

МЕТОДИ ЗА ТИПИЗАЦИЈА НА HPV ВИРУСОТ И ЗНАЧЕЊЕ ПРИ ДИЈАГНОСТИЦИРАЊЕТО НА ЦЕРВИКАЛЕН КАРЦИНОМ

Краток извадок

Хуманиот папилома вирус (HPV) е вирус од семејството папилома. Молекуларните дијагностички методи овозможуваат идентификација на многу високоризични типови на HPV, со цел подобра дијагноза и третман на пациентките.

Анализата на резултатите на примероците земени од пациентки на возраст под 45 години на Клиниката за Гинекологија и акушерство во Скопје во период од пет години покажува дека HPV 16 е генотип кој најчесто се јавува. Високата застапеност на HPV вирусот во Македонија како и високата инциденца на цервикалниот карцином укажува на фактот дека е потребно да се преземат мерки за намалување на HPV инфекцијата и смртноста од цервикалниот карцином. HPV анализата е потребно да се вклучи како примарна скрининг метода и како додаток на цитолошката анализа.

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 телото¹. 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 микрочипови⁵. 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 капсомери⁴.

Цели

Целта на ова истражување е да ја утврдиме застапеноста на Хуман папилома вирусот (HPV) во Република Македонија, да ја испитаме поврзаноста на HPV инфекцијата односно неговата корелација со појавата на цервикалниот карцином кај жени на возраст под 45 години, примена на техники и методи за детекција и типизација на HPV вирусот и да се утврди значењето при 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 скринингот 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 скрининг на HPV, кои се базираат врз основа на DPO (Dual Priming Oligonucleotide) технологија за мултиплекс 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 (17 μ l) од оваа смеса во секоја реакциска епрувета, а потоа во неа се додава претходно изолираната DNA (3 μ l) 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 биле анализирани вкупно 14229 примероци од кои HPV негативни биле 11584, а HPV позитивни 2645. 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 релативна фреквенција од 0,4298 за HPV 16 и 0,1383 за HPV 31 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). 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.

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 инфекцијата и смртноста од цервикалниот карцином. Резултатите 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.

Дипл. мед. лаборант Слаѓана Арсова,
ГАК-Скопје

Д-р Биљана Ѓорѓеска, редовен
професор, Факултет за медицински
науки, УГД, Штип

М-р Софија Петковска, помлад асистент,
Факултет за медицински науки, УГД,
Штип

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.