

Anna Żuk-Wasek

## ANALIZA WYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW WIRUSA BRODAWCZAKA CZŁOWIEKA U PACJENTÓW BADANYCH W NIZP-PZH W LATACH 2007-2009

### THE ANALYSIS OF THE OCCURENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES IN PATIENTS SURVEYED IN NIPH-NIH IN 2007-2009

Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-  
Państwowego Zakładu Higieny

#### STRESZCZENIE

Celem pracy było określenie częstości występowania zakażeń poszczególnymi genotypami ludzkiego wirusa papilloma. W latach 2007-2009 w NIZP-PZH przeprowadzono 250 badań diagnostycznych w kierunku tego wirusa, wśród 222 kobiet i 25 mężczyzn. Badania przeprowadzono metodą PCR, a następnie przeprowadzono hybrydyzację metodą LiPA. Wynik dodatni otrzymano w 66,4 %, a ujemny w 27,2 % przypadków. U 30,0 % badanych osób wykryto zakażenie pojedynczym genotypem. Zakażenia mieszane stanowiły 32,0 % (w jednej próbce od jednej osoby). W zakażeniach mieszanych wykrywano dwa (15,6% badanych osób), trzy (11,6%), cztery (4,4%), a nawet pięć genotypów (0,4%) w próbce od jednej osoby. Najczęściej obserwowano zakażenie genotypem 51 (w ponad 20% przypadków), potem 66 (w 14%) i genotypem 11 (w ponad 11%). Wśród badanych prób nie wykryto genotypów 43 i 80. Zakażenia typami 16 i 18 wykryto odpowiednio w 7,6% i 4,8% badanych przypadków.

**Słowa kluczowe:** *diagnostyka HPV, hybrydyzacja, genotypowanie*

#### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the frequency of each genotype of papillomavirus caused infection in human. In the years 2007-2009 in NIPH-NIH diagnostic tests were carried out, among 250 participants (222 women and 25 men). The samples were tested by PCR and subsequently LiPA hybridization was performed. Positive results were obtained in 66,4% and negative in 27,2% of all examined cases. In 30,0% of the examined cases only one genotype was detected. Mixed infections were diagnosed in 32,0% (of cases from one person). In mixed infections two (15,6% of tested patients), three (11,6%), four (4,4%) and even five genotypes were detected. HPV 51 was the most frequently detected type (in over 20% of cases), followed by HPV 66 (in 14%) and HPV 11 (over 11%). The genotypes 43 and 80 were not detected. HPV 17 and HPV18 types were confirmed in 7,6% and 4,8% of all tested cases.

**Key words:** *HPV diagnostic, hybridisation, genotyping*

#### WSTĘP

Wirusy brodawczaka człowieka (HPV- *human papillomavirus*) uznaje się za główny czynnik etiologiczny raka szyjki macicy. Zakażenie tymi wirusami może ponadto prowadzić do rozwoju innych nowotworów: warg sromowych, odbytu, waginy, penisa oraz brodawczaka/raka krtani. Powoduje także powstawanie łagodnych zmian; brodawek dłoni, stóp, narządów płciowych. Do tej pory opisano ponad 100 genotypów tego wirusa. Dzielimy je na genotypy wysokiego i niskiego ryzyka rozwoju nowotworu. Do grupy o wysokim ryzyku zaliczamy genotypy: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, 73, 82 (1).

Komórkami docelowymi dla papillomawirusów są komórki epitelialne. Wirus namnaża się tylko w różniących się keranocytach. Około 80 % zakażeń ma charakter przemijający i wirus zostaje wyeliminowany z organizmu. Część zakażeń przechodzi jednak w fazę przewlekłą i może prowadzić do transformacji nowotworowej (2).

Najwięcej zakażeń HPV obserwowane jest u kobiet poniżej 30 roku życia. Najczęstszą drogą przenoszenia HPV są kontakty seksualne. Do czynników ryzyka zakażenia HPV należą: wczesna inicjacja seksualna, większa liczba partnerów, immunosupresja oraz istniejące stany zapalne narządów płciowych.

