

Polymerase-Chain-Reaction Assay for Cytomegalovirus Screening in Newborns. N Engl J Med. 2011 Jun 2;364(22):2111-8.

10. Vladimir Nahaba: Metodele molecular genetice de cercetare (PCR) în diagnosticul de laborator al infecțiilor , Chișinău 2009 , 7-14 p.
web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

TESTUL HPV- DETECTAREA ȘI GENOTIPAREA TULPINILOR CU RISC ONCOGEN ÎNALT / SCĂZUT

Natalia Gheciu, Aliona Chirca, Anatol Vișnevschi

Catedra Diagnostic de Laborator clinic USMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

HPV test - detection and genotyping of the strains with high / low oncogenic risk

Human Papillomavirus (HPV) is the most common cause of cervical cancer. Cervical cancer represents the second most common cause of death after breast cancer, affecting women of different age groups; with a prevalence of over than about 20% in young sexually active women. Among different types of HPV, type HPV16-18 represents major strains causing this cancer and being sexually transmitted it had been unnoticed for decades. Elaboration and implementation of various diagnostic methods prove to be an effective way in eradicating the oncogenic potential of HPV.

Rezumat

Papilomavirus uman (HPV) este cea mai frecventă cauză a cancerului de col uterin. Cancerul cervical reprezintă a doua cauză de deces la femei după cancerul mamar care afectează femeile de diferite vârste cu o prevalență mai înaltă de aproximativ 20% la cele tinere active sexual. Printre diferite tipuri de HPV, tipul 16 -18 sunt tulpini majore care cauzează acest tip de cancer. Elaborarea și implementarea diverselor procedee de diagnosticare se dovedesc a fi o modalitate eficientă în eradicarea potențialului oncogenic de HPV.

Actualitatea

Cancerul cervical este una din cauzele de bază a mortalității femeilor, îndeosebi a celor tinere. Raportul variază peste tot în lume, dar o rată semnificativ de mare a fost stabilită în țările occidentale [11]. În urma unor analize statistice și geografice s-a demonstrat ca nivelul HPV e mai mare la femeile americane decât la cele caucaziene.[8]

Conform statisticilor a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) sunt înregistrate aproximativ 500.000 de cazuri noi anual din care 250.000 cazuri sunt fatale. Conform celor mai recente rapoarte, femeile sunt predispuse la această infecție de două ori mai mult decât bărbații [9].

Prevalența globală a HPV în rândul femeilor indiferent de rasă constituie o rată de 17,9% în timp ce bărbații au o rată de 8%. Persoanele cu multipli parteneri sexuali sunt predispuși la un risc mai mare de infectare cu HPV de 20,1% față de persoanele care au un singur partener sexual pe întreaga durată a vieții sexuale, la care riscul de infectare cu HPV e de 7% [8].

Virusul Papiloma Uman este un virus frecvent întâlnit care cauzează leziuni celulare sau tumori la nivelul pielii; deasemenea poate determina modificări ale țesuturilor de la nivelul membrelor superioare și inferioare, corzilor vocale, gurii și organelor genitale [13].

Tipurile HPV

Actualmente sunt identificate mai mult de 100 tipuri de HPV, fiecare tip având tropism către anumite țesuturi. Modificările tisulare determinate de anumite tipuri de HPV pot servi ca substrat pentru dezvoltarea cancerelor organelor genitale feminine.

În funcție de asocierea lor cu cancerul și gradul de patogenitate diferite genotipuri de HPV sunt clasificate în tipuri cu risc oncogen scăzut și risc oncogen înalt. Genotipurile "cu risc scăzut" sunt rareori asociate cu cancer în timp ce genotipurile "cu risc ridicat" sunt mult mai susceptibile de a conduce la dezvoltarea cancerului.

- **Genotipuri cu risc crescut** (oncogene sau cancer asociate) sunt: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 și 82
 - Posibile genotipuri cu risc ridicat includ: 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 și 97.
 - HPV 16 este tipul predominant, provocând mai mult de 50% din cazurile de cancer; urmează HPV 18 provocând 14%; și HPV 45 cu 2,8% cazuri. Aceste genotipuri sunt foarte răspândite în toate regiunile din lume și sunt responsabile în aproximativ 70% de dezvoltarea cancerului de col uterin [11,15]. HPV tipurile 52 și 58 sunt rare în țările occidentale, cu toate acestea, ele sunt predominante în populația din Asia în special în China (5, 14, 15, 28, 29).
- **Genotipuri cu risc scăzut** (non-oncogene) sunt: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 73 și 81.
 - Genotipurile 6 și 11 determină aproximativ 90% dintre cazurile de negi anogenitali. Cu toate acestea, genotipurile care cauzează condiloame anogenitale, de obicei, nu produc cancer[11,15].

