

Korelacja pozytywnego wyniku testu na DNA HPV HR oraz genotypowania wirusów brodawczaka ludzkiego z obecnością CIN u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL

The correlation of a positive DNA HPV HR test and genotyping human papilloma viruses with the presence of CIN, in women with cytologic evidence of ASC-US and LSIL

Będziński Maciej¹, Józefiak Agata², Szczepańska Małgorzata⁴, Pruski Dominik^{2,3}, Kędzia Witold^{2,3}, Spaczyński Marek³

¹ Zakład Wirusologii Molekularnej UAM w Poznaniu

² Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK w Poznaniu

³ Klinika Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu

⁴ Klinika Rozrodczości UM w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp: Algorytm diagnostyczny dla kobiet z rozpoznaniem ASC-US zakłada możliwość wykonania testu molekularnego na DNA HPV HR, kolposkopii lub powtórnego badania cytologicznego.

Najnowsze propozycje modyfikacji algorytmu diagnostycznego w sytuacji rozpoznania cytologicznego LSIL polegają na próbie wykonania testu molekularnego na obecność DNA HPV HR i/lub genotypowania wirusów brodawczaka ludzkiego ze szczególnym wskazaniem na typ 16. Propozycje te zakładają wykonanie kolposkopii u kobiet DNA HPV HR lub DNA HPV 16 (+).

Materiał i metoda: Do badań zakwalifikowano 67 kobiet z ASC-US i 48 kobiet z LSIL.

U wszystkich 115 kobiet wykonano test molekularny Amplicor HPV Roche Diagnostics identyfikujący obecność którejkolwiek z 13 onkogennych typów DNA HPV. U 14 kobiet z rozpoznaniem LSIL, DNA HPV HR (+) wykonano dodatkowo identyfikację obecnych genotypów HPV. U wszystkich kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL przeprowadzono badanie kolposkopowe.

Adres do korespondencji:

Witold Kędzia
Klinika Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel. 061 841 93 30
e-mail: onko@gpsk.am.poznan.pl

Otrzymano: 12.06.2008

Zaakceptowano do druku: 01.07.2008

Będziński M, et al.

Wyniki: Wśród badanych 67 kobiet z ASC-US, 31 miało dodatni test na obecność któregośkolwiek z 13 HPV HR, z czego, u 12 wynik badania patomorfologicznego potwierdził obecność co najmniej CIN 1.

U żadnej z 36 pacjentek z ASC-US, DNA HPV HR (-), nie potwierdzono obecności CIN. Dla 29 kobiet z LSIL uzyskano dodatni wynik testu na obecność któregośkolwiek z 13 HPV HR. U 11 pacjentek z tej grupy rozpoznano co najmniej CIN 1. Kolejne 19 kobiet z LSIL miało ujemny wynik testu na DNA HPV HR. U żadnej z pacjentek DNA HPV HR (-) nie potwierdzono obecności CIN. DNA HPV 16 stwierdzono u 5/9 badanych kobiet z LSIL, bez CIN. U 5 pacjentek z LSIL, poddanych genotypowaniu HPV, u których rozpoznano CIN, 4/5 były DNA HPV 16 (+).

Do najczęściej występujących typów HPV u kobiet z LSIL oraz obecnością CIN zaliczono; HPV 16, HPV 31.

Wnioski:

1. Ujemny wynik testu DNA HPV HR precyzyjnie identyfikuje kobiety z ASC-US i LSIL, bez CIN.

2. Genotypowanie wyłącznie DNA HPV 16 u kobiet z LSIL, w celu wykrycia CIN charakteryzuje niższa czułość i swoistość w porównaniu do uniwersalnego testu na 13 onkogennych typów wirusów HPV.

Słowa kluczowe: **wirus brodawczaka ludzkiego / diagnostyka molekularna / ASC-US atypical squamous cells of undetermined significance / LSIL low squamous intraepithelial lesion /**

Abstract

Introduction: Diagnostic algorithm for women with ASC-US presumes the possibility of performing molecular test for DNA HPV HR, colposcopy or repeated cytology. The latest suggestions of diagnostic algorithm modification in case of cytologic interpretation of LSIL, are based on trial of performing molecular DNA HPV HR test and/or genotyping human papilloma viruses with the special indication for type 16. These suggestions presume performing colposcopy in women with DNA HPV HR or DNA HPV 16 (+).

