

Zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego – współczesne metody diagnostyczne

Human papillomavirus infection – current diagnostic techniques

Заражения вирусом папиллома человека – современные диагностические методы

Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jerzy Stelmachów

Correspondence to: Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Wojewódzki Szpital Bródnowski, ul. Kondratowicza 8, 03-242 Warszawa

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) należy do grupy DNA wirusów. Infekcje wirusem brodawczaka ludzkiego wiążą się z występowaniem łagodnych lub złośliwych zmian w obrębie błon śluzowych i skóry narządów płciowych, odbytu, jak również głowy i szyi. Obecność wirusa, szczególnie typów wysokoonkogennych, w komórkach nabłonka szyjki macicy bezpośrednio wpływa na rozwój raka szyjki macicy. Zakażenia HPV w dużym odsetku przebiegają bezobjawowo i jest to najprawdopodobniej związane z niewystąpieniem fazy proliferacyjnej cyklu życiowego wirusa, a także mają charakter przejściowy, co znacznie utrudnia wczesną identyfikację wirusa. Wśród metod diagnostycznych umożliwiających rozpoznanie zakażenia wymienia się badanie cytologiczne, kolposkopię, badanie histologiczne, a także coraz doskonalsze metody molekularne, które pozwalają wykryć wirusowe DNA w przypadkach braku innych wykładników zakażenia. Do metod tych zalicza się: Southern Blot, Dot Blot, hybrydyzacje *in situ*, *polymerase chain reaction* (PCR), Hybrid Capture System I i II (HCI, HCII). Coraz częściej wspomina się o testach opartych na izolacji mRNA wirusa HPV (PreTect HPV-Proofer test). Metody te wykrywają zintegrowaną formę HPV, tzw. formę episomalną wirusa. Uważa się, że obecność wirusa HPV w tej postaci jest bezpośrednio związana z progresją zmian powstałych na podłożu tego zakażenia. Co prawda przy pomocy testu PreTect HPV-Proofer wykrywa się mniejszą liczbę zakażeń HPV, ale stosując go, można wyodrębnić grupę pacjentek najbardziej narażonych na raka szyjki macicy.

Słowa kluczowe: rak szyjki macicy, wirus brodawczaka ludzkiego, PCR, Hybrid Capture System, mRNA

Summary

Human papillomavirus (HPV) belongs to the family of DNA viruses. Infection by HPV is associated with the development of benign or malignant lesions within mucosal membrane and skin of the genitals, anus, head and neck. Presence of the virus, particularly of the highly oncogenic variants in epithelial cells of uterine cervix directly influences the development of cervical cancer. In a considerable proportion of cases, HPV infections are asymptomatic and this is probably associated with lack of proliferation phase of viral life cycle, or may be transient, which greatly complicates early detection of the virus. Diagnostic techniques enabling diagnosis of HPV infection include: cytological exam (PAP smear), colposcopy, histological study, as well as increasingly sophisticated molecular techniques, enabling detection of viral DNA when other indices of infection are lacking. These techniques include Southern Blot, Dot Blot, *in situ* hybridization, polymerase chain reaction (PCR) and Hybrid Capture System I and II (HCI, HCII). Increasingly often authors refer to tests based on isolation of viral mRNA (PreTect HPV-Proofer test). These techniques detect integrated form of HPV, the so-called episomal form of the virus. In general opinion, the presence of HPV in this form is directly associated with progression of lesions developing as a result of this infection. While the PreTect HPV-Proofer test detects a smaller number of cases of HPV infection, its use enables selection of patients most at risk of developing cervical cancer.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, PCR, Hybrid Capture System, mRNA

Содержание

Вирус папиллома человека (сосочковая опухоль; сокращенное название на английском языке ХПВ) относится к группе ДНК вирусов. Инфекции вирусом папиллома человека связаны с появлением доброкачественных или злокачественных изменений в области слизистых оболочек и кожи половых органов, заднего прохода, а также головы и шеи. Наличие вируса, особенно высокоонкогенного, в клетках эпителия шейки матки влияет непосредственно на развитие рака шейки матки. Заражения вирусом папиллома в большинстве случаев проходит бессимптомно. Это связано в основном главным образом с тем, что не наблюдается появления пролиферационной фазы жизненного цикла вируса, а также с тем, что он имеет переходный характер, что значительно осложняет раннюю идентификацию вируса. Среди диагностических методов, которые дают возможность распознавания рассматриваемого заражения называются цитологические исследования, колпоскопия, гистологические исследования, а также все более усовершенствованные молекулярные методы, которые дают возможность обнаружить вирус ДНК в случае отсутствия других показателей заражения. К числу таких методов относятся: Соутерн Блот, гибридизация *in situ*, цепная полимерическая реакция (сокращенное название на английском языке ПЦР), гибридная система захвата 1 и 2 (сокращенное название на английском языке ХК1 и ХК2). Все чаще упоминаются также тесты основанные на изоляции мРНА рассматриваемого вируса (ПреТект ХПВ-Проофер тест). Упомянутые методы обнаруживают интегрированную форму рассматриваемого вируса, так наз. эписомную форму. Считается, что наличие вируса ХПВ в таком виде непосредственно связано с прогрессией изменений появившихся на основании такого заражения. Правда, при помощи теста ПреТект ХПВ-Проофер обнаруживается меньшее количество заражений вирусом, однако применяя этот метод можно выделить группу пациенток наиболее подвергнутых опасности рака шейки матки.