Cauzele și factorii de risc în dezvoltarea HPV

În ceea ce privește cauzele dezvoltării infecției cu HPV sunt implicați o multitudine de factori. Comportamentul sexual este cel mai important factor pentru tulpinile cu risc oncogen înalt [9]. În ciuda comportamentului sexual alți factori ar putea fi, de asemenea implicați în dezvoltarea acestei infecții. Este important de menționat că nu toate infecțiile cu HPV duc la o boală malignă, cu toate acestea, cele două tulpini de HPV care sunt HPV 16 și HPV 18 contribuie la dezvoltarea în principal al cancerului de col uterin [9].

Alți factori includ fumatul, utilizarea extinsă de contraceptive orale și prezența bolilor cu transmitere sexuală. Factorii care deasemenea sporesc incidența cancerul de col uterin includ imunosupresia, persistența virusului, și administrarea de hormoni steroizi [8,9].

Proteinele structurale

Există două proteine, L1 și L2, care formează structura icosaedrică a virionului. L1 este proteină majoră a capsidului, în timp ce L2 reprezintă componenta minoră. L1 singură poate forma structura icosaedrică în celulele eucariote. Microscopia electronică a demonstrat că L1 formează particule aproximativ de mărimea unui virion complet, motiv pentru care sunt numite particule virus-like (VLPs). Proteina L2 poate și ea să aibă expresie la nivelul celulelor unde va forma o structură capsidică similară cu L1. Expresia comună a L1 și L2 determină creșterea nivelului de VLPs, sugerând că L2 ajută astfel la stabilizarea capsidului. L2 poate funcționa la nivelul virionilor pentru a lega genomul.

Importanța sistemului VLPs o reprezintă faptul că s-a arătat pentru prima dată că există diferențe serologice între tipurile de HPV, chiar și între acelea foarte apropiate. De exemplu, proteina L1 a tipurilor virale HPV16 și -31 care împart 76% din identitate la nivelul aminoacizilor, are reactivitate serologică încrucișată foarte scăzută, iar tipurile HPV6 și -11 care au 92% omologie, prezintă patru diferențe în reactivitatea reciprocă.

Astfel, studiile serologice pentru depistarea infecțiilor specifice HPV pot fi deosebite doar prin folosirea VLPs. O consecință a acestei descoperiri este aceea că dacă s-ar produce un

vaccin, ar trebui incluse mai multe tipuri virale din moment ce un singur tip nu induce protecție încrucișată.

Infecția HPV la nivelul cervixului normal

ADN-ul HPV poate fi depistat în celulele cervicale la femeile la care cervixul apare normal la colposcopie. Incidența depistării variază dramatic în funcție de metoda utilizată, de vârstă și de grupul demografic studiat. Cea mai sensibilă tehnică este PCR care a înregistrat niveluri de pozitivitate de 80% pentru HPV16 la femeile cu cervix normal [4,13].

Este dificil de comparat multe din rezultatele acestor studii la femeile normale pentru că subiecții aveau vârste diferite, metoda de depistare a fost diferită, femeile au avut niveluri socio-economice diferite, iar definiția clinică a “normalului” a variat; unele studii s-au bazat numai pe rapoartele citologice, fără să fie efectuată colposcopia.

Incidența cea mai mare a depistării se întâlnește la femeile tinere. Într-un studiu efectuat la studentele din Berkeley s-au obținut 33% rezultate pozitive pentru HPV prin tehnica PCR. Rata prevalenței la nivelul cervixului și vulvei a fost de 46%. Este una dintre cele mai mari incidențe raportate [4,13].

HPV tipurile 16 și 18 care sunt frecvent întâlnite în bolile maligne, reprezintă aproximativ o treime din virusurile detectate, ceea ce înseamnă că o mare parte din femeile tinere pot fi infectate cu aceste virusuri care determină cancerul [8]. Este evident că numai un număr mic vor dezvolta boala, dar recunoașterea celor cu risc nu este posibilă în prezent. La grupele de vârstă mai mari (>35 de ani) rata depistării scade și, în timp ce la 20 de ani majoritatea femeilor sunt negative pentru boală, femeile peste 35 de ani infectate cu un tip oncogenic sunt mai predispuse la boală. Astfel, la grupa de vârstă mai mare, infecția cu HPV este predictivă pentru boală și poate indica un grup la care testarea ADN are valoare diagnostică [2,8].