W czasie porodu wirus może być przeniesiony od matki na dziecko powodując powstanie zakażenia przetrwałego. Młodzieńczego brodawczaka krtani wywołują typy 6 i 11, te same, które są również przyczyną powstawania kłykcin kończystych.

Szansą zredukowania zachorowalności na raka szyjki macicy wydaje się być stosowanie szczepień opracowanymi w ostatnich latach szczepionkami przeciw typom 6, 11, 16 i 18 wirusa papilloma (3).

## MATERIAŁY I METODY

W Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego-Państwowym Zakładzie Higieny od kwietnia 2007 roku do czerwca 2009 roku przeprowadzono 250 badań diagnostycznych w kierunku oznaczenia genotypów wirusa ludzkiego brodawczaka. Pierwsze 144 badania przeprowadzono w kierunku obecności 16 genotypów (6, 11, 16, 18, 31, 33, 40, 45, 51, 53, 54, 58, 59, 66, 68, 70) a kolejne 106 badań na obecność 28 genotypów (6, 11, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74, 82). Badania diagnostyczne objęły grupę 222 kobiet w wieku od 17 do 57 lat i 25 mężczyzn w wieku od 21 do 54 lat. Od 6 osób pobrano podwójne wymazy z różnych miejsc. Od rocznej dziewczynki pobrano wycinek podniebienia, od 8-letniej dziewczynki wycinek ust i od 10-letniego chłopca z języka. Liczby pobranych wymazów z różnych miejsc przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Miejsce pobrania i liczba pobranych próbek badanych w kierunku HPV w NIZP-PZH w latach 2007-2009

Table I. Place of sampling and number of probes tested on HPV presence in NIPH-NIH in 2007-2009

Miejsce pobrania	Ilość próbek
Szyjka macicy	199
Srom	9
Pochwa	3
Prącie	18
Cewka moczowa	3
Wymaz spod napletka	2
Wycinek podniebienia	1
Wycinek ust	1
Narośl z języka	1

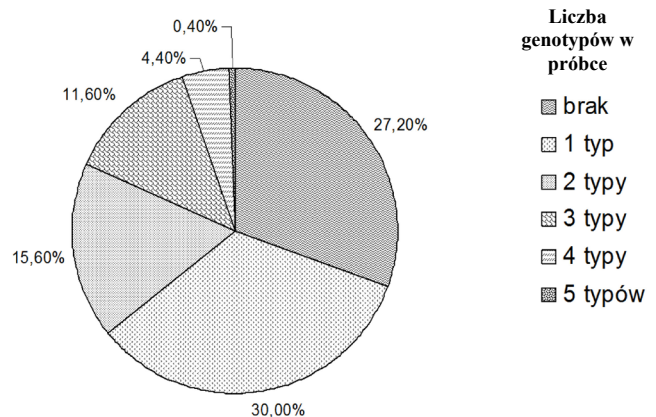
Z pobranych prób izolowano DNA zestawem QIAGEN, a następnie przeprowadzano reakcję łańcuchowej polimerazy PCR na gotowym zestawie INNO-LIPA (INNOGENETICS) w warunkach ustalonych przez producenta testu. Otrzymane produkty reakcji PCR analizowano w żelu agarozowym. Próby dodatnie analizowano dalej wykonując hybrydyzację metodą LiPA komercyjnym zestawem firmy INNOGENETICS i od-

czyt wyników przeprowadzonych zgodnie z instrukcją producenta testu.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznie przy pomocy programu Statgraphics Centurion XV.

## WYNIKI

Podczas badań diagnostycznych w kierunku HPV w latach 2007-2009 wśród 250 badanych prób po reakcji PCR w 68 (27,2%) nie wykryto DNA HPV, w 16 (6,4%) wynik był wątpliwy, a w 166 (66,4%) wykryto DNA HPV. Wśród prób dodatnich i wątpliwych poddanych dalszej analizie, w 27 (10,8%) nie wykryto żadnego z badanych genotypów HPV. U 75 badanych osób (30,0% spośród dodatnich i wątpliwych wyników) stwierdzono zakażenie pojedynczym genotypem. Zakażenia mieszane 80 osób stanowiły 32%, wśród których u 39 osób (15,6%) wykryto dwa genotypy, u 29 osób (11,6%) trzy genotypy, cztery u 11 osób (4,4%) i pięć genotypów w jednej (0,4%) próbce (ryc. 1).



