpoznaniem CIN 1.

Według najnowszych danych WHO/ICO *Information Centre and Cervical Cancer* opublikowanych w roku 2010, rozpowszechnienie poszczególnych, onkogennych typów HPV wśród kobiet Europy Wschodniej z rozpoznanymi zmianami typu LG SIL przedstawia się następująco: HPV 16 27,8%, HPV 82 10,9%, HPV 66 8,2%, HPV 31 5,8%, HPV 58 5,7%, HPV 18 4,8%, HPV 70 4,1%, HPV 73 4,1%, HPV 39 2,2%, HPV 33 2,0% [5].

Porównanie tych trzech doniesień, z których jedno autorstwa Clifforda reprezentuje globalną analizę występowania poszczególnych typów HPV u kobiet ze zmianami LG SIL, a dwa pozostałe analizują sytuację w Europie Wschodniej i w Polsce wykazuje istnienie pewnych cech wspólnych, ale również znacznych rozbieżności. Przede wszystkim najczęstszym typem wirusa wykrywanym u kobiet z rozpoznaniem CIN 1 jest HPV 16. Na jego najwyższe rozpowszechnienie nie ma wpływu lokalizacja geograficzna badanej populacji.

Najwyższe rozpowszechnienie HPV 16 obserwuje się w Polsce (53,97%) i Europie Wschodniej (27,80%) w porównaniu do danych globalnych (26%). Wśród pięciu najczęściej wykrywanych typów wirusa, u kobiet z rozpoznaniem LG SIL, występują dwa typy: HPV 16 i HPV 31. Dane o występowaniu HPV 31 w Polsce, uzyskane w toku realizacji niniejszej pracy, są zbliżone do wartości globalnych i wynoszą odpowiednio 10,32% vs 12,0%. (Tabela 1, wykres 1).

Wśród dziesięciu najczęściej wykrywanych typów HPV u kobiet z rozpoznaniem LG SIL występują: HPV 16 (pierwszy pod kątem najczęstszego występowania), 31 (średnio, trzeci pod kątem najczęstszego występowania), 18 (odpowiednio piąty). Wyniki rozpowszechnienia genotypów HPV u kobiet z rozpoznaniem LG SIL uzyskane w toku realizacji niniejszej pracy są zbliżone do danych zawartych w cytowanym raporcie WHO/2010 dla Europy Wschodniej charakteryzujących kobiety z rozpoznaniem HG SIL (*high squamous intraepithelial lesion*) i rakiem szyjki macicy [7].

Wśród pięciu najczęściej występujących typów HPV u tych kobiet podaje się: HPV 16, 33, 18, 31, 39 dla HG SIL i 16, 18, 45, 31, 52 dla raka szyjki macicy.

Obecność na czele współczynników epidemiologicznych charakteryzujących najwyższe rozpowszechnienie HPV 16 na pierwszym miejscu i 18 na trzecim wśród kobiet z rozpoznaniem LG SIL, w Polsce potwierdza oczekiwaną, wysoką skuteczność pierwotnej profilaktyki raka szyjki macicy za pomocą szczepionki zawierającej VLP 16 i 18.

## Wnioski

1. U kobiet z rozpoznaniem CIN 1, pochodzących z Polski Środkowo-Zachodniej, stwierdzono najczęstsze występowanie HPV 16 (54%), a następnie odpowiednio HPV 33 (21,3%), HPV 18 (16,67%), HPV 31 (10,32%), HPV 45 (7,94%), HPV 52 (1,59%).
2. Profilaktyka pierwotna oparta o szczepienia przeciwko HPV 16 i 18 powinna zapewnić ochronę przed zakażeniem dwoma z trzech najczęściej występujących genotypów HPV, u kobiet z rozpoznaniem CIN 1 w Polsce Środkowo-Zachodniej.

*Praca zrealizowana z funduszy KBN: N406 046 31/1358*

## Piśmiennictwo

1. Arbyn M, Raihu A, Autier P, [et al.]. Burden of cervical Cancer in Europe: estimates for 2004. *Ann Oncol.* 2007, 18, 1708-1715.
2. IARC. Cervix Cancer Screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Lyon: IARCPress, 2005, Vol 10.
3. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Skryning raka szyjki macicy w kraju i na świecie. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 354-360.
4. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer 2007. <http://www.who.int>.
5. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer 2010. <http://www.who.int>.
6. 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.
7. Clifford G, Rana R, Franceschi S, [et al.]. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14, 1157-1164.