Ключевые слова: рак шейки матки, вирус папиллома человека, ПЦР, гибридная система захвата, мРНА

Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) należy do grupy DNA wirusów. Przez wiele lat zaliczany był do rodziny *Papovaviridae* razem z *Polyomaviridae*. W ostatnich latach zaobserwowano jednak znaczne różnice pomiędzy tymi rodzajami wirusów w budowie genomu, kapsydu, regionów transkrypcji i w efekcie wyodrębniono *Papillomaviruses* jako samodzielną rodzinę, którą podzielono na 16 grup⁽¹⁾.

Wirus HPV należy do patogenów mających duże powinowactwo do komórek proliferujących. Wywołuje on zmiany w obrębie błon śluzowych i skóry narządów płciowych, odbytu, jak również głowy i szyi⁽²⁾. Wśród dróg szerzenia się infekcji genitalnymi typami HPV wymienia się: drogę seksualną, wertykalną oraz zakażenia okołoporodowe. Infekcje HPV narządu rodowego przenoszone są głównie drogą płciową, aczkolwiek istnieją prace, których autorzy sugerują inną drogę transmisji tego wirusa^(3,4).

Zakażenie HPV najczęściej przebiega bezobjawowo i jest to najprawdopodobniej związane z niewystąpieniem fazy proliferacyjnej cyklu życiowego wirusa. W takim przypadku ustalenie rozpoznania jest bardzo trudne i możliwe tylko przy użyciu badań molekularnych. Wirus przez wiele miesięcy, a nawet lat, ukrywa się w warstwie przynależnej nabłonka, nie dając objawów klinicznych. Wymazy i popłuczyny z badanych regionów mogą dawać wyniki fałszywie ujemne, co wiąże się z umiejscowieniem nieaktywnego wirusa w głębszych warstwach nabłonka. Ponadto nie ma odpowiedzi immunologicznej. Drugą postacią zakażenia HPV jest infekcja subkliniczna, w której nie stwierdza się makroskopowych zmian charakterystycznych dla wirusa HPV, ale rozpoznaje się zakażenie przy pomocy badań dodatkowych, takich jak badanie cytologiczne, histologiczne, kolposkopowe czy molekularne⁽⁵⁾. Trzecim rodzajem zakażenia jest postać jawna – kliniczna, z obecnością egzofitycznych, pojedynczych lub mnogich, widocznych makroskopowo zmian.

Human papillomavirus (HPV) belongs to the family of DNA viruses. For many years it was counted among the *Papovaviridae*, together with *Polyomaviridae*. However, considerable differences between both types of viruses have been noticed during the past few years, particularly concerning structure of genome, capsid, transcription regions, resulting in creation of a separate *Papillomaviridae* family, in turn subdivided into 16 groups⁽¹⁾.

HPV is a pathogen showing great affinity to proliferating cells. It may cause lesions located in mucosal membrane and skin of genitals, anus, head and neck⁽²⁾. Genital HPV may spread by sexual and vertical routes, as well as by perinatal infection. HPV infections of genital organs are transmitted mainly by sexual intercourse, while some authors suggest other pathways of transmission of this virus^(3,4).

HPV infection is usually asymptomatic and this is probably associated with lack of proliferation phase in the HPV life cycle. In this situation, reliable diagnosis is extremely difficult and possible only using molecular studies. Throughout several months or even years, HPV may hide in epithelial peribasal layer, not provoking any clinical symptoms. Smears and lavage fluid from these areas may provide false negative results, due to location of inactive viral forms in deeper strata of the epithelium. Furthermore, there is no discernible immune response at that time. Another form of HPV infection is the subclinical form, where no macroscopic lesions characteristic for HPV virus are present, but the infection is rather diagnosed based on ancillary tests, e.g. cytological, histological, colposcopic and molecular studies⁽⁵⁾. The third type of infection is the clinically overt (symptomatic) form, featuring exophytic, single or multiple lesions, visible by naked eye.

Some types of HPV have a propensity to cause benign lesions, while other – of more malignant forms. Therefore, low-risk and high-risk groups for oncogenesis have been defined.

Niektóre rodzaje HPV mają predyspozycje do wywoływania zmian łagodnych, a niektóre złośliwych. Dlatego wyodrębni-
no grupy niskiego i wysokiego ryzyka onkogenego.

W przypadkach występowania objawów klinicznych (kłykciny, brodawek) rozpoznanie infekcji nie przysparza większej trudności, a badania dodatkowe są jedynie potwierdzeniem rozpoznania. Problem pojawia się, gdy infekcja przebiega subklinicznie lub jest utajona. W celu rozpoznania zakażenia wykorzystuje się badania cytologiczne, kolposkopowe, metody molekularne.

