

Distribuția genotipurilor virusului papiloma uman la paciente din zona Moldovei

Human papilloma virus distribution in patients from Moldova region

Demetra Gabriela Socolov¹, Gabriela Anton²,
E. Anton¹, S. Teleman¹, Ana Cristina Anton¹,
A. Carauleanu¹, R. Socolov¹

1. Universitatea de Medicină și Farmacie Gr. T. Popa, Iași
2. Institutul de Virusologie "Ștefan Nicolau", București

Correspondence author:

Dr. Demetra Socolov

Spitalul Obstetrică Ginecologie "Cuza-Vodă"

Str. Cuza Vodă nr. 34, Iași 700038

fax: 0040 232 213000

e-mail socolov@hotmail.com

Abstract

Aims. This study evaluated the HPV genotypes encountered in genital infections of female population from the Moldavian region of Romania, in order to improve the monitoring criteria for this infection.

Material and methods. We included 152 women with an average age of 40 (between 17-63), that addressed to Cuza Voda Hospital of Iasi, Romania, and that were investigated colposcopically, cytologically and by HPV genotyping using the InnoLipa kit.

Results. The DNA HPV presence was correlated to cytopathology, as viral genome was found both in normal cases and cervical atypia ones.

From our patients, 32.24% had no HPV infection, and from those positive, in 75% of cases oncogenic genotypes were found. The most prevalent oncogenic genotype was HPV 16 (43.12%), followed by HPV 18 (10.34%) and HPV 31 (10.34%). Age grouping for our patients showed that HPV positive percentage was similar (65% in the group 17-29, 66% in 30-39, and 70.83% in over 40).

Conclusion. HPV genotyping with InnoLipa kit from Innogenetics demonstrates the role of oncogenic HPV infection prevention, and that it is useful for monitoring patients with cervical dysplasia.

Keywords: HPV genotyping, cervical dysplasia

Rezumat

Obiectiv. Scopul acestui studiu a constat în identificarea genotipurilor HPV prezente în populația feminină din zona Moldovei, în vederea îmbunătățirii criteriilor de monitorizare a acestui tip de infecție genitală. **Material și metodă.** 152 de femei cu vârsta medie 40 de ani (17-63) care s-au adresat serviciului de ginecologie din Spitalul "Cuza Vodă" Iași, au fost investigate colposcopic, citologic și viral (decelare și genotipare HPV cu kit InnoLipa). **Rezultate.** Prezența ADN-HPV a fost corelată cu observațiile citopatologice, genomul viral fiind evidențiat atât în frotiurile cu citologie normală, cât și în cazurile cu atipii cervicale. Dintre paciente, 32,24% nu au prezentat infecție cu HPV, iar la cele pozitive,

în proporție de 75% s-au identificat tipuri cu potențial oncogen. Genotipul oncogen prevalent este HPV16 (43,12%), fiind urmat de HPV18 (10,34%) și HPV31 (10,34%). Distribuția pe grupe de vârstă a arătat că procentul de paciente HPV pozitive a fost relativ similar (65% la grupa 17-29 de ani, 66,15% la 30-39 de ani și 70,83% la peste 40 de ani). **Concluzii.** Genotiparea HPV, realizată cu kitul InnoLipa (Innogenetics) s-a dovedit utilă în identificarea femeilor cu risc de achiziție a fenotipului malign, a celor cu infecție persistentă și în evaluarea eficienței vaccinurilor profilactice comerciale pentru acest areal.

Cuvinte-cheie: genotipare HPV, displazii cervicale

Introducere

Deși în 1991, la un workshop al IARC s-a concluzionat că datele de epidemiologie moleculară indică în mod neechivoc faptul că virusurile papiloma umane (HPV) constituie agentul etiologic al cancerului de col uterin, consensul a fost stabilit abia în 1997. Până în prezent au fost identificate circa 100 de tipuri de HPV, 40 dintre acestea infectând tractul genital, dar riscurile asociate cu diferitele genotipuri virale nu au fost încă bine evaluate^[1]. Nu există încă un consens în ceea ce privește încadrarea într-o anumită grupă de risc a unor genotipuri cu prevalență redusă. Astăzi, studiul rolului carcinogenic al HPV continuă să reprezinte o prioritate în cercetările privind biologia moleculară a cancerului cervical, cu atât mai mult cu cât numărul genotipurilor virale identificate și caracterizate este în creștere. Conform unor autori, introducerea pe scară largă a vaccinului profilactic împotriva infecției cu HPV ar putea preveni numai 50-70% din cancerle invazive și displaziile genitale, dat fiind numărul mare de genotipuri circulante, unele neidentificate încă^[2]. În conformitate cu date recente, în țara noastră există mai multe tentative regionale cu privire la identificarea genotipurilor HPV prezente la populația cu sau fără leziuni cervicale de etiologie virală determinată. În infecția cu HPV, diagnosticul de certitudine se realizează prin amplificare polimerazică (PCR), test care pune în evidență componente ale genomului viral. De aceea, nu este surprinzător faptul că atât pe plan internațional, cât și național, numeroase studii sunt focalizate pe valoarea oferită de înaltul grad de specificitate al acestor teste, pentru eliminarea discordanțelor cito/colposcopice^[3].

Scopul acestui studiu a fost acela de a identifica genotipurile HPV prezente în zona Moldovei și de a estima astfel eficiența prezumată a vaccinului anti-HPV.

Material și metode

În studiu au fost incluse 152 de femei cu vârsta medie 40 de ani (17-63) care s-au adresat serviciului de ginecologie al Maternității "Cuza-Vodă" din Iași în intervalul octombrie 2007 - noiembrie 2008. De la aceste paciente au fost recoltate secreții cervicale pentru investi-

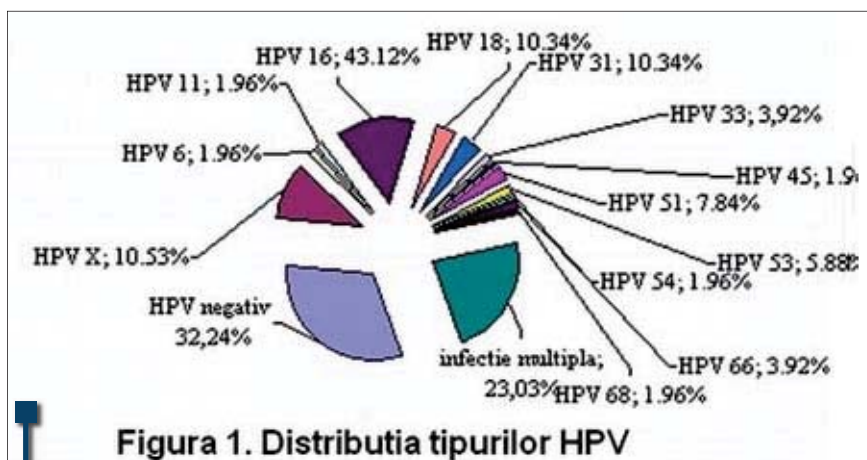


Figura 1. Distribuția genotipurilor virale HPV

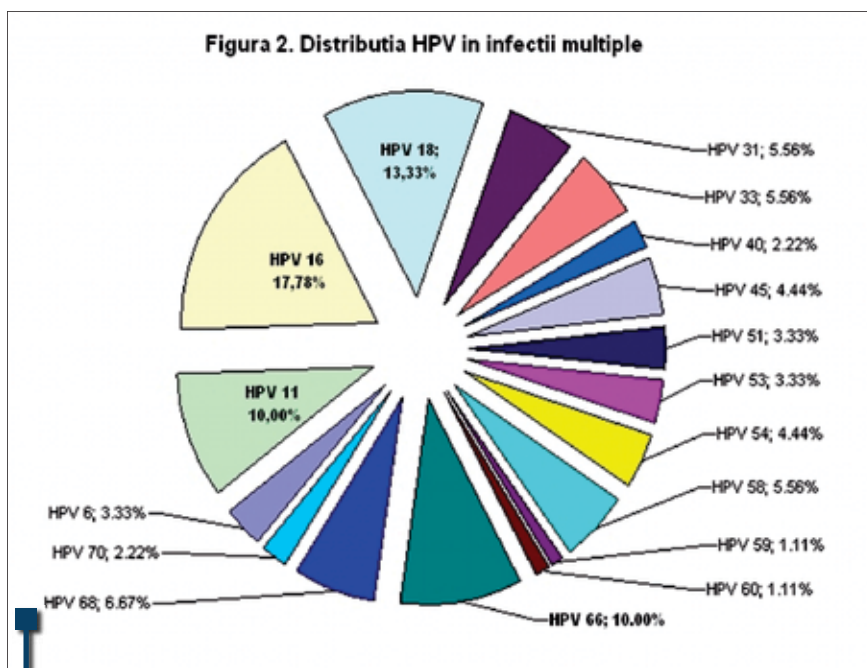


Figura 2. Distribuția genotipurilor virale HPV în infecțiile multiple

gații citologice și virusologice. Gradingul citologic a fost realizat de un specialist citopatolog, conform normelor sistemului Bethesda. Produsele recoltate au fost trecute în mediu COPAN și au fost transportate la Institutul de Virusologie București pentru testare HPV.

Izolarea ADN s-a efectuat din 200 μl mediu COPAN folosind kit-ul QIAmp spin column (Qiagen). ADN extras a fost resuspendat în 100 μl apă DNAase free și stocat la -70° C până la utilizare.

Decelarea și genotiparea HPV s-au

efectuat cu kit-ul InnoLipa (Inogenetics). Decelarea ADN viral se bazează pe amplificarea prin PCR, cu ajutorul unor primeri consens SPF1, al unei secvențe de 65pb din gena L1 a HPV. Genotiparea se realizează prin hibridizarea ampliconilor pe suport solid (membrană) pe care sunt fixate sondele moleculare specifice pentru 13 genotipuri de risc înalt și scăzut (6, 11, 16, 18, 31, 33, 40, 45, 51, 53, 54, 59, 60, 68 și 70). Dacă în proba biologică este prezent alt genotip, kit-ul InnoLipa nu permite identificarea sa,

Tabelul 1. Distribuția celor mai frecvente tipuri virale raportat la grading-ul citologic

Citologie	Vârștă	Nr. total de paciente	HPV negative	HPV pozitive	HPV 16	HPV 18	HPV 31
NILM	(22-58)	32	14 (44%)	18 (56%)	3/8 (17%)	0/18 (0%)	0/18 (0%)
ASCUS	(18-55)	28	15 (54%)	13 (46%)	9/13 (69%)	4/13 (31%)	0/13 (0%)
LGSIL	(17-63)	42	10 (24%)	32 (76%)	5/32 (16%)	9/32 (28%)	5/32 (16%)
HGSIL	(21-63)	50	10 (20%)	40 (80%)	22/40 (55%)	5/40 (13%)	6/40 (15%)

dar furnizează un semnal caracteristic și răspunsul este notat generic HPVx. Testarea pentru HPV s-a efectuat conform instrucțiunilor furnizate de firma producătoare, folosind controale negative și pozitive. În fiecare test PCR s-au folosit câte 10 µl izolat ADN.

Rezultate

Din cele 152 de paciente investigate, 49 (32,24%) nu au prezentat infecție cu HPV. În ceea ce privește cele 103 paciente HPV pozitive, în 10 cazuri (10,53%), genotipul viral implicat nu a putut fi determinat cu ajutorul kit-ului InnoLipa și probele au fost notate HPVx. În vederea unei monitorizări adecvate de către medicii ginecologi, numai aceste probe au fost retestate și cu kit-ul de genotipare Linear Array (Roche) care permite decelarea altor 5 genotipuri de risc crescut (35, 39, 52, 56, 58). S-a constatat că

numai în patru cazuri au fost implicate genotipuri cu potențial oncogen (câte un caz cu HPV52 și 39 și două cazuri cu HPV35). De precizat că din totalul de 90 de probe HPV pozitive genotipate prin InnoLipa, infecție unică a fost detectată în 51 de cazuri (54,84%). În ceea ce privește distribuția tipurilor virale, aceasta este prezentată în figura 1. Genotipul oncogen prevalent este HPV16 (43,12%), fiind urmat, în procente egale, de HPV 18 și HPV31 (10,34%). Chiar și în cazul infecțiilor multiple (figura 2), genotipul 16 este cel mai frecvent întâlnit (17,78%) secundat de HPV18. În acest caz, tipurile 31 și 33 sunt prezente în procente egale.

S-a observat că tipurile cu potențial oncogen, în infecții unice sau mixte, se regăsesc la 75% din pacientele HPV pozitive. O corelație a prezenței ADN-HPV cu grading-ul citologic a relevat faptul că procentul de pozitivitate crește o dată cu

severitatea leziunii. Analiza distribuției celor mai frecvente 3 genotipuri HPV în populația investigată a arătat faptul că HPV 16 este prezent în cazul pacientelor cu citologie ASC-US (atypical squamous lesion of unknown significance) și HGSIL (high grade squamous intraepithelial lesion) în cea mai mare proporție, în timp ce genotipul 18 are o pondere mai mare în ASC-US și LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion). Genotipul 31 este întâlnit mai des însă la femeile cu citologie moderat severă și severă, nefiind identificat în cazurile considerate în limite normale-NILM (no evidence of intraepithelial lesion or malignancy) - tabelul 1.

De remarcat faptul că pacientele cu citologie ASC-US (6/9 HPV16 pozitive și 4/4 HPV18 pozitive) prezintă infecție mixtă, în timp ce la cele cu LGSIL proporția este de 4/5, respectiv 6/9 pentru aceleași genotipuri. Deși în ultimul timp ipoteza selecției clonale bazate pe identificarea unui singur genotip HPV în cazurile de cancer cervical pare a pierde teren, în acest studiu s-a constatat că la femeile cu citologie HGSIL tipurile 16, 18 și 31 au fost întâlnite ca infecții unice în 15/22 cazuri, 3/5 cazuri, respectiv 4/6.

Stratificarea pe categorii de vârstă a arătat că procentul de paciente HPV pozitive a fost relativ similar în cele trei grupe, respectiv 65% la grupa 17-29 de ani, 66,15% la femeile între 30 și 39 de ani și 70,83% la cele peste 40 de ani (figura 3).

Prevalența celor trei tipuri de risc înalt frecvente în regiunea investigată este diferită (figura 4). Dacă se ia în considerație preponderența HPV 16 în infecții unice și mixte, la pacientele cuprinse între 30 și 39 de ani este de 62%, în timp ce la celelalte grupe este similară

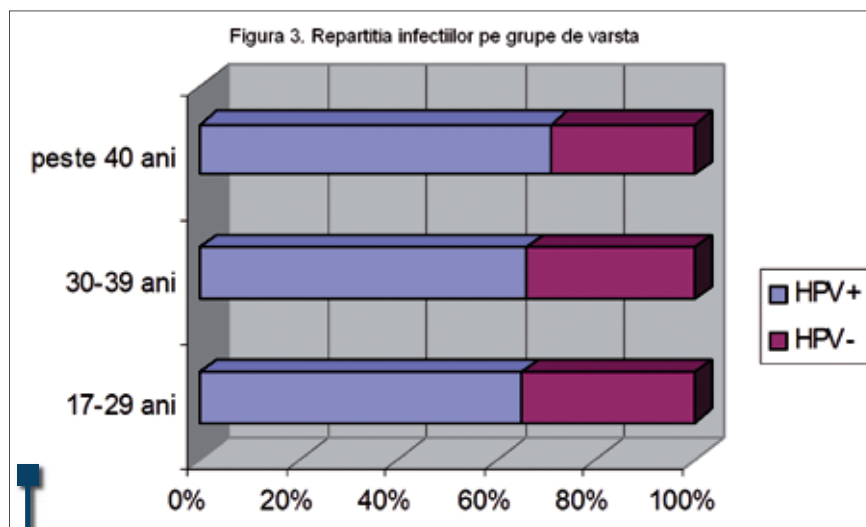


Figura 3. Repartiția infecțiilor HPV pe categorii de vârstă

(între 49 și 50,75%). De remarcat este procentul crescut de infecții unice cu HPV18 la pacientele peste 40 de ani și distribuția sa uniformă în coinfecții la grupele extreme de vârstă.

Discuții

Datele prezentate în cadrul acestei lucrări sunt rezultatele obținute pentru zona Moldovei în cadrul unui proiect de cercetare multicentric. Scopul acestui proiect constă în elaborarea unei/unor strategii de detecție/monitorizare și management ale infecției HPV de risc crescut, urmărind prevalența și incidența genotipurilor HPV circulante, cuantificarea unor gene celulare și virale implicate în persistența virală și asocierea persistenței virale cu variațiile inter-individuale ale răspunsului imun.

Rapoartele internaționale apreciază că infecția cu HPV are o prevalență ridicată, noi cazuri apărând în proporție de 0,3% (în cadrul femeilor active sexual, proporția fiind de 10% pe an). Se cunoaște faptul că testul citologic este unul de screening cu specificitate crescută 97% (86-100%)^[4]. Deși examenul citologic, singur, decelează modificările benigne și maligne, o combinație a testului Papanicolau cu detecția ADN-HPV este mult mai utilă, recunoscându-se atât cauza cât și efectul: HPV și morfologia celulară. În studiul nostru, prezența ADN-HPV a fost corelată cu observațiile citopatologice, genomul viral fiind evidențiat atât la femeile cu citologie normală, cât și la cele cu atipii cervicale. Prevalența HPV în grupul NILM poate reprezenta un factor de risc în diferitele populații demografice. De aceea, în vederea unui management adecvat, pentru discriminarea între pacientele cu risc de achiziție a unui fenotip oncogen, s-au utilizat kit-uri de genotipare, renunțându-se la teste bazate doar pe confirmarea prezenței ADN viral. Deși HPV 16 și 18 sunt cele mai comune genotipuri întâlnite în cancerul cervical, studii recente au dus și la incriminarea altor 15 genotipuri ca având risc crescut de inducere a transformării celulare, precum și la identificarea a 3 genotipuri cu risc mediu. De aici rezidă necesitatea testării virale și a asocierii tipurilor HPV cu persistența virală și progresia leziunilor displazice. Sensibilitatea testului citologic Papanicolau pentru neoplazia intraepitelială cervicală de

Figura 4a

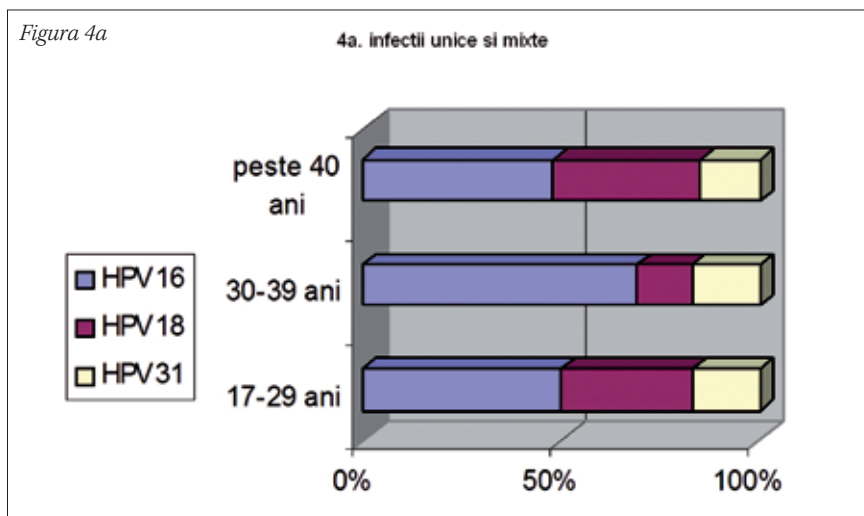


Figura 4b

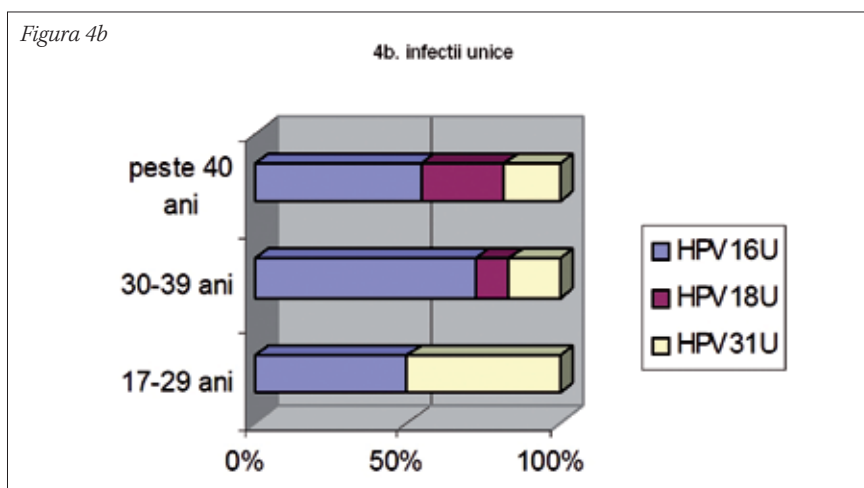


Figura 4c

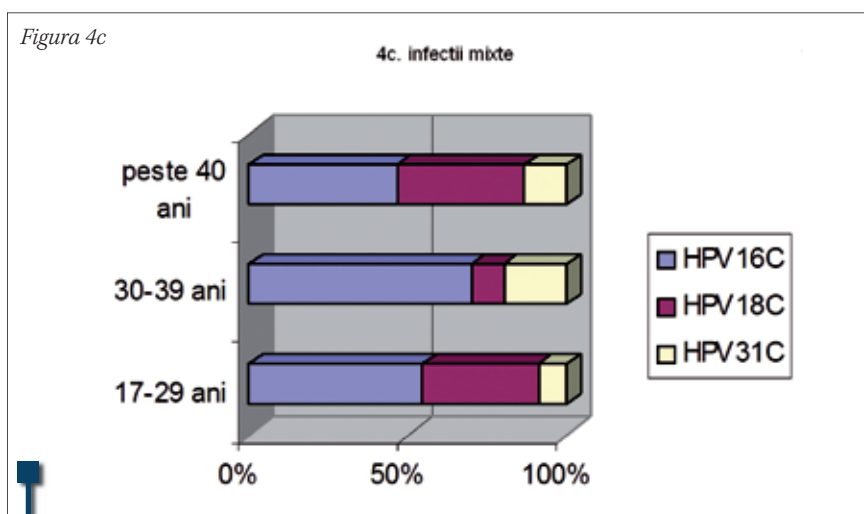


Figura 4. Distribuția genotipurilor prevalente pe categorii de vârstă: 4a. infecții unice și mixte; 4b. infecții unice; 4c. infecții mixte

risc crescut (CIN) este de aproximativ 70-80%^[5]. De aceea se asociază frecvent cu testul pentru prezența ADN HPV de risc crescut, rolul HPV în cancerul cervical fiind incontestabil, prezența sa evidențindu-se în 93-100% din carcinomele scuamoase de cervix^[6]. Datorită acestor observații, testul de decelare a HPV este una din strategiile recomandate pentru monitorizarea pacienților cu rezultate citologice de tip ASC-US^[7]. Numeroase articole apărute în revistele de specialitate recomandă introducerea pe scară largă a unor teste de diagnostic viral, cu precădere la femei care prezintă un grad scăzut de anormalitate a frotiului citologic. Date recente subliniază faptul că inclusiv în țările dezvoltate testarea pentru HPV s-a dovedit mult mai eficientă decât examenul citologic în cazul adenocarcinomelor cervicale și al precursorilor săi^[8], deoarece, datorită localizării înalte a leziunii în canalul endocervical, accesul mijloacelor de recoltare este redus.

În ceea ce privește datele obținute în populația testată în cursul acestui studiu, ADN-HPV a fost decelat în 56% din cazurile fără patologie asociată. Acest procent este relativ ridicat. De asemenea, s-a remarcat în pattern-urile de distribuție a tipurilor individuale că HPV16 este tipul cu prevalența cea mai mare, urmat de HPV18 și 31. Restul genotipurilor oncogenice rămân slab re-

prezentate în populația noastră. Totuși, un procent ridicat (10,53%) rămân negenotipate utilizând kit-ul InnoLipa. Studii epidemiologice recente au demonstrat însă că numai puține tipuri HPV oncogenice sunt asociate frecvent cu majoritatea cancerelor și CIN 2/3^[11,9]. În contextul circulației globale a persoanelor, genotipurile întâlnite într-un areal geografic se schimbă permanent, ceea ce reclamă up-gradarea periodică a testelor de genotipare virală și asocierea acestora cu modificările cito/histologice. Acest lucru este subliniat și de faptul că într-un studiu anterior efectuat de autori, genotipul 18 era prezent în populația din zona Moldovei în procent de peste 23% din pacientele HPV pozitive, în prezent ea scăzând la 10,34%^[10]. În metaanaliza publicată de Clifford G.M. și colab.^[9], sunt comparate tipurile HPV asociate preferențial cu HSIL și cancere. HPV 16, 18, și 45 au avut prevalența cea mai mare în cancere comparativ cu leziunile intraepiteliale. În cazul nostru, HPV45 este întâlnit doar la o singură pacientă ca infecție unică, dar, coroborând datele cu cele obținute în cursul acestui proiect cu cele din alte regiuni ale țării, tipul oncogen 51 (întâlnit în acest studiu la 7,81% din pacientele HPV pozitive, al patrulea tip ca răspândire) pare a crește ca pondere. Trebuie precizat și rolul important pe care genotiparea virală

îl joacă în screening-ul femeilor aflate la menopauză^[11], în cazul nostru în eliminarea discordanțelor citologice^[12]. Genotiparea virală permite un management eficient în cazul femeilor peste 30 ani, prezența unui tip oncogen necesitând investigații colposcopice^[13]. Mai mult, testele virale permit identificarea infecțiilor persistente, deci a femeilor cu risc de dezvoltare a cancerului de col^[14].

În concluzie, deși screening-ul citologic nu va fi înlocuit de testarea HPV, rezultatele privind genotipurile circulante vor servi la elaborarea unui algoritm de monitorizare eficientă și la un management corect al acestui tip de infecție. Precizăm că datele obținute vor putea fi folosite și pentru realizarea unor studii epidemiologice privind infecția genitală cu HPV în zona Moldovei. Ținând cont de faptul că numai un procent foarte mic de infecții subclinice pot fi diagnosticate prin examen citologic/colposcopic, efectuarea unui test virusologic pe un număr mare de subiecți devine imperativ necesară. Mai mult, în contextul vaccinării HPV, acest studiu prezintă avantajul că oferă o privire de ansamblu asupra genotipurilor HPV prezente în acest moment în zona Moldovei. ■

Sursa finanțării: CEEEX 119/2006, PN2 41-030/2007

Bibliografie

- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, et al. Epidemiologic classification of HPV types associated with cervical cancer, NEJM, 2003, 348:348-527.
- Gravitt PE, Jamshidi R.- Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. Infect Dis Clin North Am, 2005, 19: 439-458.
- Fey M C, Beal MW- Role of HPV testing in cervical cancer prevention, J Midwifery Womens Health 49(1):4-13, 2004. © 2004 Elsevier Science, Inc.
- Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer, Clin Microbiol Rev, 2003,16: 1-17.
- Sherman ME, Schiffman M, Herrero R, et al. Performance of a semiautomated Papanicolaou smear screening system: results of a population-based study conducted in Guanacaste, Costa Rica. Cancer, 1998, 84:273-280.
- Walboomers JMM., Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol., 1999, 189, 12-19.
- Wright TC, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. JAMA, 2001, 287: 2120-2129.
- Bulk S, Visser O, Rozendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Cervical cancer In the Netherlands: decrease of squamous cell carcinoma in older women, increase of adenocarcinoma in younger women, Int J Cancer, 2005, 113, 1005-1009.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br. J. Cancer, 2003, 88, 63-73.
- Socolov D, Anton AC, Anton G, Teleman S, Petica M, Repanovici R - A case control study on HPV presence in cervical dysplasias and cancers, Proc. Rom. Acad. 2001, 3: 167-17.
- Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooyen M, van den Akker-van Marle E. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions, British Journal of Cancer (2000) 83(5), 561-565.
- Socolov D, Anton Ac, Anton G, Teleman S, Melinte A, Socolov RV: HPV genotype distribution in patients with HGSIL cytology. Central European Journal of Public Health 2008;52:supplement.
- Berkhoff J, van Kemenade FJ, Snijders PJ, Verheijen RH, Meijer CJ et al. When to test women for human papillomavirus: testing is possible without increasing colposcopy referral rate, BMJ, 2006, 332, 237.
- Brink AA, Zielinski, GD, Stenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ. Clinical relevance of HPV testing in cytopathology, Cytopathology, 2005, 16, 7-12.