Material and method: Triage study included 67 women with ASC-US and 48 women with LSIL. All 115 women were examined with the use of molecular test Amplicor HPV Roche Diagnostics, which identifies the presence of any out of 13 oncogenic DNA HPV types. 14 women with LSIL DNA HPV HR (+) interpretation, were additionally tested for identification of HPV genotypes presence. In all women with cytologic evidence of ASC-US and LSIL, a colposcopic examination was further performed.

Results: Among 67 examined women with ASC-US interpretation, 31 had a (+) test for the presence of any out of 13 HPV HR, while in 12 patients, the result of pathomorphological examination confirmed at least the presence of CIN 1. In none of 36 patients with ASC-US, DNA HPV HR (-) interpretation, the presence of CIN was confirmed. For 29 women with LSIL, (+) test result for any out of 13 HPV HR was obtained. In 11 patients out of this group, at least the presence of CIN 1 was recognized. Following 19 women with LSIL had a negative test result for DNA HPV HR. In none of the patients with DNA HPV HR (-), the presence of CIN was confirmed. DNA HPV 16 was recognized in 5/9 patients with LSIL, without CIN. In 5 patients with LSIL, who underwent HPV genotyping, and were diagnosed for CIN, 4/5 were DNA HPV 16 (+). The most common HPV types in women with LSIL and the presence of CIN include; HPV 16 and HPV 31.

Conclusions:

1. Negative DNA HPV HR result, identifies precisely women with ASC-US and LSIL, without CIN.

2. Genotyping exclusively DNA HPV 16 in women with LSIL, in order to detect CIN is characterized by lower sensitivity and specificity in comparison with universal test for 13 oncogenic HPV types.

Key words: : **Human Papilloma Virus, molecular test / ASC-US atypical squamous cells of undetermined significance / LSIL low squamous intraepithelial lesion /**

Wstęp

Doświadczenia państw, które od lat sześćdziesiątych prowadzą aktywny, populacyjny skrining cytologiczny i osiągnęły co najmniej 60% zgłaszalność do badań, wskazują, że odsetek wyników nieprawidłowych oscyluje pomiędzy 5%-7%.

Za przykład można wskazać Anglię i Walię gdzie zgłaszalność do badań przekroczyła w latach dziewięćdziesiątych 70%, a odsetek nieprawidłowych rozpoznań cytologicznych nieznacznie przewyższył 7%. Wszędzie tam gdzie rozmazy cytologiczne klasyfikuje się według zalecanej również w Polsce skali *The Bethesda System* (TBS) najczęściej formułowanym

nieprawidłowym rozpoznaniem cytologicznym jest ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance*). W USA odsetek ASC-US stanowi 67% wśród wszystkich nieprawidłowych rozpoznań cytologicznych. W Anglii i Walii wśród 7,8% wyników nieprawidłowych wymazów cytologicznych 3,8% stanowią rozpoznania ASC-US [1, 2].

Kolejnym pod względem częstości formułowania rozpoznaniem cytologicznym jest LSIL (*low squamous intraepithelial lesion*). Zmiany niskiego stopnia korelujące prawdopodobnie z CIN 1 obserwowane są odpowiednio u 2,2% kobiet z nieprawidłowym wynikiem oceny rozmazu cytologicznego w USA [3].

Algorytm diagnostyczny dla kobiet z rozpoznaniem ASC-US zakłada możliwość wykonania testu molekularnego na DNA HPV HR, kolposkopii lub powtórnego badania cytologicznego [4, 5]. Rozpoznanie cytologiczne LSIL jest wskazaniem do wykonania kolposkopii i biopsji miejsc podejrzanych. Najnowsze propozycje modyfikacji algorytmu diagnostycznego w sytuacji rozpoznania cytologicznego LSIL polegają na próbie wykonania testu molekularnego na obecność DNA HPV HR i/lub genotypowania wirusów brodawczaka ludzkiego ze szczególnym wskazaniem na typ 16. Propozycje te zakładają wstępnie konieczność wykonania kolposkopii u kobiet DNA HPV HR lub DNA HPV 16 pozytywnych [6, 7].

Materiał i metoda

Do badań zakwalifikowano 67 kobiet uczestniczących w skriningu cytologicznym z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i 48 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL. U wszystkich 115 kobiet wykonano uniwersalny test molekularny Amplicor HPV Roche Diagnostics identyfikujący w materiale komórkowym pobranym z szyjki macicy obecność któregośkolwiek z 13 onkogennych typów DNA HPV. U 14 kobiet z rozpoznaniem LSIL, DNA HPV HR (+) wykonano dodatkowo identyfikację obecnych genotypów HPV. U wszystkich kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL przeprowadzono badanie kolposkopowe identyfikując miejsca podejrzane w celu wykonania biopsji jak również wykonano diagnostyczną abrazję kanału szyjki macicy w celu wykluczenia patologii dotyczącej komórek *endocervix*.