Charakterystyczną cechą infekcji HPV w obrazie cytologicznym jest występowanie koilocytów. Komórki te charakteryzują się wakuolizacją okołojądrową. Przejąszenie wokół jądra komórki spowodowane jest działaniem białka E4, które ma za zadanie rozerwanie filamentów cytotkeratynowych i prawdopodobnie umożliwia translację późnych białek L1 i L2. Cytoplazma ma ostre brzegi, jest zagęszczona na obwodzie, zawiera ziarna eozynochłonne i barwi się intensywnie eozynochłonne lub cyjanochłonne, rzadziej jest amfofilna. Koilocyty zawierają nieregularne pojedyncze lub mnogie jądra o gruboziarnistej chromatynie. Należy jednak pamiętać, że pseudokoilocyty stwierdza się również w przypadku zakażenia *Trichomonas vaginalis*, jak również w różnego rodzaju artefaktach powstałych w wyniku nieprawidłowego przygotowania materiału do badania⁽⁶⁾. Dlatego też rozpoznawanie infekcji HPV tylko na podstawie obecności koilocytów może spowodować nadrozpoznowalność zakażeń tym wirusem. Drugim charakterystycznym objawem w obrazie cytologicznym jest nieprawidłowe rogowacenie nabłonka, tzw. *dyskeratosis*. Obok koilocytów widoczne są małe komórki przedwcześnie rogowaciejącego, dojrzałego nabłonka wielowarstwowego płaskiego, zawierające nieregularne, nieprzejrzyste i hiperchromatyczne, zwykle pojedyncze jądra⁽⁶⁾. Według Korobowicz i wsp.⁽⁷⁾ koilocytoza i dyskeratoza rozpoznawane są w 15% przypadków zakażeń HPV. W pozostałym odsetku obserwowane są nieswoiste cechy cytologiczne, które zostały określone przez Bastę i wsp. jako tzw. dyskretne cechy zakażenia HPV⁽⁸⁾, np.:

- komórki wielojądrzaste;
- komórki powierzchniowe z delikatnymi otoczkami (przejąszeniami) okołojądrowymi bez zmian w samym jądrze;
- komórki z ziarnistościami keratohialinizacyjnymi;
- komórki bezjądrzaste, duże, pochodzące z warstwy powierzchniowej, zwane również komórkami hiperkeratocytynymi lub łuskami rogowymi;
- komórki z pęknięciami cytoplazmy, czyli *cracked cells*;
- komórki z zaburzeniami rogowacenia, mniejsze od powierzchniowych, mające jednak pyknotyczne jądro, zwane również parakeratocytynymi;
- nisko zróżnicowane komórki metaplastyczne, pochodzące ze strefy regeneracji.

Pomimo opisanych charakterystycznych cech zakażenia HPV w obrazie cytologicznym zastosowanie tego badania jest ograniczone do wykrywania zmian subklinicznych, ponieważ infekcje utajone nie powodują zmian makroskopowych i mikroskopowych. Ponadto badanie to nie różnicuje typów wirusa.

Drugim badaniem umożliwiającym rozpoznawanie infekcji HPV jest kolposkopia. Jest to badanie nieinwazyjne i niebolesne.

If clinical symptoms are present (condylomas and warts), diagnosis of HPV infection is quite straightforward, and accessory tests serve only to confirm clinical diagnosis. Problems arise when infection is subclinical or asymptomatic (occult). Infection may be diagnosed using cytological, colposcopic and molecular techniques.

A characteristic feature of HPV infection in cytological studies is the presence of koilocytes. These cells are characterized by perinuclear vacuoles. Lucency surrounding cellular nuclei are the effect of E4 protein, which serves to tear apart cyto-keratin filaments and probably enables translation of late proteins L1 and L2. The cytoplasm has sharp contours and peripheral densities, contains eosinophilic granulations staining with eosin and cyan derivatives, rarely – with amphiphilic pigments. Koilocytes contain irregular, single or multiple nuclei with granular chromatin. Noteworthy is that pseudokoilocytes are sometimes encountered in *Trichomonas vaginalis* infections and also they may be an artifact resulting from incorrect preparation of material for microscopic study⁽⁶⁾. Therefore, diagnosis of HPV infection made only based on the presence of koilocytes may yield false positive results leading to over-diagnosis. Another characteristic cytological finding is abnormal keratinization of the epithelium, i.e. dyskeratosis. Apart of koilocytes, visible are small, prematurely keratinizing cells within mature, stratified squamous epithelium, containing irregular, opaque and hyperchromatic single nuclei⁽⁶⁾. According to Korobowicz et al.⁽⁷⁾, koilocytosis and dyskeratosis are noticed in only 15% of HPV infection cases. The remaining cases present non-specific cytological features, defined by Basta et al.⁽⁸⁾ as “discrete signs of HPV infection”, e.g.:

- multinuclear cells;
- superficial cells with delicate perinuclear lucency without alterations in nuclei themselves;
- cells containing kerato-hyalinizing granulations;
- anuclear cell, large, originating in the superficial layers, also called hyperkeratotic cells or keratin scales;
- cells with fissures within the cytoplasm, i.e. “cracked cells”;
- cells with disturbed keratinization, smaller than superficial ones, although equipped with a pyknotic nucleus, also called “parakeratotic cells”;
- poorly differentiated metaplastic cells, originating in the regenerative zone.