Este clar că există o incidență mai mare a infecției la grupele de vârstă mai tinere, cu valori de până la 46% la femeile de 20 de ani, dar acestea scad la <10% la cele peste 40 de ani și < 5% la femeile peste 55 de ani [8]. Este posibil că dacă toate femeile din grupul de vârstă < 25 de ani ar fi testate prin screening ADN la intervale regulate pe o perioadă de 5 ani, toate cele active sexual ar fi HPV pozitive la un moment dat, deși infecția și boala ar fi tranzitorii la majoritatea.

Deși cervixul este descris ca fiind normal la aceste femei pe criteriul “absenței de celule anormale” la examenul citologic și pe aspectul normal la colposcopie, este aproape sigur că aria în care are loc replicarea virală este anormală din punct de vedere histopatologic. Până acum nimeni nu a arătat replicare a HPV în țesuturile normale. Există probabil microleziuni prezente la nivelul cervixului când o femeie prezintă infecție subclinică cu HPV.

Studiile serologice au arătat rezultate pozitive la grupele de vârstă care nu sunt în mod normal asociate cu bolile cu transmitere sexuală [5]. Folosind în special proteine bacteriene fuzionate care conțin proteine HPV, s-au obținut rezultate pozitive pentru HPV genital la diferite grupe de vârstă, inclusiv la copii. Datorită faptului că proteinele fuzionate nu conțin epitopi nu este clar în prezent dacă rezultatele reprezintă infecții cu diferite tipuri de herpes genital cum ar fi HPV6 sau 16 sau reactivitate încrucișată cu tipurile cutanate de HPV, din moment ce multe proteine au niveluri crescute de conservare.

HPV și cervixul anormal

Cea mai frecventă leziune genitală produsă de infecția cu HPV este veruca genitală benignă condyloma acuminatum, determinată predominant de HPV6 și 11. Cu toate acestea, cum s-a discutat înainte, anumite papilomavirusuri determină de asemenea boli premaligne și maligne la nivelul cervixului. Verucile sunt distribuite la nivelul cervixului, pe pereții vaginului, vulvă și în regiunea perianală. La bărbați leziunile apar pe penis, în regiunea perianală, în special la homosexuali, și mai puțin frecvent pe scrot.

Leziunile premaligne asociate cu HPV pot să apară pe aceleași zone ca și verucile, deși cervixul reprezintă zonă în care transformarea malignă apare cel mai frecvent. Leziunile premaligne de la nivelul cervixului, neoplazia intraepitelială cervicală (CIN), sunt gradate de la I la III în ordinea crescătoare a severității cu CIN III care include carcinomul în situ, care precede cancerul invaziv.

De la introducerea noului sistem Bethesda, clasificarea s-a schimbat : leziuni scuamoase intraepiteliale (LSI) cu grad scăzut (LSI grad scăzut, atipii și CIN I) și LSI cu grad crescut (CIN II și CIN III) [11]. HPV6 și 11 și noile izolate 42, 43 și 44 au LSI cu grad scăzut, în timp ce tipurile oncogenice HPV 16 și 18 și cele mai puțin frecvente HPV 31, 33, 45 și 56 au toate gradele de LSI. Există un număr de tipuri HPV adiționale, dar genomul întreg nu a fost clonat.

Asa cum s-a menționat, leziunile intraepiteliale de la nivelul cervixului apar în totalitate la nivelul zonei de transformare, care este reprezentată de o arie de epiteliu metaplastic între exocervixul matur și epiteliul columnar al canalului endocervical [11]. Cancerul invaziv apare în aceste arii de LSI și celule maligne, apoi migrează la nivelul stromei uterine și în ganglionii limfatici locali. HPV 16 este cel mai frecvent virus la nivelul LSI și a fost depistat în 70% din cazurile de CIN III în Germania și UK, fiind izolat în 80% din cazurile de cancer invaziv de cervix [11]. În SUA, HPV 16 și 18 reprezintă 55% din LSI cu grad înalt și peste 70% din bolile maligne ale cervixului. Studiile epidemiologice au arătat că depistarea HPV este asociată cu un risc de 10 ori mai mare al CIN [8,11].