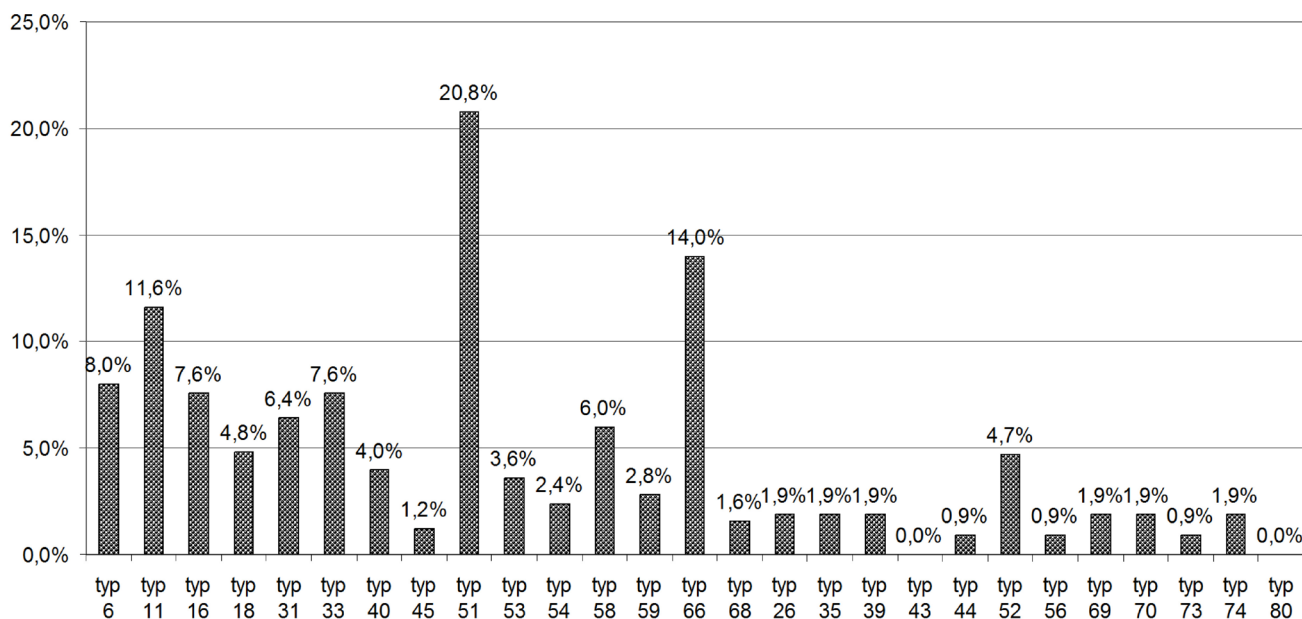
Ryc. 1. Odsetek próbek, w których stwierdzono zakażenie mieszane, z podziałem na liczbę wykrytych genotypów w badaniach NIZP-PZH w latach 2007-2009

Fig. 1. The percentage of probes with mixed infection, divided on number of detected genotypes in studies NIPH-NIH in 2007-2009

Najczęściej obserwowano zakażenie genotypem 51 (w ponad 20% przypadków), następnie 66 (w 14%) i genotypem 11 (w ponad 11%). Wśród badanych prób nie wykryto genotypów 43 i 80.

W wycinku podniebienia od rocznej dziewczynki wykryto genotyp 6, w wycinku z narośli języka od 10-letniego chłopca nie zidentyfikowano żadnego z badanych genotypów HPV, od 8-latki z wycinka ust wyizolowano genotyp 66.