In spite of the above-mentioned characteristic features of HPV infection in cytological studies, usefulness of this diagnostic modality is limited to detection of subclinical lesions only, because occult infections do not produce macroscopic nor microscopic lesions. Furthermore, this technique does not differentiate viral types.

The second study enabling diagnosis of HPV infection is colposcopy. This is a non-invasive and pain-free examination, enabling verification of pathologic results provided by cytological screening. Using much enlarged views, it enables evaluation of cervical epithelium. Acetic and iodine tests performed during the study, in most cases enable determination of nature of cervical pathology (oncologically suspect or not, inflammatory, etc.). Furthermore, as opposed to cytological study,

Umożliwia weryfikację nieprawidłowych wyników uzyskanych w badaniu cytologicznym. Pozwala w znacznie powiększonych obrazach ocenić nabłonek szyjki macicy. Wykonując próby octową i jodową w trakcie badania, można w większości przypadków określić rodzaj patologii szyjki macicy (podejrzana lub niepodejrzana onkologicznie, zapalna itd.). Ponadto w odróżnieniu od badania cytologicznego umożliwia ocenę rysunku naczyń krwionośnych na tarczy części pochwowej szyjki macicy. Basta⁽⁸⁾ wyróżnia następujące kolposkopowe kryteria rozpoznania infekcji HPV:

1. w przypadku zakażenia jawnego:

- regularna architektonika powierzchni brodawczaka,
- regularny rysunek naczyń brodawczaka,
- wtórne zbielenie zmiany oraz zanik naczyń po próbie octowej,
- reaktywność przebiegających w podścielisku naczyń brodawczaka,
- jodopozytywność (jodojasność) powierzchni zmiany,
- brak zmian brzeżnych;

2. w przypadku infekcji subklinicznej:

- po próbie octowej widoczne jest charakterystyczne wtórne zbielenie nabłonka o obrazie poletkowania płaskiego, które w krótkim czasie zanika,
- wtórne punkikowanie i mozaika,
- ogniskowy, wtórny nabłonek płaski poza strefą regeneracji.

Uważa się, że kolposkopia jest bardziej czułym badaniem diagnostycznym od cytologii, jednak swoistość w rozpoznawaniu zakażenia HPV jest mniejsza.

Opisywane są również inne metody wykrywania infekcji HPV. Należy do nich oznaczanie ekspresji białka p16. Uważa się, iż stężenie tej proteiny znacznie zwiększa się w przypadkach zakażeń wirusem brodawczaka ludzkiego. Sytuacja ta związana jest z efektem działania białka E7 produkowanego przez HPV, szczególnie wysokiego ryzyka w przypadkach zmian dysplastycznych dużego stopnia. Meyer i wsp.⁽⁹⁾ podają, że czułość oznaczania p16 dla wykrywania dysplazji średniego i dużego stopnia wynosi 81%, natomiast specyficzność 62%. Dla porównania, w tym samym badaniu oznaczano DNA HPV przy pomocy testu Hybrid Capture II (HCII). Czulość tej metody wyniosła 100%, jednak specyficzność badania okazała się znacznie niższa i wyniosła 15%.

Prowadzone są również próby oznaczania białka L1. Zauważono, że brak ekspresji tej proteiny w przypadkach CIN II i III (*cervical intraepithelial neoplasia* – śródnabłonkowej neoplazji szyjkowej) związany był z większą tendencją do progresji tych zmian⁽¹⁰⁾. W piśmiennictwie można także znaleźć prace, których autorzy oznaczali przeciwciała przeciwko epitopom HPV⁽¹¹⁾ oraz białkom L1 i L2^(12,13). Metody te mają jednak ograniczoną czułość. Metodami pozwalającymi wykryć wirusowe DNA (kwas dezoksyrybonukleinowy – *desoxyribonucleic acid*) w przypadkach braku innych wykładników zakażenia są badania molekularne. Wśród nich wymienia się testy oparte na bezpośredniej detekcji DNA HPV i zalicza się do nich techniki hybrydyzacyjne, takie jak: Southern Blot, Dot Blot, hybrydyzacje *in situ*. Wykazują się one dużą czułością i swoistością, jednak są dość pracochłonne i wymagają znacznej ilości materiału biologicznego⁽¹⁴⁾. Obecnie powszechnie stosowane są metody wykorzystujące amplifikację, tj. powielanie DNA badanej próbki materiału, np. Hybrid

colposcopy enables assessment of vascular pattern on the vaginal portion of the cervix. Colposcopic criteria⁽⁸⁾ justifying diagnosis of HPV infection are:

1. in the case of clinically symptomatic infection:

- regular architecture of papilloma surface,
- regular vascular pattern of papilloma,
- secondary bleaching (whitening) of the lesion and disappearance of vessels at the acetic test,
- reactivity of stromal vessels of papilloma,
- iodine-positive staining of lesion surface,
- lack of peripheral pathology;

2. in the case of subclinical infection:

- characteristic transient secondary epithelial whitening at the acetic test, giving the appearance of flat plotting,
- secondary punctuate- and mosaic-like pattern,
- secondary foci of squamous epithelium out of regeneration zone.

