
Prekurzorové léze karcinomu děložního čípku: korelace cytologických a histologických nálezů s výsledkem HPV testu

Drozenová J.¹, Drážďáková M.², Povýšil C.¹, Dušková J.¹

¹Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

²Sérologická laboratoř ÚKB 1. LF UK a VFN, Praha

Souhrn

Perzistence infekce vysoce rizikovými (high-risk) HPV typy je odpovědná za vznik, přetrvávání a progresi dlaždicobuněčné (skvamózní) intraepiteliální léze (SIL). Během tří let bylo vyšetřeno celkem 52 žen, u nichž byly závěry cytologického vyšetření porovnávány s výsledky HPV testu. Při histologickém vyšetření byly prokázány středně těžké až těžké dysplastické změny (HSIL) ve dvou případech u pacientek s cytologickou diagnózou ASC-H. Lehké dysplastické změny (LSIL) byly zastiženy v 8 případech, kde ve 4 případech byla stanovena cytologická diagnóza ASC-US a ve 4 případech diagnóza LSIL. Všechny ženy s histologicky potvrzenými dysplastickými změnami byly HR HPV DNA pozitivní.

Naše výsledky dokazují, že významné histologické léze mohou být objeveny u HR HPV DNA pozitivních pacientek s cytologickou diagnózou ASC-US (atypické dlaždicové buňky neurčitého významu), zvláště však ASC-H (atypické dlaždicové buňky, nelze vyloučit high-grade skvamózní intraepiteliální lézi). Kombinovaný screeningový test nabízí větší možnost ochrany anebo může umožnit prodloužení intervalu screeningových kontrol.

Klíčová slova: karcinom děložního čípku – lidské papilomaviry (HPV) – HPV test – cytologie – histologie

Summary

Cervical Cancer Precursors: Cytohistologic Correlation with the Results of HPV Testing

Persistence of high-risk types of human papillomavirus (HPV) is responsible for the development, maintenance and progression of squamous intraepithelial lesions (SILs). Cytohistologic correlation with the results of the HPV testing in 52 patients over a 3year period is presented. Two patients out of the 52 patients presented in this histologic follow up bore the diagnosis high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) with the former cytology ASC-H. Low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) were found in eight patients, half of them diagnosed identically on cytology. Another four cases were formerly diagnosed cytologically as ASC-US. All women with the histologically confirmed dysplastic changes were HR HPV DNA positive. Our results indicate that significant histologic lesions may be discovered in patients exhibiting the high-risk HPV DNA – positivity in the category of ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) and especially ASC-H (ASC cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion). A combined screening test thus offers the possibility of greater protection and /or longer screening intervals.

Key words: cervical cancer – human papillomavirus (HPV) – HPV testing – cytology – histology

Čes.-slov. Patol., 42, 2006, No. 1, p. 20–23

Karcinom děložního čípku je v celosvětovém měřítku druhým nejčastějším zhoubným nádorem u žen. Je příkladem maligního onemocnění infekční etiologie indukovaného virovou infekcí lidskými papilomaviry. Přítomnost papilomavirů s vysokým onkogenním rizikem (high-risk HPV typů) je nutnou podmínkou perzistence a progresse onemocnění a byla potvrzena téměř ve 100 % premaligních a maligních lézí děložního čípku

(25). Produktivní infekce HPV (LSIL) s virem v episomální DNA má často tranzitorní charakter s vysokým procentem regrese jako důsledek rezoluce HPV infekce (18–35 let). Skupina je extrémně heterogenní, spojená s LR HPV typy (15 %), HR HPV typy (25 %), často se prokazují low-risk i high-risk HPV typy současně. Proti tomu HSIL léze jsou charakterizovány nízkým procentem regrese a vysokým procentem perzistence

a progresi jako následek infekce HPV typu s vysokým onkogenním rizikem. Při jejich integraci do genomu hostitelské buňky s inaktivací tumor supresorových genů p105 Rb a p53 jako následek interakce s virovými onkoproteiny E6 a E7 HR HPV typů dochází k rozvoji nádorového procesu. V těchto případech bývá HPV testem v naprosté většině případů prokázána HR HPV DNA. Infekce rizikovými typy HPV je tedy nezbytnou, ne však jedinou podmínkou maligní transformace buňky, pro což svědčí poměrně dlouhá latence mezi iniciální expozicí HPV a vývojem karcinomu děložního čípku, stejně jako fakt, že pouze u malé části žen infikovaných HPV dochází k progresi onemocnění.

