ПРЕВЕНЦИЈА НА ЦЕРВИКАЛЕН КАРЦИНОМ - ТИПИЗАЦИЈА НА HPV ВИРУСОТ СО МОЛЕКУЛАРНИ МЕТОДИ

Слаѓана Арсова[1], Биљана Ѓорѓеска[2], Софија Петковска[2]
[1] ГАК-Скопје, [2] Факултет за медицински науки, УГД, Штип

Абстракт

Хуманиот папилома вирус (HPV) е вирус од семејството папилома. HPV инфекцијата главно се дијагностицира со молекуларни методи. Молекуларните дијагностички методи овозможуваат идентификација на многу високоризични типови на HPV, со цел за подобра дијагноза и третман на пациентките.
Овој труд е изработен на Клиниката за Гинекологија и акушерство во Скопје, во Лабораторијата за молекуларна биологија. Во испитувањето се опфатени вкупно 14.229 примероци во период од пет години, од 2008. до 2012.
Резултатите покажуваат дека HPV 16 е генотип кој најчесто се јавува во сите анализирани примероци.
Од анализираните податоци може да се заклучи дека има значителен пораст на HPV инфекцијата со зголемување на хистопатолошкиот градус. Исклучително високиот процент на HPV инфекцијата во прекурсорните лезии на цервиксот, особено кај тешката дисплазија и кај Ca in situ кој е забележан во ова истражување корелира со податоците дадени во претходно објавените студии. Резултатите ја оправдуваат потребата за вклучување на HPV анализата како примарна скрининг метода и како додаток на цитолошката анализа.

Клучни зборови

HPV, молекуларни методи, PCR техника

Вовед

Хуман Папилома Вирусите припаѓаат на фамилијата Papillomaviridae. Досега се идентификувани околу 120 различни типови на HPV вируси[2,3]. Хуман папилома вирусите (HPV) предизвикуваат инфекција која ги зафаќа кожата и слузниците по телото[1]. За детекција на HPV вирусот во биолошките примероци како и за дијагностицирање на HPV инфекцијата најчесто се применуваат молекуларни методи кои се темелат на PCR технологија (полимеразно врижна реакција), PCR во реално време, хибридизација на нуклеински киселини како и технологија со микрочипови[5]. HPV тестирањето служи не само за утврдување на постоење на HPV, туку и типизација односно утврдување на типот на вирусот доколку е присутен во материјалот кој се испитува, со цел за воспоставување на подобра дијагноза и превенција на цервикалниот карцином.
Во зависност од способноста за индукција на малигна трансформација HPV вирусите се поделени во две групи и тоа: ниско-ризични типови на HPV (6, 11, 40, 41, 43, 44,

54,55, 61, 70, 72, 81 и други) и високо-ризични типови на HPV, како што се: 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 и други.
Papillomaviridae е стара таксономска фамилија на DNA вируси без обвивка. Тоа се мали двоверижни DNA вируси со дијаметар од 55 nm, со геном од околу 8000 базни парови, сместен во икозоедарски капсид, изграден од два структурни протеини (major и minor) кои формираат 72 капсомери[4].

Цели

Целта на ова истражување е да ја утврдиме застапеноста на Хуман папилома вирусот (HPV) во Република Македонија со примена на молекуларни методи за детекција и типизација на HPV вирусот, да ја испитаме поврзаноста на HPV инфекцијата односно неговата корелација со појавата на цервикалниот карцином кај жени на возраст под 45 години и да се утврди значењето на дијагностицирањето на цервикалниот карцином.