In general opinion, colposcopy is a more sensitive diagnostic modality than cytology, but its specificity in the detection of HPV infection is inferior.

Other techniques for the detection of HPV infections have been described, including assessment of expression of p16 protein. In general opinion, its concentration increases considerably in HPV infections. This is associated with the effect of E7 protein produced by particularly high-risk strains of HPV in severely dysplastic lesions. Meyer et al.⁽⁹⁾ estimate the sensitivity of p16 titer in the detection of moderate and severe dysplasia is 81% and its specificity – 62%. In comparison, in the same study HPV DNA was assessed using the Hybrid Capture II (HCII) kit. Sensitivity of this method reached 100%, but its specificity was poor and at the level of 15%.

Attempts are underway to assess the level of L1 protein. It was noticed that lack of expression of this protein in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II and III was associated with higher risk of progression of these lesions⁽¹⁰⁾.

There are reports in the literature evaluating the role of antibodies against HPV epitopes⁽¹¹⁾ and L1/L2 proteins^(12,13). However, these techniques are hampered by limited sensitivity.

Molecular studies enable detection of viral DNA when other indices of infection are lacking. They include assays based on direct detection of HPV DNA by hybridization techniques, such as Southern Blot, Dot Blot and *in situ* hybridization. They benefit from high sensitivity and specificity, but are relatively laborious and require a considerable amount of biological material⁽¹⁴⁾. Currently, in widespread use are techniques based on amplification, i.e. multiplication of DNA present in analyzed samples of biological material, e.g. Hybrid Capture II (HCII), PCR – polymerase chain reaction. According to Kwaśniewska⁽¹⁵⁾, sensitivity of HCII ranges from 1 to 10, i.e. it enables detection of 1000 copies of viral DNA in 1 ml of solution analyzed. On the other hand, PCR technique enables detection of 1 copy in 1 ml solution, reflecting exquisite sensitivity of the latter modality.

At present, investigators' attention is increasingly focused on improvement of clinical specificity of HPV DNA assays and improvement of positive predictive value thereof. Techniques used to this purpose are based on assumptions stemming from

Capture II (HCII), PCR – *polymerase chain reaction*. Według Kwaśniewskiej⁽¹⁵⁾ czułość metody Hybrid Capture II wynosi od 1 do 10, co oznacza możliwość rozpoznania około 1000 kopii wirusa w 1 ml badanego roztworu. Z kolei stosując metodę PCR, można wykryć 1 kopię wirusa w badanej próbce, co świadczy o bardzo dużej czułości tego badania.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się poprawie swoistości klinicznej oznaczeń DNA HPV oraz poprawie pozytywnej wartości predykcyjnej. W tym celu stosowane są metody, których założenia odpowiadają patogenezie rozwoju zmian na podłożu zakażenia wirusem HPV oraz wykorzystują znajomość samej biologii wirusa. Od lat wiadomo, że zakażenia wysokoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego stanowią czynnik rozwoju zmian dysplastycznych szyjki macicy, jak również raka szyjki macicy^(16,17). Uważa się, że większość zakażeń HPV ma charakter przemijający, jednak w niektórych przypadkach wirus przechodzi w stan latencji. W przypadku osłabienia odporności gospodarza wirus uaktywnia się, powodując powstanie brodawek płciowych lub zmian dysplastycznych szyjki macicy małego stopnia (*low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL*)⁽¹⁸⁾. Na tym etapie może jeszcze nastąpić eliminacja wirusa z organizmu, jednak u około 10-20% pacjentek dochodzi do infekcji przetrwałej, która po 4-5 latach w około 8% przypadków może doprowadzić do powstania zmian typu CIN2/CIN3, a w efekcie do rozwoju raka szyjki macicy⁽¹⁹⁾. Wiadomo, że jeśli wirus HPV wnika do komórki podstawnej nabłonka paraepidermoidalnego, pozbywa się kapsydu, a następnie przedostaje się do jej jądra. W jądrze początkowo nie jest związany z DNA gospodarza i pozostaje w formie episomalnej. W miarę upływu czasu dochodzi do integracji DNA wirusa z DNA komórki nabłonka, w wyniku czego następuje produkcja białek E6/E7. Taką sytuację obserwuje się w większości przypadków infekcji wysokoonkogennymi typami wirusa HPV. Jeszcze do niedawna uważano, że w zmianach LSIL genom wirusa HPV występuje wyłącznie w postaci episomalnej i w miarę zaawansowania choroby wbudowuje się w genom gospodarza, natomiast w zmianach typu HSIL (dysplazja dużego stopnia – *high-grade squamous intraepithelial lesion*) można spotkać tylko formę zintegrowaną^(20,21). Obecnie wiadomo, że zarówno w dysplazjach małego, jak i dużego stopnia można spotkać obie formy genomu HPV^(22,23). Udowodniono jednak, że w zmianach typu LSIL ekspresja białek E6/E7 jest słaba, co najprawdopodobniej wiąże się z tym, że transkrypty E6 i E7 pochodzą z form episomalnych, które są mniej stabilne niż transkrypty pochodzące z form zintegrowanych⁽²⁴⁾. Dlatego też uważa się, że wykorzystanie techniki oznaczania transkryptów mRNA onkogenów E6 i E7 może być bardzo przydatne w ocenie progresji zmian typu HSIL, jak również raka⁽²⁵⁾. W tym celu przeprowadzonych zostało wiele badań⁽²⁶⁻²⁹⁾ mających na celu porównanie czułości i swoistości wykrywania HPV metodą PCR z testami opartymi na oznaczaniu mRNA wirusa.