Materiál a metody

Soubor tvořilo 52 žen ve věkovém rozpětí 20–71 let. Průměrný věk byl 41 let. Pacientky byly vyšetřeny ve Všeobecné fakultní nemocnici Praha v letech 2001 až 2003 v rámci gynekologické onkologické prevence a ve 2 případech šlo o kontrolu po léčbě HSIL. Vždy byly provedeny konvenční cytologické stěry barvené polychromatickou metodou a vyhodnocené v systému Bethesda 2001. Histologické vyšetření bylo provedeno u 15 pacientek. Vzorky byly zpracovány běžnou parafínovou technikou a řezy z parafínových bločků byly barveny hematoxylinem-eozinem.

Ve 2 případech bylo provedeno imunohistochemické vyšetření pomocí monoklonální protilátky proti Ki 67 (MIB 1) od fy Dako. HPV DNA byla detekována u všech 52 pacientek metodou hybrid capture II (Digene Corporation, Gaithersburg, Md), jejíž princip je založený na hybridizaci denaturované DNA v roztoku se směsí LR HPV a HR HPV specifických RNA sond. RNA/DNA molekuly jsou potom zachyceny protilátkou specifickou pro RNA/DNA hybridní molekuly na mikrotitračních destičkách. Následná detekce je prováděna chemiluminiscenčně přidáním protilátky proti RNA/DNA hybridním molekulám konjugované s alkalickou fosfatázou. Detekce luminometrem umožňuje kvantifikovat množství viru ve vzorku/ počet kopií HPV DNA/ v jednotkách RLU (relative light units). Hybrid capture system II umožňuje skupinovou detekci low risk (6,11,42–44) a high-risk (16,18,31,33,35,45) HPV typů, což je pro klinickou praxi dostačující.

Výsledky

Naše výsledky, přestože se jedná o relativně malý soubor, jsou srovnatelné s výsledky získanými

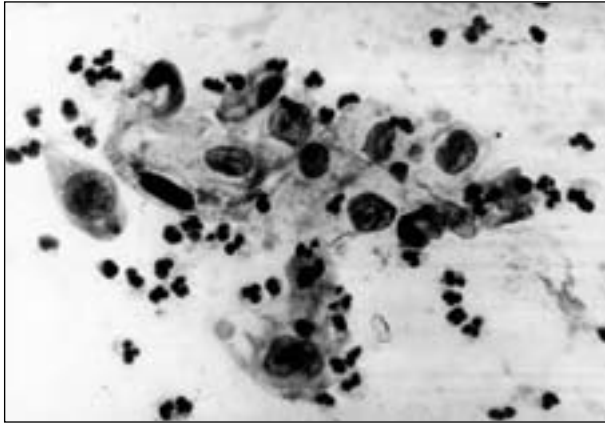
mi ve větších souborech, nebo v pilotních studiích publikovaných v poslední době v odborné literatuře (11,14). U pacientek s normálním cytologickým nálezem nebo s diagnózou benigních buněčných změn tvořily HR HPV pozitivní případy 13,5 %. U cytologických diagnóz ASCUS tvořily HPV DNA pozitivní případy 50 %. Pět bylo dále histologicky vyšetřeno s diagnózou lehké dysplazie a 1 s diagnózou lehké až středně těžké dysplazie (ASCUS jsme v naší práci klasifikovali podle vyhodnocovacího systému Bethesda 1991). HPV DNA pozitivita u případů LSIL byla 58,8 % (ve větších souborech se pohybovala mezi 60–80 %), histologické vyšetření bylo prováděno pouze ve 2 případech a byla potvrzena diagnóza lehké dysplazie, s přítomností MIB 1 pozitivních buněk v povrchových vrstvách lehce dysplastického dlaždicového epitelu. Oba případy cytologicky suspektní z HSIL (obr. 1) léze byly HR HPV pozitivní, a to v jednom případě s velkou velikostí virové zátěže; histologicky byly v obou případech prokázány těžké dysplastické změny (HSIL), odpovídající obrazu CIN II–CIN III (obr. 2). Rozdělení cytologických diagnóz a jejich vztah k výsledkům HPV testu ukazuje tabulka 1. Dvě pacientky byly vyšetřeny v rámci dispenzarizace HSIL po léčbě a HPV DNA u nich nebyla prokázána, což svědčí pro eradikaci viru z dolního genitálního traktu. Testace HPV zde byla prováděna za 12 měsíců po léčbě HSIL laserovou konizací.