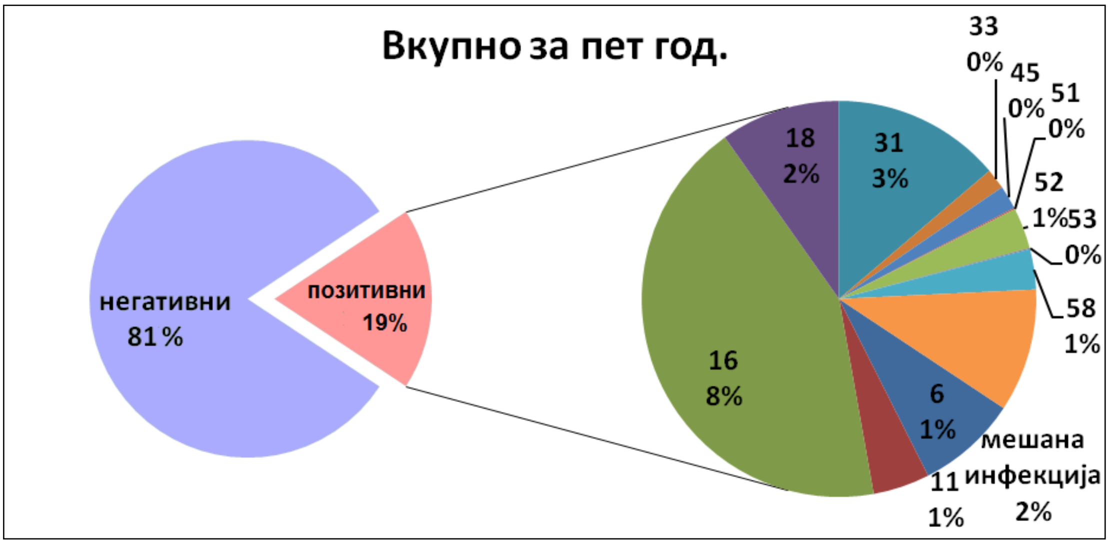
Материјали и методи

Овој труд е изработен на Клиниката за Гинекологија и акушерство во Скопје, во Лабораторијата за молекуларна биологија. Во испитувањето се опфатени вкупно 14.229 примероци во период од пет години, од 2008. до 2012.
Собирани се податоци од обработени цервикални брисеви од жени под 45 години анализирани со методите за екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (DNA) од примерокот, полимеразна верижна реакција (PCR) и електрофореза на агарозен гел.
Примероците од цервикалните брисеви за HPV типизација се земаат во стерилни епрувети во кои има соодветен медиум (PBS Phosphate buffered saline). HPV скринигот во овој труд е базиран на три главни процеси: изолација на DNA, PCR амплификација на таргет DNA и детекција со гел електрофореза.
Екстракцијата беше изведувана со мануелна техника со користење на AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Corporation, Korea), во согласност со упатствата на производителот. Китот се состои од комерцијални китови за изолација на DNA, кои содржат стаклени влакна, фиксирани во колонки и кои се врзуваат за DNA во присуство на хаотропни соли. На крај на постапката се врши елуција на DNA со соодветен пуфер.
Вирусната DNA беше амплифицирана со користење на комерцијални китови за скриниг на HPV, кои се базираат врз основа на DPO (Dual Priming Oligonucleotide) технологија за мулитиплекс PCR амплификација на таргет DNA (Seegene Inc., Korea).
Се приготвува појдовна смеса за PCR амплификацијата (Master mix for PCR). По мешањето на PCR Master mix-от, се пипетира потребниот волумен (17μl) од оваа смеса во секоја реакциска епрувета, а потоа во неа се додава претходно изолираната DNA (3μl) од примерокот. Технички PCR амплификацијата се врши во специјални апарати означени како PCR-машини или термосајклери, на соодветен амплификациски програм.
PCR продуктите беа анализирани на агарозна гел електрофореза со користење на етидиум бромид.

Резултати и дискусија

Во овој труд се вклучени пациентки на возраст под 45 години на Клиниката за Гинекологија и акушерство во Скопје, во лабораторијата за Молекуларна биологија во период од 2008-2012 година (5 години). Во овој период со соодветни молекуларни методи, како што се: методите за екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (DNA) од примерокот, полимеразна верижна реакција (Polymerase Chain Reaction – PCR) и електрофореза на агарозен гел биле анализирани вкупно 14229 примероци од кои HPV негативни биле 11584, а HPV позитивни 2645.

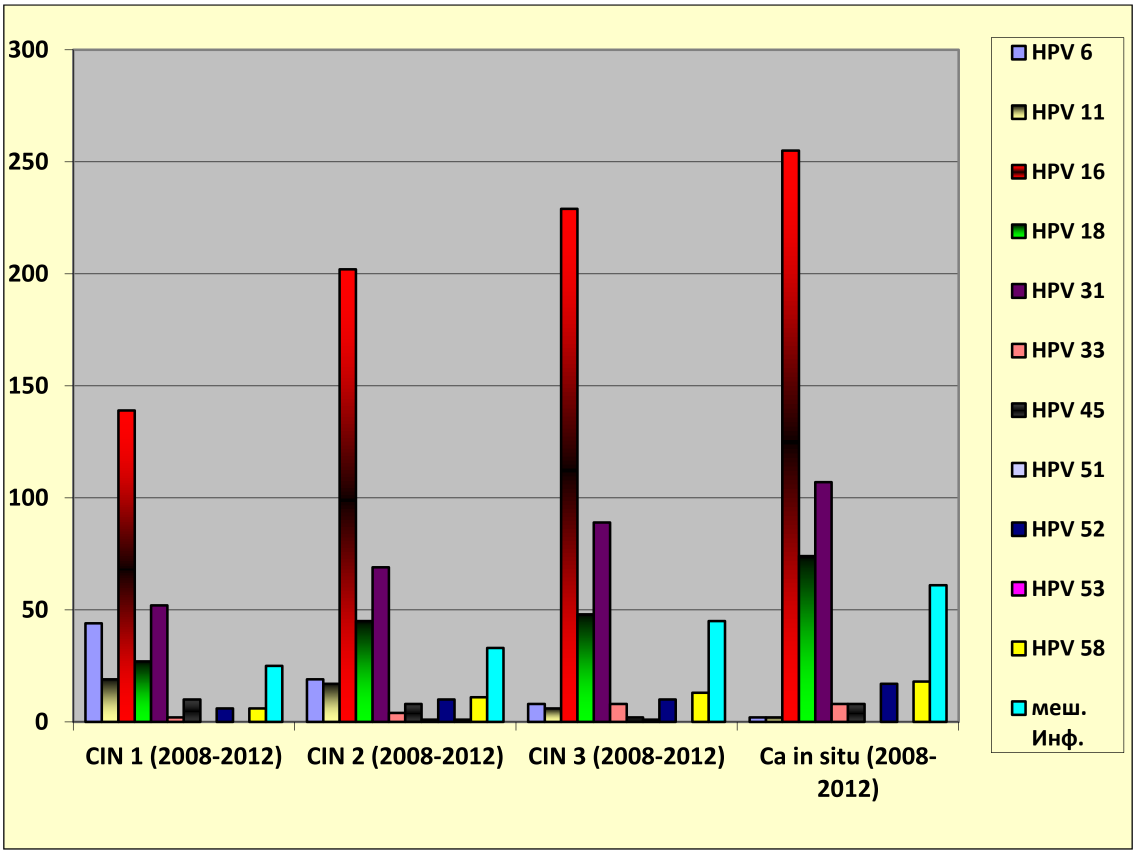
Слика 1. Процент на негативни наоди, позитивни наоди вкупно и процент на позитивни наоди по HPV типови во однос на вкупниот број испитани од 2008 до 2012 година.



На графикот кој е претставен на слика 1. дадена е процентуалната застапеност на поедините типови на HPV кај жени на возраст под 45 години во однос на вкупниот број испитани примероци во период од пет години. Од вкупниот број на испитани примероци за овие пет години 81% се HPV негативни, а 19% се HPV позитивни. Според овие податоци највисок процент отпаѓа на HPV 16 со 8%, потоа HPV 31 со 3% застапеност во однос на вкупниот број испитани примероци и со фреквенција од 0,4298 за HPV 16 и 0,1383 за HPV 31 во однос на вкупниот број позитивни наоди. Во овој труд најниска фреквенција за овие пет години покажуваат HPV тип 53 со фреквенција од 0,0007 и HPV тип 51 со фреквенција од 0,0011 во однос на вкупниот број позитивни наоди.