Molden i wsp.⁽²⁷⁾ wykorzystali w swoich badaniach trzy metody do izolacji HPV: test PreTect HPV-Proofer, który wykrywa E6/E7 mRNA HPV typów 16., 18., 31., 33. i 45., PCR do wykrywania tych samych typów HPV oraz test Gp5+/6+ consensus PCR. W przypadkach pacjentek z prawidłowym wynikiem

our understanding of pathogenesis of lesions originating from HPV infection and biology of the virus itself. For years we know that infection by highly oncogenic types of HPV are a risk factor for the development of cervical dysplastic lesions, as well as of cervical cancer^(16,17). It is estimated that most HPV infections are transient in nature, while in some cases the virus may take the latent form. In the setting of deficient host immune system, the virus activates, giving rise to genital papillae (warts) or low-grade cervical dysplastic lesions (low-grade squamous intraepithelial lesions, LSIL)⁽¹⁸⁾. At this stage, virus may be eliminated from the organism, but 10-20% of patients develop persistent infection, leading to the development of CIN2/CIN3 lesions in about 8% of them after 4-5 years, subsequently progressing to cervical cancer⁽¹⁹⁾.

When HPV penetrates basal cells of paraepidermoid epithelium, it gets rid of its capsid and subsequently penetrates cell nucleus. Initially it is not bound with host DNA and remains in the episomal form. With passing time, viral DNA integrates with host DNA, resulting in the synthesis of E6/E7 proteins. Such a situation takes place in most cases of infection by highly oncogenic types of HPV.

Until recently it was believed that in LSIL lesions, HPV genome is present in episomal form only and integrates with host genome directly proportional to advancing clinical stage, while in high-grade HSIL lesions (high-grade squamous intraepithelial lesion) only integrated forms may be detected^(20,21). We know at present that both in low-grade and in high-grade dysplasias both forms of HPV genome may be found^(22,23). Studies revealed, however, that in lesions of the LSIL type expression of E6/E7 proteins is weak, most probably because E6/E7 transcripts originate in episomal forms, which are less stable than transcripts originating in integrated forms⁽²⁴⁾. So, in general opinion, the mRNA transcript assay technique for oncogenes E6 and E7 may be very useful in monitoring progression of HSIL lesions and cervical cancer⁽²⁵⁾. Several studies have been performed to this purpose⁽²⁶⁻²⁹⁾, aiming at comparing sensitivity and specificity of HPV detection by the PCR technique, using tests based on titration of viral mRNA.

Molden et al.⁽²⁷⁾ implemented three HPV isolation techniques: the PreTect HPV-Proofer, detecting E6/E7 mRNA of HPV types 16, 18, 31, 33, 45, PCR detecting the same viral types and the Gp5+/6+ consensus PCR. In patients with normal cytological findings or with the diagnosis of ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) or LSIL, estimated incidence of HPV was statistically greater when using PCR technique as compared with the PreTect HPV-Proofer test. In cases of HSIL, the authors determined specificity of PreTect HPV-Proofer test at 97.3% and that of Gp5+/6+ PCR at 90%. Positive predictive values were 10.3% and 3.7%, respectively. They isolated HPV in cases of histologically verified CIN2. Specificity of the former test was estimated at 88.9% and of the latter – at 66.7%. Positive predictive values were 92.3% and 81.3%, respectively. Based on their studies the authors suggest that detection of HPV using the PreTect HPV-Proofer, combined with cytological exam may become an excellent screening test for cervical cancer. Similar remarks were presented by Hovland et al.⁽²⁸⁾

cytologii lub z rozpoznaniem ASCUS i LSIL oceniona częstość występowania wirusa HPV była statystycznie większa w przypadku zastosowania metod PCR w porównaniu z testem PreTect HPV-Proofer. W przypadkach HSIL autorzy określili specyficzność testu PreTect HPV-Proofer na 97,3%, natomiast dla metody Gp5+/6+ PCR – na 90%. Pozytywne wartości predykcyjne wynosiły odpowiednio 10,3 i 3,7%. Izolowali również HPV w przypadkach potwierdzonych histologicznie CIN2. Specyficzność pierwszego z testów ocenili na 88,9%, natomiast drugiego – na 66,7%. Pozytywne wartości predykcyjne wynosiły odpowiednio 92,3 oraz 81,3%. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy zasugerowali, że wykrywanie HPV metodą PreTect HPV-Proofer połączone z badaniem cytologicznym może stać się bardzo dobrym testem przesiewowym w kierunku raka szyjki macicy. Podobne spostrzeżenia przedstawili Hovland i wsp.⁽²⁸⁾

Lie i wsp.⁽²⁹⁾ również zauważyli przewagę testu wykrywającego E6/E7 mRNA HPV nad metodą wykrywania DNA HPV. Zastosowali do wykrywania mRNA wirusa test PreTect HPV-Proofer, natomiast do izolacji DNA HPV – technikę Hybrid Capture II. Stwierdzili przewagę badania mRNA HPV nad HCII jako badania wylaniającego grupę kobiet zagrożonych rozwojem raka szyjki macicy. Porównywali częstość izolacji HPV wyżej wymienionymi metodami w zależności od rozpoznań cytologicznych i histologicznych. Zaobserwowali większą specyficzność testu PreTect HPV-Proofer w porównaniu z izolowaniem DNA HPV metodą HCII. Podobne doświadczenia zaprezentowali Keegan i wsp.⁽²⁶⁾

W związku z tak obiecującymi wynikami dotychczasowych badań należy stwierdzić, że oznaczanie transkryptów E6/E7 równocześnie z badaniem cytologicznym może stać się bardzo precyzyjną metodą w profilaktyce raka szyjki macicy. Przy pomocy testu PreTect HPV-Proofer wykrywa się mniejszą liczbę kobiet z pozytywnymi wynikami w kierunku HPV, ale jednocześnie metoda ta pozwala wyodrębnić grupę pacjentek, które są najbardziej narażone na progresję zmian w kierunku raka szyjki macicy.

Lie et al.⁽²⁹⁾ also noticed superiority of tests detecting HPV E6/E7 mRNA over techniques detecting HPV DNA. They used the PreTect HPV-Proofer test to detect viral mRNA and the Hybrid Capture II technique to isolate HPV DNA. They report on an advantage of HPV mRNA over HCII, as screening test to select women at risk of developing cervical cancer. They compared the frequency of HPV isolation by the above-mentioned methods, depending on cytological and histological findings. They noticed higher specificity of the PreTect HPV-Proofer test as compare with isolation of HPV DNA by the HCII technique. Similar results were obtained by Keegan et al.⁽²⁶⁾

In view of such a promising results we feel entitled to state that study of E6/E7 transcripts combined with cytological exam may become a highly precise tool in the prevention of cervical cancer. Using the PreTect HPV-Proofer test, a significantly smaller number of HPV-positive women are detected, but this method makes also possible selection of a group of patients most at-risk of progression of their lesion to cervical cancer.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., i wsp.: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
2. Majewski S., Pniewski T., Goyal-Stec M.: Rola wirusów brodawczaka w rozwoju zmian łagodnych i złośliwych okolicy narządów płciowych. *Zakażenia* 2006; 2: 73-78.
3. Pao C.C., Tsai P.L., Chang Y.L., i wsp.: Possible non-sexual transmission of genital human papillomavirus infections in young women. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12: 221-222.
4. Armstrong D.K., Handley J.M.: Anogenital warts in prepubertal children: pathogenesis, HPV typing and management. *Int. J. STD AIDS* 1997; 8: 78-81.
5. Majewski S., Sikorski M. (red.): Szczepienia przeciw HPV. Profilaktyka raka szyjki macicy i innych zmian związanych z zakażeniem HPV. Wyd. Czelej, Lublin 2006.
6. Malarewicz A.: Cytodiagnostyka patologii szyjki macicy. Blackhorse, Warszawa 2002.
7. Korobowicz E., Kwaśniewska A., Georgiades I.: The diagnostic value of cytomorphological traits in low and high risk type HPV infections. *Pol. J. Pathol.* 1997; 48: 107-112.