Diskuse

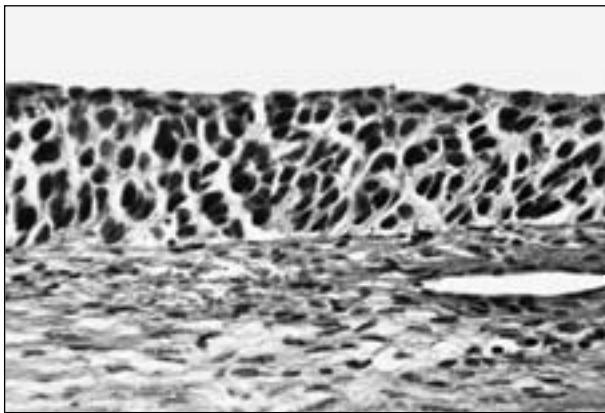
Podíl HPV DNA pozitivních případů u jednotlivých cytologických diagnóz záleží především na volbě souboru (věk pacientek, typ gynekologické ambulance, kde je cytologický stěr nabírán, a klinická diagnóza při odběru). Perzistence (nad 1 rok) high-risk HPV typů je nezbytným, i když ne jediným faktorem nutným pro vznik karcinomu.

Tab.1. Rozdělení cytologických diagnóz a jejich vztah k výsledkům HPV testu

	HPV DNA pozitivní test			HPV pozitivní případy (%)	HPV negativní případy (%)
	HR	LR	HR+LR		
Normální nález					
Benigní buněčné změny (15)	2			2 (13,5%)	13 (86,5%)
ASCUS-US (18)	9			9 (50%)	9 (50%)
ASC - H (2)	2			2 (100%)	0
LSIL (17)	9		1	10 (58,8%)	7 (41,2%)



Obr. 1. Konvenční cytologie
Středně těžké dysplastické změny
Pap, 400krát



Obr. 2. Konizace
Středně těžké až těžké dysplastické změny nezralého metaplastického dlaždicového epitelu transformační zóny

nomu děložního čípku. Samotná detekce high-risk HPV typů ale neznamená nutnou přítomnost prekancerózní léze děložního čípku, představuje však větší riziko a je třeba sledovat tyto ženy v kratším časovém intervalu.

Senzitivita cytologického vyšetření je limitována jednak chybou při odebírání vzorku, ve kterém abnormální buňky nemusí být zastíženy, a dále chybou při odečítání cytologických nátěrů při malém počtu abnormálních buněk. Senzitivita cytologického vyšetření se pohybuje mezi 40–80 % pro high-grade skvamózní intraepiteliální léze (7). Kombinace HPV testu a cytologického vyšetření, eventuálně s kyretáží endocervixu umožňuje dosažení téměř 100% senzitivity (minimum falešně negativních výsledků) a negativní prediktivní hodnoty vyšetření v detekci high grade skvamózních intraepiteliálních lézí, což by v gynekologické onkologické prevenci umožnilo prodloužení intervalu screeningových kontrol na 3–5 let u žen s normálním cytologickým nálezem.

Významná role HPV testu je zejména u žen starších 35 let s hraničními cytologickými nálezy ASCUS/AGUS a s nálezy LSIL, kde HPV test funguje jako intermediární třídící (triage) test. U nás, kde kolposkopické vyšetření je součástí gynekologického vyšetření v rámci onkologické prevence, by tak u pacientek s cytologickou diagnózou ASC – US negativita HR HPV DNA umožnila opakovat cytologické vyšetření po 12 měsících (proti běžně prováděným často opakovaným cytologickým kontrolám za 4–6 měsíců). Naproti tomu v zemích, kde kolposkopické vyšetření není vzhledem k jeho ceně běžnou součástí gynekologického vyšetření, je pozitivita HR HPV DNA indikací ke kolposkopickému vyšetření.