Wyniki

Wśród badanych 67 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, 31 miało pozytywny wynik uniwersalnego testu molekularnego na obecność któregośkolwiek z 13 onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego, z czego, u 12 wynik badania patomorfologicznego potwierdził obecność co najmniej CIN 1. U żadnej z 36 pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, DNA HPV HR negatywnej nie potwierdzono obecności śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Czułość testu molekularnego wykrywającego DNA HPV HR, użytego do wykrycia CIN u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US wyniosła 100,0%, swoistość 65,0%. Dla 29 kobiet włączonych do badania z rozpoznaniem cytologicznym LSIL uzyskano pozytywny wynik uniwersalnego testu na obecność któregośkolwiek z 13 onkogennych typów HPV. U 11 pacjentek z tej grupy rozpoznano obecność co najmniej CIN 1. Kolejne 19 kobiet z rozpoznaniem LSIL miało ujemny wynik uniwersalnego testu molekularnego na DNA HPV HR. U żadnej z pacjentek DNA HPV HR negatywnej nie potwierdzono obecności śródnabłonkowej neoplazji. (Tabela I).

Czułość testu molekularnego wykrywającego DNA HPV HR, użytego do wykrycia CIN u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL wyniosła 100%, swoistość 51%.

Wśród 14 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL, DNA HPV HR pozytywnych, które poddano następnie genotypowaniu, u 9 pacjentek nie rozpoznano obecności CIN. DNA HPV 16 stwierdzono u 5/9 kobiet bez śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. U 5 pacjentek poddanych genotypowaniu HPV, u których rozpoznano CIN, 4/5 były DNA HPV 16 pozytywne. (Tabela II).

Do najczęściej występujących typów HPV u kobiet z rozpoznaniem LSIL oraz obecnością CIN zaliczono: HPV 16 (4 pacjentki z CIN), HPV 31 (4 pacjentki z CIN). Czułość testu molekularnego na obecność DNA HPV 16, użytego do wykrywania CIN u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL wyniosła 80,0%, swoistość 44,4%.

Dyskusja

Wśród 55 milionów wymazów cytologicznych wykonywanych co roku w USA, 6%-7% jest klasyfikowana jako nieprawidłowe. Akceptowany przez ASCCP (*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) algorytm postępowania diagnostycznego przy rozpoznaniu cytologicznym ASC-US dopuszcza jako wskazanie do kolposkopii pozytywny wynik molekularnego testu na obecność DNA HPV HR (*high risk*) wysokiego ryzyka onkogenego. Wykorzystanie tego zalecenia w praktyce pozwala co roku na odstępianie od wykonania kolposkopii u około 1,5 miliona kobiet z ASC-US, DNA HPV HR negatywnych. Porównywalna liczba pacjentek z ASC-US, DNA HPV HR pozytywnych jest diagnozowana kolposkopowo, co pozwala m.in. rozpoznać w tej grupie kobiet blisko 180 tysięcy CIN 3 rocznie [8, 9].

Tabela I. Wyniki uniwersalnego testu molekularnego na obecność DNA HPV HR dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL, z podziałem na pacjentki, u których stwierdzono lub wykluczono obecność co najmniej CIN 1.

| ASC-US n=67 | | | |
|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| DNA HPV HR (+) n=31 | | DNA HPV HR (-) n=36 | |
| Nie rozpoznano CIN | Rozpoznano CIN | Nie rozpoznano CIN | Rozpoznano CIN |
| 19 | 12 | 36 | - |
| LSIL n=48 | | | |
| DNA HPV HR (+) n=29 | | DNA HPV HR (-) n=19 | |
| Nie rozpoznano CIN | Rozpoznano CIN | Nie rozpoznano CIN | Rozpoznano CIN |
| 18 | 11 | 19 | - |

Tabela II. Wyniki genotypowania DNA HPV 16 wykonane u 14 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL, i pozytywnym wynikiem uniwersalnego testu na obecność któregośkolwiek z 13 onkogennych typów HPV.

| LSIL, HPV DNA HR (+) n=14 | | | |
|---------------------------|----------------|--------------------|----------------|
| DNA HPV 16 (+) n=9 | | DNA HPV 16 (-) n=5 | |
| Nie rozpoznano CIN | Rozpoznano CIN | Nie rozpoznano CIN | Rozpoznano CIN |
| 5 | 4 | 4 | 1 |

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki potwierdzają przydatność kliniczną testu na obecność DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US. Czulość testu molekularnego na obecność DNA HPV HR dla pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US sięga w naszych badaniach 100%. U żadnej z diagnozowanych pacjentek ASC-US, DNA HPV HR ujemnych nie rozpoznano zarówno CIN ani tym bardziej zaawansowanej patologii szyjki macicy.