8. Basta A.: Rola infekcji wirusowych w etiopatogenezie raka szyjki macicy. W: Markowska J. (red.): *Onkologia ginekologiczna*. Urban & Partner, Wrocław 2002.
9. Meyer J.L., Hanlon D.W., Andersen B.T. i wsp.: Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK41 assay: correlation with biopsy follow-up results. *Cancer* 2007; 111: 83-92.
10. Griesser H., Sander H., Hilfrich R. i wsp.: Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2004; 26: 241-245.
11. Meschede W., Zumbach K., Braspenning J. i wsp.: Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 475-480.
12. Sasagawa T., Rose R.C., Azar K.K. i wsp.: Mucosal immunoglobulin-A and -G responses to oncogenic human papilloma virus capsids. *Int. J. Cancer* 2003; 104: 328-335.
13. Tabrizi S.N., Frazer I.H., Garland S.M.: Serologic response to human papillomavirus 16 among Australian women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2006; 16: 1032-1035.
14. Łukaszuk K., Liss J.: Wartość kliniczna stosowanych testów diagnostycznych na obecność infekcji HPV w profilaktyce leczenia raka szyjki macicy. *Ginekol. Pol.* 2002; 73: 719-726.
15. Kwaśniewska A., Skoczyński M., Semczuk-Sikora A., Goździcka-Józefiak A.: PCR and Digene Hybride Capture System I in identification of human papillomavirus. *Ginekol. Pol.* 2001; 72: 1497-1500.
16. Bosh F.X., Lorincz A., Muñoz N. i wsp.: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55: 244-265.
17. Muñoz N., Bosh F.X., de Sanjose S. i wsp.: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 518-527.
18. Gravitt P.E., Janshidi R.: Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2005; 19: 439-458.
19. Ginocchio C.C.: Assays for detection of human papillomavirus. *J. Clin. Virol.* 2004; 31.
20. Tonon S.A., Picconi M.A., Bos P.D. i wsp.: Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J. Clin. Virol.* 2001; 21: 129-134.

21. Das B.C., Sharma J.K., Gopalakrishna V., Luthra U.K.: Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 2327-2336.
22. do Horto dos Santos Oliveira L., Rodrigues Ede V., de Salles Lopes A.P. i wsp.: HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *Sao Paulo Med. J.* 2003; 121: 67-71.
23. Kulmala S.M., Syrjänen S.M., Gyllenstein U.B. i wsp.: Early integration of high copy HPV 16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J. Clin. Pathol.* 2006; 59: 513-517.
24. Harro C.D., Pang Y.Y., Roden R.B. i wsp.: Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93: 284-292.
25. Sotlar K., Stubner A., Diemer D. i wsp.: Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 2004; 74: 107-116.
26. Keegan H., Mc Inerney J., Pilkington L. i wsp.: Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens. *J. Virol. Methods* 2009; 155: 61-66.
27. Molden T., Kraus I., Karlsen F. i wsp.: Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: A cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 367-372.
28. Hovland S., Lie A.K., Risberg B. i wsp.: Calculation from a High Risk Population study. (Poster) 22 International Papillomavirus Conference, Vancouver, BC, Canada, April 30 – May 6, 2005.
29. Lie A.K., Risberg B., Borge B. i wsp.: DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 2005; 97: 908-915.

Zasady prenumeraty kwartalnika „Current Gynecologic Oncology”

1. Prenumeratę można rozpocząć od dowolnego numeru pisma. Prenumerujący otrzyma zamówione numery kwartalnika pocztą na podany adres.
2. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 40 zł. Przy zamówieniu rocznej prenumeraty (4 kolejne numery) koszt całorocznej prenumeraty wynosi 120 zł. Koszt całorocznej prenumeraty zagranicznej wynosi 50 dolarów.
3. Istnieje możliwość zamówienia numerów archiwalnych (do wyczerpania nakładu). Cena numeru archiwalnego – 40 zł.
4. Zamówienie można złożyć:
 - Wypełniając załączony blankiet i dokonując wpłaty w banku lub na pocztę.
 - Dokonując przelewu z własnego konta bankowego (ROR) – wpłaty należy kierować na konto: Medical Communications Sp. z o.o., ul. Ojcowska 11, 02-918 Warszawa Deutsche Bank PBC SA 42 1910 1048 2215 9954 5473 0001 Prosimy o podanie dokładnych danych imiennych i adresowych.
 - Drogą mailową: redakcja@ginekologia.pl.
 - Telefonicznie lub faksem: tel.: 022 651 97 83, faks: 022 842 53 63.
 - Wypełniając formularz prenumeraty zamieszczony na stronie www.ginekologia.pl/gazeta.
5. Zamawiający, którzy chcą otrzymać fakturę VAT, proszeni są o kontakt z redakcją.

Rules of subscription to the quarterly “Current Gynecologic Oncology”

1. Subscription may begin at any time. Subscribers will receive ordered volumes of the journal to the address provided.
2. A single volume of the quarterly costs 40 PLN. The cost of annual subscription (4 consecutive volumes) is 120 PLN. The cost of annual subscription for foreign subscribers is 50 USD.
3. Archival volumes may be ordered at a price of 40 PLN per volume until the stock lasts.
4. Orders may be placed:
 - By filling-in attached form and making a payment by bank or post-office.
 - By making a money transfer from own bank account – payments should be made payable to: Medical Communications Sp. z o.o., ul. Ojcowska 11, 02-918 Warszawa Deutsche Bank PBC SA 42 1910 1048 2215 9954 5473 0001 Please provide a precise address and nominative data.
 - By e-mail: redakcja@ginekologia.pl.
 - By phone or by fax: phone: +48 22 651 97 83, fax: +48 22 842 53 63.
 - Filling-in a subscription form, which may be found on the page www.ginekologia.pl/gazeta.
5. Customers wishing a VAT invoice, are requested to contact directly the Editor.