U žen mladších 35 let má HPV infekce většinou přechodný charakter s vysokým procentem regrese a méně často vede k závažnějším lézím děložního čípku. HPV DNA je v této věkové kategorii často pozitivní, s větším podílem nízké rizikových HPV typů, zejména u žen mladších 25 let. Význam pozitivity HPV testu, zejména při nízké kvantitativní velikosti virové zátěže, je zde proto malý a doporučuje se opakovat HPV test po 12 měsících, v případě negativity HR HPV DNA se doporučuje po 12 měsících pouze kontrolní cytologické vyšetření (4).

U žen s diagnózou ASC-H se doporučuje biopsie z kolposkopicky suspektního ložiska, v případě, že toto ložisko není nalezeno, se při negativitě HR HPV DNA doporučuje opakovat cytologické vyšetření za 6–12 měsíců (4). U konvenčních cytologických stěrů hodnocených jako ASC-H byla totiž ve 27 % případů histologickým vyšetřením prokázána high-grade skvamózní intraepiteliální léze, která měla často charakter CIN 3 (2).

Protože 14 % diagnóz AGUS je spojeno s high-grade intraepiteliální lézí či karcinomem, které jsou v naprosté většině případů skvamózní diferenciace, doporučuje se HPV test i zde (19).

Vzhledem k relativně nízké specifitě – podíl falešně pozitivních výsledků, kdy u HR HPV pozitivních testů bylo negativní následné kolposkopické a bioptické vyšetření, která se v literatuře pohybuje kolem 50 % (27) a nízké pozitivní prediktivní hodnotě, je HPV test užitečný v kombinaci s dalšími prebiptickými metodami (onkologická cytologie, kolposkopie).

Dalším uplatněním HPV testu je dispenzarizace high-grade skvamózních intraepiteliálních lézí po léčbě k vyloučení reziduální cervikální neoplazie a k potvrzení eradikace viru z dolního genitálního traktu. HPV test se zde provádí v odstupu 12 měsíců od provedení chirurgického výkonu.

Při hodnocení HPV testu je důležité posoudit množství viru ve vzorku, které se kvantifikuje v jednotkách RLU. Bývá nízké na začátku a konci infekce. Nízká virová zátěž při negativním cytologickém vyšetření nemá výpovědní hodnotu.

Množství viru ve vzorku většinou koreluje s histologickou závažností léze, kde nejvyšší hodnoty bývají u karcinomu děložního čípku. Úskalím je zde však podíl falešně pozitivních případů, daný kontaminací vzorku, či zkříženou reakcí.

Přestože je provedení HPV testu finančně relativně nákladné, je nepochybné, že správně indikovaný HPV test má význam pro volbu klinického postupu u hraničních cytologických nálezů. Jeho negativita u normálních cytologických nálezů, při vysoké senzitivitě vyšetření a dlouhé latenci mezi začátkem infekce a vznikem závažných prekurzorových lézí umožňuje prodloužení intervalu screeningových kontrol a tím i návratnost finanční investice do HPV testu.

Závěr

Testace HPV má význam zejména při perzistenci high-risk HPV typů u žen starších 35 let a při kvantitativně větší velikosti virové zátěže, kde vyčleňuje skupinu vysoce rizikových pacientek pro vývoj SIL s opakovanými cytologickými nálezy ASCUS/AGUS a s nálezy LSIL.