W przypadku próbek dodatnich w PCR w 14,4% nie można było określić genotypu HPV. W przypadku wyników wątpliwych było to 25,0%. Zestawienie częstości wykrywania poszczególnych genotypów przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Odsetki wykrywania poszczególnych genotypów HPV u pacjentek diagnozowanych w NIZP-PZH w latach 2007-2009  
 Fig. 2. Percentage of detection of several HPV genotypes in patients diagnosed in NIPH-NIH in 2007-2009

Przeprowadzona analiza wykazała istnienie znaczącej zależności ( $P_0 < 0,0001$ ) pomiędzy liczbą współzakażających wirusów a jakościowym wynikiem PCR dla HPV.

Wątpliwe wyniki PCR występowały wyłącznie przy zakażeniu pojedynczym typem wirusa. Nie można było ustalić genotypu zakażającego wirusa w przypadku 9,6% badanych próbek (wśród nich 14,4% dodatnich wyników PCR i 25% wątpliwych wyników PCR). Dodatkowo wyniki PCR uzyskiwano znacząco częściej ( $P_0 < 0,02$ ) w grupie wieku 20-29 lat (77,7% badanych osób) niż w starszych grupach wieku, (56,2% wyników dodatnich w grupie 30-39 lat, 57,9% w grupie 40-49 lat i 46,2% u osób powyżej 49 roku życia). Odsetek wy-

ników ujemnych w poszczególnych grupach wieku przedstawiono na rycinie 3.

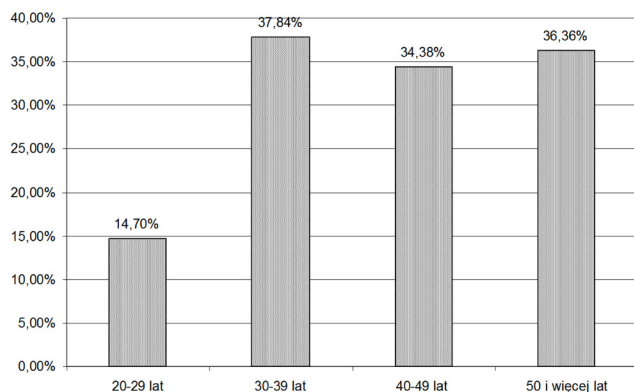
Z wiekiem badanych osób była również związana liczba wirusów wykrywanych w pojedynczej próbce ( $P_0 < 0,02$ ). Wśród kobiet najwyższa średnia liczba wykrywanych genotypów była w grupie 17-29 lat, najniższa w grupie 30-39 lat.

W trakcie badań producent dokonał zmiany dotyczącej swoistości testu (zmiana liczby genotypów HPV wykrywanych w badaniu); przeanalizowano wpływ tej zmiany na przedstawione powyżej wyniki analiz. Zmiana testu nie miała wpływu na uzyskane wyniki ( $P_0 > 0,53$ ).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Metodami referencyjnymi w diagnostyce zakażeń HPV są badania molekularne, pozwalające wykryć materiał genetyczny wirusa także w fazie utajonej (3). Materiałem do badań mogą być zarówno komórki nabłonka pobrane drogą wymazu bądź też biopsje. Dokładne oznaczenie genotypu pozwala na określenie, czy zakażenie jest spowodowane przez jeden czy więcej typów wirusa (zakażenie mieszane zwiększa ryzyko raka szyjki macicy) oraz czy zakażenie partnera lub okołoporodowe nastąpiło tym samym typem wirusa, co pozwala określić drogi rozprzestrzeniania się wirusa.

W poszczególnych regionach świata częstość występowania genotypów HPV jest różna, jednak wszędzie najczęściej wykrywany jest genotyp 16 (4). W Europie najczęściej wykrywane są kolejno: genotyp 16, 31, 51, 6, 33. W naszych badaniach najczęściej wykrywany



Ryc. 3. Odsetek wyników ujemnych w badanych próbkach z podziałem na grupy wieku, osób badanych w kierunku zakażenia HPV w NIZP-PZH w latach 2007-2009