În timp ce HPV6 și 11 nu s-au întâlnit în bolile maligne ale cervixului, ele au fost izolate de la nivelul leziunilor locale invadate ale vulvei, cum ar fi carcinomul verucos și tumorile Buschke-Lowenstein . Genomurile de la nivelul acestor leziuni au fost secvențializate, găsindu-se deleții și duplicații în regiunea reglatoare, ceea ce a sugerat că aceste rearanjamente genetice au alterat patogenitatea.

Boala maligna a penisului, rară în țările industrializate, este mult mai frecventă în zonele sărace ale lumii cum ar fi America de Sud și Africa. Virusurile asociate în mod frecvent cu cancerul cervical, ca HPV16 și 18 sunt depistate în peste 50% din cazurile de cancer penian [8].

Atât în cancerul cervical, cât și în cel penian, ADN-ul HPV este integrat în genomul celulei gazdă, în timp ce în leziunile premaligne ADN-ul viral este liber și capabil să producă particule virale infecțioase. Faptul că cele mai multe cancere invazive (90%) conțin secvențe integrate, acestea se pare că sunt premaligne [12]. Această stare particulară se pare că selectează celulele pentru conversia malignă, din moment ce numai acele celule cu ADN integrat în E1 și E2 se găsesc la nivelul țesutului canceros.

Există dovezi că integrarea în regiunile E1 și E2 ale genomului determină un reglaj al E6 și E7 rezultând astfel o mai mare stabilitate în codul ARNm pentru aceste proteine când se folosește o altă celulă decât cea virală. S-a stabilit că integrarea poate avea loc în câteva celule în faza premalignă a bolii și este probabil că acestea să capete potențial invadant. Cu toate acestea, există modificări moleculare care nu sunt încă cunoscute [10].

Transmiterea

Se cunoaște de la începutul anilor 1950 că verucile genitale sunt transmise prin contact sexual. Aceste rezultate au fost confirmate de studiile ulterioare, când s-a demonstrat că transmiterea sexuală a virusurilor determină malignizarea. În plus, studiile efectuate la partenerii femeilor cu CIN (**neoplazia intraepitelială cervicală**) au arătat ca ei au incidență crescută a infecției care determină boli benigne sau premaligne, în funcție de tipul virusului [11].

Astfel, calea sexuală de transmitere este bine stabilită la adulți. Transmiterea la nou-născuți în timpul nașterii vaginale se crede că reprezintă cauza papiloamelor laringiene și poate să contribuie la unele din cazurile de infecție genitală întâlnite la copiii mai mari. Deși copiii pot să fie bine în ultima parte din prima decadă de viață când apar pentru prima dată semnele clinice

de infecție HPV, la nivelul laringelui sau zonei genitale, transmiterea la naștere reprezintă o posibilitate din moment ce se știe că ADN-ul viral poate persista.

Astfel, pentru apariția infecției este necesar contactul intim și frecvent. Cu toate acestea, se cunoaște foarte puțin despre căi alternative de transmitere, cum ar fi infecția transmisă prin obiecte.

Persistența HPV

Peste 90% din infecțiile cu HPV par a se vindeca pe cont propriu în termen de 2 ani. Timpul necesar pentru curățare pare să varieze cu diferite genotipuri HPV, variind de la cinci - șase luni pentru genotipurile cu risc scăzut și opt la 14 luni pentru genotipurilor cu risc ridicat. Eliminarea virusului de HPV a fost determinată de incapacitatea de prelevare de probe pentru a detecta infecția cu HPV. Nu este clar dacă virusul este complet eliminat sau dacă aceasta rămâne latentă în celulele bazale și poate reactiva în condiții imunocompromise [6,7].

Detectarea și genotiparea tulpinilor cu HPV

A fost creată o metodă rapidă, sensibilă, de calitate, colorimetrică de amplificare izotermă a buclei (LAMP) cu colorant albastru (HNB) de hydroxynaphthol pentru a detecta papilomavirus uman deosebit de riscant (HPV) a genotipurilor 16, 18, 45, 52, și 58 [4]. Toate studiile de validare inițiale cu ADN-ul de control s-au dovedit a fi de tip specific. Testul colorimetric LAMP specifice acestui tip ar putea realiza o sensibilitate de la 10 până la 100 de exemplare, la 63 ° C timp de 65 min, comparabilă cu cea a PCR în timp real. În scopul de a evalua fiabilitatea HPV de tip specifice, testul LAMP a fost evaluat în continuare cu ADN HPV de la un grup de 294 de specimene clinice ale căror statutul HPV a fost anterior determinat cu o metodă nouă de dactilografiere cu o singură etapă cu PCR multiplex [13].

Astfel, screening-ul de col uterin ar putea fi îmbunătățit prin testarea pentru ADN al tipurilor cu risc ridicat de HPV ca un instrument de screening primar.

Tehnologiile disponibile pentru genotiparea HPV variază în funcție de metodă și platformă și poate oferi caracterizări specifice de tip pentru o multitudine de diferite tipuri de HPV cu risc oncogen înalt și scăzut. De exemplu, testul Qiagen Hybrid Capture 2 HPV ADN (HC2) și testul Roche Amplicor HPV (Amplicor) detecta ADN a 13 tipuri de HPV cu risc ridicat. Testul de genotipare în linie a HPV permite discriminarea a 37 de genotipuri de HPV.

Testul de screening PapilloCheck HPV (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germania) este un sistem de detectare și identificare a 24 de genotipuri de HPV pe baza de microaranjare în linie a ADN PCR. Totuși, aceste metode nu ar putea fi adecvate în situații clinice primare în țările în curs de dezvoltare sau pentru utilizare pe teren, din cauza instrumentelor sofisticate necesare, elaborare și procedurile complicate de testare și reactivi scumpi [6].

Prin urmare, există o cerere tot mai mare pentru teste moleculare simple și economice. Amplificarea izotermică a buclei (LAMP) este o amplificare a acidului nucleic, metodă dezvoltată de Notomi și a apărut ca un instrument puternic de amplificare a genei datorită simplității sale, vitezei, specificității, și costurilor eficiente [4].

Această tehnică este utilizată din ce în ce mai mult pentru rapiditate și detectare vizuală și tipizarea de viruși în curs de dezvoltare. Una dintre caracteristicile cele mai atractive ale acestui test este că rezultatele LAMP pot fi observate și determinate de colorant mediat HNB și vizualizate cu ochiul liber și fără a deschide tuburile după amplificare.

Concluzii

Identificarea precoce a HPV cu risc înalt de dezvoltare a cancerului este importantă deoarece prezența acestui virus poate servi ca indicator a infecției și ca marker tumoral. În

plus, tehnicile de identificare virală pot servi ca bază pentru stabilirea strategiei terapeutice individuale și dezvoltarea noilor principii terapeutice axate spre eradicarea infecției HPV.

Bibliografie

1. Asato T, Maehama T, Nagai Y, Kanazawa K, Uezato H, Kariya K: A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis* 2004, 189:1829-32.
2. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, Herbrink P: Comprehensive study of several general and type specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 1996, 34:745-747.
3. Canadian Consensus Guidelines on Human Papillomavirus, *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada* 2007:29 (8, supplement 3):S1-S56.
4. Castle, P. E., et al. 2008. A comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J. Clin. Microbiol.* 46:3437–3445.
5. Cobo F, Concha A, Ortiz M: Human papillomavirus (HPV) type distribution in females with abnormal cervical cytology. A correlation with histological study. *Open Virol J* 2009, 3:60–66.
6. Dalstein, V., et al. 2009. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J. Virol. Methods* 156:77–83.
7. Dobec, M., F. Bannwart, F. Kaeppli, and P. Cassinotti. 2009. Automation of the linear array HPV genotyping test and its application for routine typing of human papillomaviruses in cervical specimens of women without cytological abnormalities in Switzerland. *J. Clin. Virol.* 45:23–27.
8. Dunne, E.F., Unger, E.R., Sternberg, M., McQuillan, G., Swan, D.C., Patel, S.S. & Markowitz, L.E. (2007). Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, 297(8):813-819.
9. Faridi et al.: Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal* 2011 8:269.
10. Gao P, Zheng J: High-risk HPV E5- induced cell fusion a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *J Virol* 2010, 7:238.
11. García-Espinosa et al.: Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain. *BMC Cancer* 2012 12:533.
12. Herbert J, Coffin J: Reducing patient risk for human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Am Osteopathic Assoc* 2008, 108:65-70.
13. Nishiwaki, M., et al. 2008. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *J. Clin. Microbiol.* 46:1161–1168.
14. Travasso, C., M. Anand, M. Samarth, A. Deshpande, and C. Kumar-Sinha. 2008. Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical cancer patients from India. *J. Biosci.* 33:73–80.
15. Venuti A, Badaracco G, Sedati A, Carbini R, Marcante ML: Determinants of HPV types 16,18 infections in the lower female genital tract in an Italian population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004, 15:205-10.