Вкупно за пет години анализирани се 1761 пациентка со различна цитолошка дијагноза (CIN 1, CIN 2, CIN 3, Ca in situ).

Слика 31. Графичко прикажување на бројот на пациенти по типови на HPV за кои се утврдени соодветни дијагнози од 2008 - 2012 година



Кај испитаните пациентки со највисок процент се издвојува HPV 16, кој е детектиран кај 825 пациентки (46,9%) и најчесто се јавува кај пациентките со Ca in situ, односно кај 255 од 552 пациентки на кои им е дијагностициран Ca in situ. Високиот процент на HPV 16, особено кај пациентките со CIN 3 и Ca in situ го издвојува овој тип од другите високоризични типови, како тип со најголем онкоген потенцијал. После него следи HPV 31 кој е најден кај 317 пациентки (18%). Во однос на вкупниот број дијагностицирани пациентки со најнизок процент од 18,7% е присутен низок степен на дисплазија (CIN 1), со постепено зголемување на 23,9% кај умерената дисплазија, достигнувајќи највисок процент кај тешката дисплазија 26,1% и кај пациентките со Ca in situ со 31,3%. Евидентно е дека HPV 16 и 31 се најчесто присутни инфекции во сите четири дијагнози кај жени на возраст под 45 години.

Од анализираните податоци може да се забележи дека има значителен пораст на HPV инфекцијата со зголемување на хистопатолошкиот градус. Исклучително високиот процент на HPV инфекцијата во прекурсорните лезии на цервиксот, особено кај тешката дисплазија и кај Ca in situ кој е забележан во ова истражување корелира со податоците дадени во претходно објавените студии.

Заклучок

Високата застапеност на HPV вирусот во Македонија како и високата инциденца на цервикалниот карцином укажува на фактот дека е потребно преземање на мерки за намалување на HPV инфецијата и смртноста од цервикалниот карцином. Резулатите од овој труд ја потврдуваат високата ризичност од инфекција со HPV 16, кој е со најголем онкоген потенцијал и значајно присутен кај пациентките со CIN 3 и Ca in situ. Од ова може да се потврди дека постои корелација помеѓу инфекцијата со високо ризичните видови на HPV и цервикалниот карцином. Може да се заклучи дека во дијагностицирањето на цервикалниот карцином главна улога има детектирањето и типизацијата на HPV вирусот, кој претставува ризик фактор за појавувањето на овој тип карцином. Методите за екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (DNA) од примерокот, полимеразна верижна реакција (PCR) и електрофореза на агарозен гел овозможуваат брзо детектирање на HPV вирусот и утврдување дали инфекцијата е предизвикана од високоризични генотипови на HPV. Резултатите од овој труд укажуваат на потреба од воведување примарен скрининг на HPV кај помладата женска популација во Р. Македонија. Со имплементацијата на молекуларните методи за генотипизација на HPV вирусот ќе се овозможи навремена и правилна селекција на пациентките со зголемен ризик за развој на прекурсорни лезии и цервикални карциноми. Навремено и точно детектирање е предуслов за намалување на смртноста на пациентките со цервикален карцином.

Користена литература

1. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. “The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia”. AMPIS, бр. 118 (2010):422–49.
2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. “Classification of papillomaviruses.” Virology, бр. 324 (2004): 17-27.
3. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. “Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.” N. Engl. J. Med., бр. 348 (2003): 518–527.
4. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. “Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention.” International Journal of Gynecological Cancer, бр. 15(5) (2005): 727-746.
5. Vince A, Lepej SZ. “Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection.” Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona, бр. 7 (2010): 18–25.