Fig. 3. Percentage of negative probes, divided on age group, of patients tested on HPV infection in NIPH-NIH

był jednak genotyp 51, genotyp 16 był pod względem częstości wykrywania dopiero na piątym miejscu. W badaniach prowadzonych w Centrum Onkologii w Warszawie najczęściej wykrywano genotyp 16, następnie 42, 56, 45, 31, 52 i 51 (5). Różnice w częstości wykrywania poszczególnych genotypów mogą być spowodowane doborem grupy badanej. W innych badaniach prowadzonych w Polsce grupą badaną były pacjentki hospitalizowane, po zdiagnozowaniu i kwalifikacji zmian dysplastycznych nabłonka macicy (5). W NIZP-PZH, jak wspomniano, badania diagnostyczne wykonywano u pacjentek zgłaszających się do gabinetów ginekologicznych. Były to zarówno pacjentki pragnące poddać się szczepieniu przeciwko HPV, jak również pacjentki ze zmianami w nabłonku macicy, poddawane wstępnej diagnozie.

Badanie w kierunku HPV ma również zastosowanie w weryfikacji wyniku cytologicznego. W Polsce i na świecie większość badań w kierunku genotypowania HPV prowadzonych jest u kobiet ze zmianami dysplastycznymi nabłonka szyjki macicy: ASCUS (*atypical squamous cells of undetermined significance*), LSIL (*low-grade squamous intraepithelial lesions*) i HSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesions*) (5). W NIZP-PZH diagnozowano pacjentki gabinetów ginekologicznych, niehospitalizowane.

Wyniki badań w poszczególnych grupach wieku pokazują, że u pacjentek rozpoczynających współżycie (grupa 20-29 lat) liczba zakażeń jest najwyższa, natomiast po 30 roku życia obniża się. Jest to zgodne z wynikami wcześniejszych badań (7,8,9). Sugerują one także, że większość zakażeń HPV ulega samowyleczeniu. Konieczne jest jednak monitorowanie przebiegu zmian u zakażonych pacjentek.

Zdiagnozowanie zakażenia HPV u pacjentów pozwoli na uświadomienie im możliwości zakażenia współpartnerów. Zastosowanie odpowiedniego zabezpieczenia u takich pacjentów pozwoliłoby na przerwanie łańcucha epidemicznego.

Wyniki badań diagnostycznych populacji powinny również wskazywać kierunek badań, których celem jest opracowanie szczepionki przeciwko następnym genotypom wirusa brodawczaka człowieka.

## PIŚMIENNICTWO

1. Quadrivalent human papillomavirus vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunisation Practices (ACIP). MMWR 2007; 56.
2. Szkaradkiewicz A. Drobnoustroje i onkogeneza. Współcz Onkol 2003; 7:96-101.
3. Friedek D, Ekiel AM, Martirosian G. Szczepionki przeciw human papillomavirus (HPV)- nowa metoda profilaktyki raka szyjki macicy. Wiad Lek 2007, 40: 34-38.
4. Clifford G, Rana R, Fransceschi S, i in.. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographics region and with cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1157-1161.
5. Bardin A, Vaccarella S, Clifford GM, i in. Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Warsaw, Poland. Eur J Cancer 2008; 44: 557-564.
6. Nishiwaki M, Yamamoto T, Tone S, i in. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. J Clin Microbiol 2008; 46: 1161-1168.
7. Menzo S, Ciavatti A, Bagnarelli P, i in. Molecular epidemiology and pathogenic potential of underdiagnosed human papillomavirus type. BMC Microbiology 2008; 8:112.
8. Sellors JW, Mahony J.B, Kaczorowski J, i in. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) group. CMAJ 2000;163: 503-508.
9. Salimovic-Besic I, Bokal EV, Polijak M, Kocjan B. Prevalence of human papillomavirus infection in Slovenian women with repeated Pap II smears. Medicinski Arhiv 2005; 59: 47-51.

Otrzymano: 29.09.2010 r.

Zaakceptowano do druku: 8.11.2010 r.

### Adres do korespondencji:

Anna Żuk-Wasek

Zakład Wirusologii

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego

- Państwowy Zakład Higieny

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

tel. 54-21-285

e-mail: azuk@pzh.gov.pl