Analogiczny rezultat uzyskany dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL wskazuje na potencjalną przydatność diagnostyki molekularnej DNA HPV HR również dla tej grupy pacjentek.

Z drugiej strony swoistość diagnostyki molekularnej dla identyfikacji CIN w grupie kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US osiągnęła wartość 65%, a z rozpoznaniem LSIL 51%. Test molekularny DNA HPV HR może być stosowany samodzielnie w diagnostyce śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Proponowane wykorzystanie genotypowania DNA HPV 16 ma w założeniu zwiększyć swoistość wykrywania CIN u kobiet z nieprawidłowym wynikiem oceny rozmazu cytologicznego [10]. Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza występowania typu HPV 16 dla 14 kobiet z rozpoznaniem LSIL powinna być traktowana jako doniesienie wstępne. Wykazana czulość wykrycia CIN w wyniku oznaczenia tylko DNA HPV 16 obniżyła się do 80%, a swoistość spadła do 44,4%. Wyniki te nie są zadowalające. Koncepcja wykorzystania genotypowania DNA HPV do precyzyjnego wykrywania CIN powinna zakładać oznaczanie przynajmniej dwóch najczęściej występujących typów onkogennych wirusów, czyli 16 i 18, identyfikowanych w blisko 70% raków szyjki macicy.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy oraz dane epidemiologiczne, wskazują na konieczność uzupełnienia typów HPV HR przeznaczonych do genotypowania u kobiet z LSIL o HPV 31 i HPV 45 [10]. W badaniach na szerszej populacji należy zweryfikować wpływ wieku badanych kobiet na swoistość diagnostyki molekularnej użytej do wykrywania śród nabłonkowej neoplazji. Ze względu na duże rozpowszechnienie incydentalnych zakażeń HPV w populacji kobiet, bez patologii szyjki macicy, w wieku poniżej 35 roku życia, należy sugerować użycie tego testu w badaniach przesiewowych dla badanych powyżej wskazanego progu wiekowego [10].

Wnioski

1. Ujemny wynik testu DNA HPV HR precyzyjnie identyfikuje kobiety z ASC-US i LSIL, bez CIN.
2. Genotypowanie wyłącznie DNA HPV 16 u kobiet z LSIL, w celu wykrycia CIN charakteryzuje niższą czulość i swoistość w porównaniu do uniwersalnego testu na 13 onkogennych typów wirusów HPV.

Piśmiennictwo

1. Kotarski J, Kędzia W. Zasady wykorzystywania diagnostyki molekularnej identyfikującej DNA onkogennych typów HPV w wykrywaniu śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy. *Ginekologia po Dyplomie*. 2007, 9, 49-55.
2. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Skrining raka szyjki macicy w kraju i na świecie. *Ginekol Pol*. 2007, 5, 354-360.
3. Wright J, Rader J, Davila R, [et al.]. Human papillomavirus triage for young women with atypical squamous cells of undetermined significance. *Obstet Gynecol*. 2006, 107, 822-829.
4. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, [et al.]. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet*. 2003, 362, 1871-1876.
5. Polskie Towarzystwo Ginekologiczne. Rekomendacje PTG dotyczące diagnostyki, profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy. *Ginekol Pol*. 2006, 77, 655-659.
6. Kauffman R, Adam E, Icenogle J, [et al.]. Human papillomavirus testing as triage for atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions: sensitivity, specificity, and cost-effectiveness. *Am J Obstet Gynecol*. 1997, 4, 930-936.
7. Ronco G, Cuzick J, Segnan N, [et al.]. HPV triage for low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Eur J Cancer*. 2007, 43, 476-480.
8. Kirby T, Warner K. HPV Triage of patients with ASCUS cervical Pap smears. *Sexuality, Reproduction and Menopause*. 2004, 3, 146-153.
9. Manos M, Kinney W, Hurley L, [et al.]. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA*. 1999, 281, 1605-1610.
10. Wright T, Schiffman M, Solomon D, [et al.]. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*. 2004, 103, 304-309.