Literatura

1. **Austin M.R.:** Human papillomavirus reporting minimizing patient and laboratory risk. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 973–977. – 2. **Bolick D.R.:** Laboratory implementation of human papillomavirus tests. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 984–990. – 3. **Bory J.P., Cucherousset J., Lorenzato M. et al.:** Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3091 women. *Int. J. Cancer.*, 102, 2002, s. 519–525. – 4. **Cox J.T.:** Role of human papillomavirus testing in the American society for colposcopy and cervical pathology. Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 950–958. – 5. **Cruickshank M.:** Is cervical screening necessary in older women? *Cytopathology*, 12, 2001, s. 351–353. – 6. **Cuzick J., Terry G., Hollingworth T., Anderson M.:** Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*, 69, 1994, s. 167–171. – 7. **Cuzick J., Szarewski A., Terry G. et al.:** Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet*, 345, 1995, s. 1533–1537. – 8. **Cuzick J., Beverley E. et al.:** HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer*, 81, 1999, s. 554–558. – 9. **Feichter G., Meisels A.:** Task force consensus report on HPV – related changes of the lower female genital tract. *Acta Cytologica*, 46, 2002, s. 630–636. – 10. **Follen M., Schottenfeld D.:** Surrogate endpoint biomarkers and their modulation in cervical chemoprevention trials. *Cancer*, 91, 2001, s. 1758–1776. – 11. **Hong S., Marshalleck J., Williams R., Gaiter T. et al.:** Comparative analysis of liquid – based Pap Test and concurrent HPV DNA assay of residual samples. *Acta Cytologica*, 46, 2002, s. 828–834. – 12. **Howard M., Sellors J., Kaczorowski J.:** Optimizing the hybrid capture II human papillomavirus test to detect cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.*, 100, 2002, s. 972–980. – 13. **Lozano R.:** Successfully integrating human papillomavirus testing into your practice. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 989–990. – 14. **Masumoto N., Fujii T., Ishikawa M., Mukai M., Saito M. et al.:** Papanicolaou tests and molecular analyses using new fluid-based specimen collection technology in 3000 Japanese women. *Br J Cancer*, 88, 2003, s. 1883–1888. – 15. **Quddus R., Zhang S., Sung J., Liu F., Neves T., Struminsky J., Singer B.:** Utility of HPV DNA detection in thin – layer, liquid – based tests with atypical squamous metaplasia. *Acta Cytologica*, 46, 2002, s. 808–812. – 16. **Raab S.S.:** Human papillomavirus reporting. Impact on Bethesda cytology reports. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 969–972. – 17. **Roach N.:** Delivering human papillomavirus testing to the public. One patient advocates perspective. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 995–996. – 18. **Ronnet B., Manos M., Ransley J., Fetterman B., Kinney W. et al.:** Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS). Cytopathologic features, histopathologic results and human papillomavirus DNA detection. *Hum. Pathol.*, 30, 1999, s. 816–824. – 19. **Seabrook M.J., Hubbard R.A.:** Achieving duality reproducible results and maintaining compliance in molecular diagnostic testing of human papillomavirus. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 978–982. – 20. **Schlecht N.F., Trevisan A., Duarte F.E. et al.:** Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer*, 103, 2003, s. 519–524. – 21. **Schiffman M., Salomon D.:** Findings to date from the ASCUS-LSIL triage study (ALTS). *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 946–949. – 22. **Sigstad E., Lie A., Luostorinen T., et al.:** A prospective study of the relationship between prediagnostic human papillomavirus seropositivity and HPV DNA in subsequent cervical carcinomas. *Br J Cancer*, 87, 2002, s. 175–180. – 23. **Smith J.F.:** Bethesda 2001. *Cytopathology*, 13, 2002, s. 4–10. – 24. **Snijders P., van den Brule A., Meyer M.:** The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J. Pathol.*, 201, 2003, s. 1–6. – 25. **Stoler M.:** Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. Implications for diagnostic criteria and testing. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127, 2003, s. 935–939. – 26. **Tidy J.:** Forgotten implications of HPV positivity for the majority of females: a clinical perspective. *Cytopathology*, 13, 2002, s. 263–266. – 27. **Vassilakos P., Petignat P., Boulvain M., Campana A.:** Primary screening for cervical cancer precursors by the combined use of liquid-based cytology computer-assisted cytology and HPV DNA testing. *Br J Cancer*, 86, 2002, s. 382–388.

MUDr. Droženová Jana,
VFN, Ústav patologie, Studničkova 2, Praha 2, 128 08
tel. 737 879 722, 224 968 662 e-mail: