Povezanost kliničkih manifestacija i virusnih genotipova u genitalnoj infekciji virusom humanog papiloma u muškaraca

Čulav, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:688394

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Čulav

Povezanost kliničkih manifestacija i virusnih genotipova u genitalnoj infekciji virusom humanog papiloma u muškaraca

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Čulav

Povezanost kliničkih manifestacija i virusnih genotipova u genitalnoj infekciji virusom humanog papiloma u muškaraca

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Ambulanti za spolno prenosive bolesti i genitalne dermatoze Klinike za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb i u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mihael Skerlev

ZAHVALA

Osobitu zahvalnost želim izraziti svom mentoru, prof. dr. sc. Mihaelu Skerlevu na inspiraciji, strpljenju, angažmanu i podršci koju mi pruža dugi niz godina u mom profesionalnom razvoju. Zahvaljujem mu također na dragocjenom znanju koje mi kontinuirano prenosi te poticajima za daljnje učenje i usavršavanje.

Od srca zahvaljujem prof. dr. sc. Suzani Ljubojević Hadžavdić na svim konstruktivnim i praktičnim savjetima, znanju i ljubavi za područje venerologije koje mi aktivno prenosi. Akademkinji Mirni Šitum zahvaljujem na dobronamjernoj inicijativi te entuzijazmu i volji za suradnju, napredovanje i usavršavanje koje dosljedno iskazuje. Prof. dr. sc. Ljubin Sternak zahvaljujem također na uviđavnosti, susretljivosti, savjetima i stručnom znanju kojim je doprinijela izradi ove disertacije.

Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama na nesebičnoj i ustrajnoj pomoći i podršci, razumijevanju, strpljenju i vjeri u moj uspjeh.

Doktorski rad posvećujem svojoj obitelji. Neizmjernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, moralnoj podršci, vjeri, trudu, odricanjima te odgojem usađenim vrijednostima bez kojih ne bih mogla ostvariti svoje potencijale. Nika i Oliver moj su nepresušni izvor inspiracije, snage, motivacije, optimizma i nade. Zbog njih i uz njih postajem bolja osoba sveukupno.

Ključne riječi

Humani papillomavirus (HPV), muškarci, kondilomi, HPV detekcija, HPV genotipizacija, HPV dijagnostika, varijacije kliničke slike kondiloma

Sažetak

1. Uvod i svrha rada 1
1.1 Opće napomene 1
1.2 Povijesne napomene 1
1.3 Epidemiološke napomene 3
1.4 Onkogeni aspekt HPV infekcije 5
1.5 Biološki aspekti HPV-a 8
1.6 Genotipovi HPV-a i evolucija 10
1.7 HPV i onkogeneza 14
1.8 Imunološki aspekti HPV-infekcija 16
1.9 Psihološki aspekti HPV-infekcija 17
1.10 Patogeneza i prirodni tijek HPV-infekcije 18
1.11 Klinička slika HPV-infekcija 19
1.12 Dijagnostika 25
1.13 Tipizacija HPV DNA 27
1.14 Diferencijalna dijagnoza 29
1.15 Liječenje 30
1.16 Cjepivo protiv HPV-a 32
2. Hipoteza 36
3. Ciljevi rada 37
3.1 Opći ciljevi 37
3.2 Specifični ciljevi 37
4. Ispitanici i metode 38
4.1 Metode molekularne biologije za detekciju HPV DNA 39
4.1.1 Hybrid capture II (HC II) – Digene 39
4.1.2 Lančana reakcija polimeraze (PCR) 42
4.1.2.1 Izolacija DNA HPV za umnožavanje primerima MY09/ MY11 43
4.1.2.2 Umnožavanje DNA HPV lančanom reakcijom polimeraze 43

4.1.2.3 Detekcija produkata 44
4.1.3 INNO-LiPA 45
4.1.3.1 Očitavanje i interpretacija rezultata 47
4.1.3.2 Ograničenja procedure 49
4.2 Statistička obrada 50
5. Rezultati 51
5.1 Opći pokazatelji i deskriptivne vrijednosti 51
5.2 Povezanost tipa i lokalizacije kondiloma s drugim parametrima 60
5.3 „Alternativno“ grupiranje rezultata 72
6. Rasprava 73
6.1 Kliničke odrednice anogenitalne infekcije u istraživanju 74
6.2 Distribucija kondiloma prema lokalizaciji 75
6.3 Laboratorijske metode molekularne dijagnostike HPV-a 75
6.4 Rezultati vezani za dob bolesnika i trajanje bolesti 81
6.5 HPV genotipovi u odnosu na tip kondiloma i njihovu lokalizaciju 82
6.6 HPV status partnerice/-a 84
6.7 HPV negativni rezultati 84
6.8 Noviji podaci o HPV onkogenezi i tipovima HPV 87
6.9 Analiza trenutnog stanja i pogled u budućnost 88
7. Zaključci 89
8. Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku 91
9. Summary 93
10. Popis literature 94
11. Životopis 117
Prilozi……

Popis oznaka i kratica

BL	Buschke-Löwenstein
BPV	Bovini papiloma virus
CIN	Cervikalna intraepitelna neoplazija
CRPV	Cottontail rabbit papilloma virus
DMF	Dimethylformamide
EV	Epidermodysplasia verruciformis
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HC II	Hybrid capture II
HIV	Human immunodeficiency virus
HPV	Humani papillomavirus
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion
HSV-2	Herpes simplex virusa tipa 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
LCR	Long control region
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion
MSM	Men who have sex with men
NBT	Nitro blue tetrazolium
Nd-YAG	Neodymium-yttrium aluminium garnet
PCR	Polymerase chain reaction
PIN	Penilna intraepitelna neoplazija
PV	Papilloma virus
RFU	Relative light units
SIL	Squamous intraepithelial lesion
STM	Standarni transportni medij
URR	Upstream regulatory region
VLP	Virus-like particles

1. Uvod i svrha rada

1.1 Opće napomene

Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) je najčešća virusna spolno prenosiva infekcija i ujedno jedna od najčešćih spolno prenosivih bolesti uopće. Smatra se da će se više od 60-80% spolno aktivnih osoba tokom svog životnog vijeka zaraziti bar jednim genotipom HPV-a. (1) Još uvijek postoji mnogo nepoznanica o prirodi i evoluciji ove bolesti kod muškaraca unatoč sve većem broju kliničkih studija o HPV infekciji u muškoj populaciji. No, broj i narav tih studija još uvijek je nedostatan za preciznije zaključke, osobito u usporedbi sa studijama za žensku populaciju. Podaci o prevalenciji i prirodnom tijeku bolesti u muškaraca su malobrojni i nekonzistentni; prevalencija varira ovisno o anatomskoj lokalizaciji, načinu uzimanja uzorka, te metodama HPV detekcije. Za razliku od žena, kod muškaraca ne postoji prepoznatljiva distribucija prevalencije (još uvijek) u odnosu na dob. Također, nejasno je biološko i kliničko značenje HPV DNA u površinskim slojevima kože anogenitalne regije muškaraca. Dosadašnja istraživanja navode na zaključak da je u muškoj populaciji prisutan veći udio niskorizičnih HPV genotipova u odnosu na žene.

S kliničkog aspekta, anogenitalna infekcija HPV-om kod muškaraca značajna je kako zbog potrebe za dugotrajnim opetovanim liječenjem, psihosocijalne stigme te smanjene kvalitete zdravlja i života, tako i zbog neosporne povezanosti s karcinomima anusa i određenim tipovima karcinoma penisa i orofarinksa.

1.2 Povijesne napomene

Interes za istraživanja povezana s današnjim pojmom papiloma virusa traje više od 100 godina. McFadyean i Hobday 1898. godine su u Engleskoj objavili prvi rad na temu izvanstanične transmisije psećih bradavica (1-2). Ubrzo potom, 1907. godine, Ciuffo je u Italiji objavio rad o izvanstaničnoj transmisiji vulgarnih veruka kod čovjeka (1, 3). U slijedećih se 80 godina, sve do razvoja diferentnih metoda molekularne mikrobiologije, istraživanja na papiloma virusima mogu svrstati u četiri osnovne kategorije; 1. istraživanja o nastanku papiloma kod goveda, 2. istraživanja o nastanku papiloma kod zečeva, 3. istraživanja rijetke nasljedne bolesti poznate kao epidermodysplasia verruciformis i 4. istraživanja virusne etiologije karcinoma cerviksa. (1) U svakom od navedenih područja ističe se više znanstvenika

koji su svojim eksperimentima pomogli rasvijetliti dijelove priče o etiopatogenezi specifičnih stanja i tako pridonijeli napretku i uspjehu budućih istraživanja na ovu temu. (1)

Vrlo uspješan niz istraživanja papiloma kod goveda od 1920. godine, kada je Magalhaes u Brazilu dokazao infektivnog uzročnika, zaslužan je primarno za otkrića koja su posljedica analize stanične transformacije uzrokovane Bovinim papiloma virusom (BPV), potpunog sekvencioniranja prvog papiloma virusa (BPV1) te strukturnih i funkcionalnih karakterizacija pojedinih virusnih gena i njihovih produkata. (1)

Infektivna priroda papiloma kod zečeva dokazana je eksperimentom Shopea 1933.(4) Ubrzo potom objavljen je niz radova Peytona Rousa i suradnika u kojima je opisan nastanak planocelularnog karcinoma iz papiloma te je ispitivan sinergistički učinak drugih potencijalnih karcinogena na nastanak karcinoma kod zečeva. (5-8) Za svoj trud Rous je 1966. godine dobio Nobelovu nagradu za fiziologiju. (1) Na njegova se otkrića nastavio uspjeh Ita i Evansa koji su 1961. godine dokazali da purificirana DNA zečjeg papilloma virusa (engleski, cottontail rabbit papilloma virus, CRPV) inducira nastanak planocelularnog karcinoma u zečeva čime su otkrili karcinogenost virusnog genoma. (1, 9)

Godine 1922.Lewandowsky i Lutz u Baselu opisali su sindrom poznat pod nazivom epidermodysplasia verruciformis (EV) kao nasljednu bolest obilježenu pojavom brojnih verukoznih lezija. (1, 10) U fotoeksponiranim regijama dolazi do maligne alteracije verukoznih lezija u planocelularne karcinome. Lutz je 1946. godine utvrdio virusnu etiologiju veruka kod ovog stanja, a isto su potvrdili i eksperimenti autoinokulacije koje su izveli Jablonska i Millewski 1957. godine. (11) U tom je smislu bila posebno zaslužna istaknuta poljska dermatovenerologinja, Stefania Jablonska koja je 1972. dokazala etiološku ulogu HPV-a u razvoju kožnih karcinoma. (12) U suradnji poljskih istraživača s grupom znanstvenika na čelu s Gérardom Orthom iz Pariza objavljen je niz radova u razdoblju od 1977. do 1979. godine kojima je dokazana prisutnost pojedinih HPV genotipova, primarno HPV5 u veruciformnim lezijama i u planocelularnom karcinomu kože kod oboljelih. (13-21) Međutim, s obzirom da se radi o rijetkoj bolesti, mnoga pitanja su u narednim desetljećima ostala otvorena. Tek su kasnije pojedina istraživanja o ulozi kožnih HPV-infekcija na razvoj nemelanomskih karcinoma kože kod imunokompetentnih i imunosuprimiranih bolesnika donekle rasvijetlila pojedine aspekte etiopatogeneze bolesti povezanih s HPV. (22-28)

Krajem 1960-ih godina objavljeni su radovi bazirani na serološkim studijama o ulozi herpes simplex virusa tipa 2 (HSV-2) u razvoju karcinoma cerviksa. (1) Godine 1970 Harald

zur Hausen i suradnici izveli su nekoliko istraživanja s ciljem dokazivanja spomenute teze (HSV-2 i karcinom cerviksa) primjenom tehnika kojima su prethodno detektirali Epstein-Barrovu virusnu DNA iz Burkittova limfoma i nazofaringealnih karcinoma. (29-30) Neuspjeh u dokazivanju tragova HSV-2 DNA u bioptatima karcinoma cerviksa naveo ih je da tragaju dalje za infektivnim uzročnikom ovog karcinoma. U periodu od 1974. do 1977. godine objavili su niz radova kojima je izoliran HPV DNA iz kondiloma, te je istovremeno suradnja zur Hausena, Gissmanna i Ortha rezultirala utvrđivanjem heterogenosti porodice HPV virusa. (31-43) Koilocitoza kao citopatski efekt HPV-a opisana je u radovima Meiselsa i Fortina 1976., odnosno Purole i Savia 1977. godine koji su smatrali da takva stanična modifikacija može poslužiti za razlikovanje „benignih" virusom induciranih i premalignih lezija „bez virusa". (44-46) Della Torre u Italiji i Laverty u Australiji su 1978. godine dokazali tipične HPV čestice u promjenama na cerviksu. (47-48) Ta su istraživanja za posljedicu imala veliku znanstvenu aktivnost koja je 1980. godine dovela do izolacije HPV6 iz kondiloma a 1982. godine je HPV11 izoliran iz lezija kod laringealne papilomatoze. (36-39) Niz istraživanja njemačkog znanstvenika Haralda zur Hausena i njegovih suradnika nedvojbeno je doveo do zaključka da je HPV uzrok cervikalnog karcinoma, primarno HPV16 i 18. (40-43, 49-62) Njihovi rezultati kasnije su poslužili kao baza za razvoj profilaktičnog cjepiva koje je odobreno 2006. godine. (63-64) U tom kontekstu treba spomenuti radove koje su objavili Lara Koutsky i suradnici 2002. godine te Harper i suradnici 2004. i 2006. godine. (65-67) Dvije godine nakon pojave cjepiva protiv HPV-a na tržištu, 2008. godine, zur Hausen je dobio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju zbog svojih značajnih postignuća u ovom području.

1.3 Epidemiološke napomene

HPV infekcije prenose se izravnim kontaktom kože s kožom, odnosno kože sa sluznicom, vjerojatno putem mikroabrazija. Moguće je da se u anogenitalnoj regiji infekcija autoinokulacijom prenese na druga mjesta. Relativno mali broj HPV infekcija može se prenijeti i nespolnim putem, odnosno perinatalno, tijekom medicinskih zahvata i putem zaraženih predmeta. (68-72)

Razumijevanje epidemiološkog aspekta anogenitalne HPV infekcije kod muškaraca otežano je zbog objektivnog nedostaka standardiziranih tehnika i protokola za uzimanje uzoraka s muškog genitala s ciljem detekcije HPV-a. (73)

Faktori rizika za penilnu HPV infekciju mogu se, između ostalog, svrstati u indikatore seksualnog ponašanja uključujući ukupan broj dosadašnjih seksualnih partnera, broj recentnih seksualnih partnera, dob prvog spolnog odnosa (pritom je važno napomenuti da za transmisiju HPV nije uvijek nužna peneteracija budući da se HPV prenosi i trenjem), učestalost seksualnih odnosa, cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) kod seksualne partnerice, druge spolno prenosive bolesti u osobnoj anamnezi i pušenje. Među protektivne faktore koji umanjuju rizik stjecanja genitalne HPV infekcije ubrajaju se primjena prezervativa i cirkumcizija (74). Pritom je važno istaknuti kako primjena prezervativa ne onemogućuje sasvim transmisiju s obzirom da se virus može prenijeti i putem nezaštićenih predjela kože. (74-78)

Pouzdani podaci o točnoj incidenciji i prevalenciji anogenitalne HPV infekcije kod oba spola nisu dostupni s obzirom da u većini slučajeva infekcija ostaje asimptomatska. Najveća je incidencija u adolescenata i mlađih odraslih osoba oba spola te korelira s brojem seksualnih partnera. Smatra se da je smanjena akvizicija anogenitalne HPV infekcije u starijoj dobi posljedica manjeg broja novih seksualnih partnera te imunosti stečene nakon prethodnih infekcija (74). Većina HPV infekcija može i spontano regredirati tijekom jedne do dvije godine, osobito u mladoj populaciji do 30. godine života. (73, 78) Međutim, procjene o trajanju infekcije značajno variraju među pojedinačnim studijama ovisno o genotipu ali i o statističkim metodama koje su primjenjivane te o točnosti različitih metoda HPV detekcije. (74, 77, 79)

Prevalencija anogenitalne infekcije (HPV-om) vrlo je visoka među spolno aktivnim muškarcima. Ovisno o populaciji, anatomskoj lokalizaciji i zemljopisnom području, HPV se u genitalnom traktu asimptomatskih muškaraca može detektirati u rasponu od 1.3-72.9%. (80-81) Rezultati nekih multicentričnih studija ukazuju da je utvrđen HPV DNA u 65.2% asimptomatskih muškaraca od 18 do 70 godina života. (75, 82)

Premda je većina anogenitalih infekcija HPV-om asimptomatska, najčešća klinička prezentacija infekcije su kondilomi čija je prevalencija procijenjena na 5.6% u spolno aktivnoj populaciji, pri čemu je veća u žena i iznosi 7.2% dok u muškaraca iznosi 4.0%. (82) U asimptomatskih muškaraca 95 % HPV infekcija se može detektirati na korpusu penisa, koronalnom sulkusu/glansu penisa, prepuciju kod neobrezanih muškaraca i/ili skrotumu. (83)

Za razliku od žena u kojih nakon tridesete godine života značajno opada prevalencija cervikalne HPV infekcije uz manji ponovni porast nakon pedesete godine života, prema rezultatima pojedinih studija, u muškaraca ona ostaje relativno konstantna u odnosu na dob. (83) Pri tom je najčešća lokalizacija korpus penisa nakon koje su korona glansa i skrotum na

drugom, odnosno trećem mjestu. Incidencija HPV infekcije penisa kao i vrijeme potrebno do nestanka infekcije na penisu slično je kao kod cervikalne infekcije. (83-86)

Sve je više studija u kojima je istraživan utjecaj anogenitalne HPV infekcije u muškaraca na infekciju HPV-om i tijek bolesti kod žena. (87) U tom kontekstu veća je prevalencija penilnih lezija kod seksualnih partnera žena koje boluju od CIN-a ili karcinoma in situ nego u kontrolnoj skupini. (87-88) Vrijedi *i vice versa*, odnosno često se nalaze penilne lezije u muškaraca čija seksualna partnerica boluje od CIN-a. Do regresije penilnih lezija dolazi sporije kod muškaraca partnerice kojih su zaražene istim genotipom HPV-a. (88-89)

U muškaraca je zabilježena manja vjerojatnost perzistencije HPV infekcije u usporedbi sa ženskom populacijom, te kraće trajanje perzistentne infekcije onkogenim HPV genotipom nego kod žena. (74, 90) Vrijeme potrebno do (spontane) eliminacije niskorizičnih i visokorizičnih HPV infekcija u muškoj populaciji je slično te iznosi oko 75% u godinu dana. (74, 91)

1.4 Onkogeni aspekt HPV infekcije

Procjenjuje se da je 5.2% svih karcinoma čovjeka povezano s infekcijom HPV-om. (1, 91-93) U razvijenim zemljama svijeta u kojima je dostupan screening cervikalne bolesti, bilježi se značajna redukcija incidencije karcinoma cerviksa. Paralelno s tim uočen je porast broja karcinoma povezanih s HPV-om u muškaraca, uključujući karcinome penisa, anusa i orofarinksa. Štoviše, u razvijenim zemljama svijeta taj broj je sličan broju žena oboljelih od karcinoma cerviksa koji su u gotovo 100% slučajeva uzrokovani HPV infekcijom. Osim toga, postoje dokazi koji upućuju na činjenicu da HPV infekcija kod muškaraca može povećati rizik za infekciju HIV-om. (73, 79, 84, 92)

Premda podaci o prevalenciji karcinoma penisa znatno variraju; podaci iz Sjedinjenih američkih država te drugih razvijenih zemalja potvrđuju da se još uvijek radi o razmjerno rijetkom karcinomu koji čini oko 1% malignih bolesti kod muškaraca. (93) Više etioloških čimbenika se smatra važnima za razvoj karcinoma penisa; među njima, osim HPV-a, valja spomenuti fimozu, nisku razinu higijene, pušenje i kronične upalne bolesti poput genitalnog lihena sklerozusa. (93-94) Navedeni čimbenici dovode se u vezu primarno s planocelularnim karcinomom penisa. Procjenjuje se da je preostalih otprilike 50% karcinoma penisa uzrokovano HPV-om, što odgovara udjelu karcinoma vulve povezanih sa HPV infekcijom.

(94) Među njima onkogeni tipovi HPV16 i/ili 18 najčešće su detektirani kod planocelularnih karcinoma penisa. Znatno se rjeđe spominju HPV 31 i 33. (93-95) Važna je pri tom činjenica da udruženost karcinoma penisa s HPV-om uglavnom ovisi o histološkom tipu karcinoma; pri tom su s HPV-om najčešće povezani tzv. *warty-type* (eng.) *karcinom* (100%) i tzv. *bazaloid-type* (eng.) karcinom (80%), dok se verukozni (33%) i tzv. keratinizing-type (eng.) (35%) karcinom penisa rijetko povezuju s HPV infekcijom. (73-74, 92-95) Niska incidencija penilnog karcinoma u razvijenim zemljama svijeta djelomično se tumači cirkumcizijom kojoj je podvrgnut veliki dio muške populacije u tim zemljama, imajući na umu da fimoza kod neobrezanih muškaraca zajedno s rizičnim oblicima spolnog ponašanja može predstavljati povećan rizik za obolijevanje od ove vrste karcinoma. (73-74, 79)

Karcinom anusa bila je rijetka bolest u općoj populaciji, no incidencija ovog tipa karcinoma raste 2% godišnje u posljednja tri desetljeća. (94, 96) U tom smislu, porast incidencije znatno je veći u muškaraca nego kod žena. (96-98) Dok je HPV 16 odgovoran za oko 50% cervikalnih karcinoma, isti se tip HPV-a dovodi u vezu sa čak više od 87% karcinoma anusa. Na drugom je mjestu HPV 18 koji se dovodi u vezu s karcinomom anusa u oko 9% slučajeva. (1, 74, 99) Infekcija HPV-om anusa češća je u žena nego u muškaraca, no karcinom anusa čest je kod pojedinih skupina muškaraca. Dominantno se to odnosi na muškarace koji prakticiraju receptivne analne spolne odnose s muškarcima (engleski men who have sex with men - MSM) u kojih je rizik obolijevanja od karcinoma anusa 44 puta veći nego u općoj populaciji. (98) Drugu skupinu čine imunokompromitirani muškaraci, primarno zaraženi virusom HIV-a, kao i bolesnici koji su podvrgnuti transplantaciji solidnih organa kod je kojih rizik razvoja analnog karcinoma 60 puta veći nego u općoj populaciji. (99) Incidencija karcinoma anusa kod MSM prije pojave epidemije HIV-a bila je na razini incidencije karcinoma cerviksa prije uvođenja rutinskog citološkog skrininga. Pojedine studije ukazuju na prevalenciju analne HPV infekcije u svim dobnim skupinama od 60%, što je podudarno s prevalencijom penilne HPV infekcije. (98) Prevalencija dostiže gotovo 100% kod HIV-om zaraženih MSM neovisno o njihovom CD4+ statusu. (98) U njih se, osim toga, često dokaže istodobna infekcija s više genotipova HPV-a. Interesantno je međutim da uvođenjem antiretrovirusne terapije (eng. highly active antiretroviral therapy, HAART) 1996. godine nije došlo do očekivanog pada incidencije karcinoma anusa. (99) To je pomoglo barem djelomično rasvijetliti činjenicu da je potrebno više godina, možda i desetljeća za progresiju od analne intraepitelne neoplazije visokog rizika do karcinoma anusa. U tom periodu su HIV-om zaraženi MSM prije uvođenja HAART-a umirali od posljedica drugih bolesti povezanih s HIV-om,

posebice infekcija. Suprotno tome, uslijed visoke incidencije analne HPV infekcije koja kod HIV-om zaraženih MSM-a dostiže gotovo 100%, od čega je u oko 80% slučajeva involviran onkogeni HPV 16 genotip, danas, uz produljenje životnog vijeka pod izravnim utjecajem HAART-a, bilježi se umjesto smanjenja naizgled paradoksalni porast incidencije analne intraepitelne neoplazije visokog rizika i analnog karcinoma. (99) Iz toga bi se mogao izvesti zaključak kako HAART nije imao povoljan učinak na analnu HPV infekciju. Za razliku od kondiloma penisa, perianalni kondilomi kod muškaraca dovode se u vezu s karcinomom anusa neovisno o načinu prakticiranja spolnih odnosa te o imunološkom statusu, vjerojatno zbog ponašanja koja dovode do izlaganja onkogenim HPV genotipovima. Vezano za to, različitim studijama utvrđena je prevalencija između 10-20% (peri)analnih HPV lezija kod muškaraca koji su naveli da su spolne odnose imali isključivo sa ženama. Uzrok tome mogla bi biti prisutnost HPV-a u cervikalnoj sluzi koja tijekom spolnog odnosa može doći u perianalnu regiju. Također, navodi se i mogućnost autoinokulacije. (1, 73-74, 96)

HPV se razmjerno često povezuje s promjenama u oralnoj šupljini poput bradavica odnosno oralnih papiloma te drugih benignih i malignih neoplazmi. Studijama na velikim uzorcima iz više zemalja utvrđena je prevalencija HPV infekcija oralne sluznice od 4.5%, pri čemu su podaci vrlo slični u osoba oba spola. (79) HPV 6 i HPV 11 najčešće su udruženi s oralnim papilomima. (1, 79) Najčešći genotipovi HPV-a kod planocelularnog karcinoma oralne šuljine su HPV 16 te odmah potom i HPV 18. (1, 79) U 15-20% slučajeva karcinoma oralne sluznice HPV infekcija predstavlja očiti faktor rizika u odsutstvu konzumacije duhana i alkohola. (79, 100) Značajan je podatak da se karcinom oralne sluznice povezan s HPV-om pojavljuje u znatno mlađoj populaciji nego karcinomi oralne sluznice vezani uz konzumaciju alkohola i duhana koji se tipično pojavljuju u šestom i sedmom desteljeću života. Pri tom oralni seksualni odnos može predstavljati faktor rizika za HPV infekciju usne šupljine. Oralni karcinom češći je u muškaraca nego u žena, vjerojatno iz razloga što je kod njih veća vjerojatnost prisutnosti drugih rizičnih faktora poput pušenja i konzumacije alkohola. Zasad ostaje nejasno postoje li interakcije između pojedinih faktora rizika poput HPV infekcije i stila života i na koji način se one reflektiraju na cjelokupnu epidemiološku sliku te klinički tijek bolesti. (100-102) S anatomskog stajališta, invazivni karcinomi određenih lokalizacija oralne šupljine češće su udruženi s HPV infekcijom nego s konzumacijom duhana i alkohola. Radi se prije svega o karcinomu tonzila, a zatim i o karcinomima baze jezika, orofarinksa i mekog nepca. Karcinomi ostalih lokalizacija poput usnica, jezika, gingiva, slinovnica, tvrdog nepca, nazofarinksa i hipofarinksa češće su povezani s konzumacijom duhana i alkohola nego s HPV

infekcijom. Osim razlika u lokalizaciji karcinoma povezanih s HPV infekcijom i onih koji nisu s njom povezani, postoje dokazi i o različitom biološkom ponašanju i ishodima među ovim dvjema skupinama. (103-105) Konkretno, uočen je bolji terapijski učinak kemoterapije i radioterapije kod oralnih karcinoma udruženih s HPV-om nego kod onih koji to nisu, zbog čega imaju bolju dugoročnu prognozu. Interesantan je podatak da dok se, s jedne strane, bilježi veći porast incidencije karcinoma povezanih s infekcijom HPV-om, ponajprije karcinoma tonzila i baze jezika, s druge je strane uočeno smanjivanje incidencije karcinoma koji nisu udruženi s HPV-om poput karcinoma larinksa i jezika. (105-106) Pri tom je porast incidencije karcinoma određenih lokalizacija u usnoj šupljini (tonzile, baza jezika) praćen smanjenom konzumacijom duhana, što dodatno indirektno upućuje na mogućnost da su povezani s HPV infekcijom. (105-107)

1.5 Biološki aspekti HPV-a

Humani papillomavirus (HPV) pripada porodici Papillomaviridae koja se povezuje s nastankom epitelnih i fibroepitelnih tumora kože ili sluznica u gotovo svih amniota (kralješnjaka koji embrijski ili fetalni razvoj provedu u amnionu). Papilomavirusi su sastavni dio mikrobioma sisavaca, pri čemu je poznato da su vrsno i tkivno specifični. Iz toga slijedi da (HPV) može zaraziti isključivo čovjeka te da ima izraziti epidermotropizam, odnosno da se produktivne infekcije mogu uspostaviti isključivo u stratificiranom epitelu kože, anogenitalnog trakta i oralne šupljine. (108)

S obzirom da ne posjeduje lipoproteinsku ovojnicu, virus je postojan i otporan na različite vanjske fizikalne i kemijske utjecaje. Konkretno, izlaganjem visokoj temperaturi ili kemijskim agensima mogu se smanjiti ali ne i uništiti infektivna svojstva virusa. (109)

Papilomavirusi su mali ubikvitarni DNA virusi ikozaedarske strukture promjera 52-55 nm. (108-109) Virusne čestice sastoje se od dvostruke uzvojnice DNA molekule s oko 8000 parova baza, koja je vezana za histone i sadržana u proteinskoj kapsidi koja se sastoji od 72 pentamerske kapsomere. (108-109) Kapsidu čine dva strukturna proteina L1 veličine 55 kDa (80% virusnog proteina) i L2 veličine 70 kDa koje kodira sam virus. Čestice nalik virusu (eng. virus-like particles, VLP) mogu nastati kao posljedica ekspresije samo L1 proteina ili kombinacije L1 i L2 proteina. (108-110)

Cirkularni genom HPV -a se može fizički podijeliti u tri regije: 1. *ranu* koja sadrži šest ranih virusnih gena (eng. early, E, E1-E6) koja kodira nestrukturne proteine zadužene za virusnu ekspresiju, replikaciju i preživljavanje te staničnu transformaciju, 2. *kasnu* regiju koja sadrži dva kasna proteina (engleski: late), L, L1 i L2 koja kodira strukturne proteine virusne kapside potrebne za formaciju viriona i širenje virusa i 3. tzv. *Long Control Region* (engleski) - LCR ili Upstream Regulatory Region (engleski) – URR, promjenjivu regiju koja sadrži rane promotore i različita transkripcijska mjesta za virusne i stanične proteine. (110-112)

Stoga se E6 i E7 smatraju najvažnijim onkogenim proteinima HPV-a koji međusobno surađuju s ciljem stimuliranja virusne replikacije zaobilaženjem staničnih apoptotičnih procesa. Produkt E6 gena veže se primarno za tumor supresorski protein p53 i inducira arest staničnog ciklusa u S fazi. Produkt E7 gena se veže za i inaktivira tumor supresorski protein Rb što rezultira imortalizacijom stanice i poremećenim odgovorom na oštećenje DNA. Produkt gena E5 ulazi u interakciju s brojnim proteinima stanice domaćina te je nedavno prepoznat kao onkogen koji stimulira staničnu proliferaciju, inhibira apoptozu i modulira gene koji su važni za staničnu adheziju i imunološku funkciju.

Protein E1 je jedini enzim kodiran od strane virusa koji posjeduje aktivnost DNA helikaze. Ovaj enzim regrutira stanične mehanizme replikacije kako bi pokrenuo virusnu replikaciju. Protein E2 djeluje kao aktivator ili inhibitor transkripcije putem regulacije ekspresije produkata virusnih gena. Osim toga, može povećati virusnu replikaciju te igra važnu ulogu u prijenosu virusnog genoma tijekom diobe stanice domaćina. Protein E4 je najobilnije eksprimiran virusni protein čija je funkcija relativno nejasna a čini se da sudjeluje u amplifikaciji virusne DNA i oslobađanju virusa. (109-113)

Dakle, HPV je razvio mogućnost sinkroniziranja svog infektivnog ciklusa s diferencijacijom ciljne stanice domaćina – keratinocita. Putem mikroabrazija kože virusom se inficiraju nezreli keratinociti u bazalnom sloju epidermisa i vrlo vjerojatno matične stanice. Virusni episom zadržava se na niskom broju kopija u bazalnim stanicama, međutim kada stanice uđu u terminalnu diferencijaciju započinje amplifikacija HPV genoma i posljedična proizvodnja zaraznih viriona. Virusna se replikacija obavlja putem staničnih polimeraza paralelno sa replikacijom staničnog genoma. Proteini E6 i E7 pritom opstruiraju mehanizme kontrole staničnog ciklusa što omogućava nekontroliranu proliferaciju keratinocita. Posljedica toga je akumulacija mutacija tijekom vremena što u konačnici može dovesti do razvoja karcinoma. (109, 113)

Nakon stanične diferencijacije ekspresija E1, E2, E4 i E5 zamjenjuje ekspresiju E6 i E7 što rezultira amplifikacijom broja virusnih kopija na tisuće po stanici. Konačno virus izlazi iz stanice bez stanične lize. Protein E5 kod onkogenih genotipova smanjuje ekspoziciju zaraženih stanica imunološkom nadzoru te smanjuje ovisnost stanice o vanjskim faktorima rasta. Protein E6 onkogenih genotipova inducira degradaciju p53 staničnog proteina promovirajući tako nekontrolirani stanični rast. (110-113)

Period od infekcije do otpuštanja virusa iznosi oko 3 tjedna, što se podudara s vremenom koje je potrebno da bazalni keratinociti prođu kroz proces terminalne diferencijacije i deskvamacije. Posljedica ovog savršenog usklađivanja HPV-a s epitelnom diferencijacijom jest da HPV u periodu virusne replikacije ne uzrokuje citolizu niti druge citopatske učinke. S obzirom da zaraženi keratinociti ionako odumiru prirodnim procesom nakon terminalne diferencijacije na površini kože, ne dolazi do aktiviranja signalnih puteva za vrijeme virusnog ciklusa te se ne pokreće imunološki odgovor. (110-114)

Tijekom virusnog ciklusa se genom HPV-a a priori i uvijek ne integrira u domaćinov DNA. Međutim, pomoću zasad nerazjašnjenih mehanizama u određenim okolnostima dolazi do nasumične integracije genoma virusa u stanični DNA. Pri tom dolazi do prekida ekspresije E2 gena što za posljedicu ima aktivnu ekspresiju E6 i E7 koji inaktiviraju tumor supresorske proteine p53 i RB promovirajući tako malignu transformaciju. (111) Stoga se u tumorskom tkivu može dokazati integracija virusne DNA u stanični genom, prezervacija i ekspresija E6 i E7 gena te gubitak ekspresije E2 i E4 gena. (109, 111-115)

1.6 Genotipovi HPV-a i evolucija

Od vremena kada su sisavci razvili kožne žlijezde i dlaku (prije otprilike 350 milijuna godina) njihova je koža i sluznica zaražena raznim papilloma virusima (PV). U međuvremenu su PV prošli, zajedno s domaćinom, kroz kompleksne evolucijske procese, te posljedično tome razvili genotipsku raznovrsnost, sposobnost da preuzmu stanični ciklus i sakriju se od imunološkog sustava te ih se, stoga, dovodi u vezu s višestrukim manifestacijama infekcije; od asimptomatskih do invazivnih karcinoma. Infekcije različitim humanim papilloma virusima međusobno se razlikuju u ključnim fenotipskim obilježjima poput prevalencije, produktivnosti, imunogeničnosti, onkogenosti i kliničke prezentacije. Takva kombinacija genotipske i fenotipske raznovrsnosti jedinstvena je kod humanih patogena. Pri tom nisu zasad objašnjeni

mehanizmi koji bi povezivali genotipsku i fenotipsku virusnu raznovrsnost s dinamikom unutar domaćina. (108-109)

Rezultati dosadašnjih filogenetskih istraživanja HPV-a upućuju na činjenicu da pojedini genotipovi HPV-a potječu iz Afrike te da su znatno stariji od ljudske vrste. (108) Genom HPV-a je razmjerno stabilan, što je posljedica iznimno rijetkih izmjena sekvenci mutacijom ili rekombinacijom te se smatra da se mutacijske promjene dešavaju otprilike istom dinamikom kao i mutacije DNA kod zaraženog domaćina, odnosno da su za njih vezane. Virusi koji tako sporo evoluiraju zajedno sa svojim domaćinom češće uzrokuju kroničnu perzistentnu infekciju nego ozbiljnu bolest. Stoga se smatra da su mnogi HPV-i komenzali, a ne „ozbiljni" patogeni, tim više jer se HPV-i mogu dokazati u brisu kože ili u folikulu dlaka zdravih imunokompetentnih pojedinaca. (109, 116-117)

Zbog sličnosti u građi u prošlosti su papilomavirusi zajedno s poliomavirusima pripadali obitelji Papovaviridae. Od 2004. godine taksonomski su razdvojeni zbog naknadno zabilježenih razlika u veličini genoma i u sekvencama glavnih nukleotida ili aminokiselina u dvije zasebne porodice; Papillomaviridae i Polyomaviridae. (1, 108, 118-119)

Svi papilloma virusi pripadaju porodici Papillomaviridae u koju se ubraja 16 različitih rodova (108, 119):

1. *Alphapapillomavirus, 2. Betapapillomavirus, 3. Gammapapillomavirus, 4. Deltapapillomavirus, 5. Epsilonpapillomavirus, 6. Etapapillomavirus, 7. Iotapapillomavirus, 8. Kappapapillomavirus, 9. Lambdapapillomavirus, 10. Mupapillomavirus, 11. Nupapillomavirus, 12. Omikronpapillomavirus, 13. Pipapapillomavirus, 14. Thetapapillomavirus, 15. Xipapillomavirus, 16. Zetapapillomavirus*

Devedeset posto dosad opisanih HPV-a ubraja se u rodove alfa i beta, dok preostali uglavnom pripadaju gama, mu i nu rodovima (108, 118-119). Među njima, virusi iz roda alfa dovode se u vezu s karcinomima sluznica dok se virusi iz roda beta povezuju s karcinomima kože. (1, 108)

Dosad je otkriveno više od 200 genotipova HPV-a međutim to sasvim sigurno nije konačna brojka. U tom smislu genotip HPV-a može se smatrati novim ukoliko se slijed nukleotida njegovih gena E6, E7 i L1, odnosno oko trećine njegova genoma, razlikuje više od

10% od nekog prethodno poznatog genotipa. Smatra se da razlika od samo 2-10% određuje podtip ili varijantu nekog genotipa HPV-a. (108, 118-119)

Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (eng. International Agency for Research on Cancer, IARC) zasad je definirano ukupno 12 visokorizičnih HPV genotipova za koje postoji dovoljna razina dokaza za karcinogenost u ljudi: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59 (grupa 1). (1) Nadalje, HPV 68 se smatra vjerojatno karcinogenim (grupa 2A; ograničen broj dokaza karcinogenosti kod ljudi ali dovoljno dokaza karcinogenosti kod eksperimentalnih životinja), dok su HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73 i 82 mogući karcinogeni s obzirom na dosadašnju razinu dokaza (grupa 2B; ograničen broj dokaza karcinogenosti u ljudi uz manje nego dovoljno dokaza karcinogenosti kod eksperimentalnih životinja ili nedovoljno dokaza karcinogenosti kod ljudi ali dovoljno kod eksperimentalnih životinja). HPV 30, 34, 69, 85 i 97 (grupa 2B) su mogući karcinogeni za ljude s obzirom na njihovu filogenetsku analogiju s HPV genotipovima za koje postoje dovoljni ili ograničeni dokazi karcinogenosti. Za razliku od njih, zbog nedostatka dokaza HPV 6 i 11 ne mogu se klasificirati prema onkogenom kapacitetu. Neki genotipovi beta i gama roda ne mogu se klasificirati prema onkogenom kapacitetu (grupa 3; nedovoljno dokaza karcinogenosti kod ljudi i eksperimentalnih životinja ili nedovoljno dokaza u ljudi, a ograničen broj dokaza u eksperimentalnih životinja) uz iznimku HPV 5 i 8 koji su u bolesnika s dg. epidermodysplasia verruciformis izdvojeni kao mogući karcinogeni (grupa 2B). (1)

Osim podjele prema onkogenom potencijalu, HPV-genotipovi mogu se klasificirati i s obzirom na vrstu i lokalizaciju kliničkih promjena koje izazivaju. U mnogim slučajevima filogenetski srodni HPV-genotipovi uzrokuju slične kliničke manifestacije; najčešće HPV 2 i 27 uzrokuju vulgarne veruke, HPV6 i 11 kondilome, a HPV 16 i 18 karcinom cerviksa. Međutim, to nije striktno pravilo, te se među genotipovima koji su dosad izolirani iz lezija anogenitalne regije, mogu pronaći i neki poput HPV 2 koji uzrokuje i kožne papilome, odnosno imaju afinitet i za kožu i za sluznice. Iz lezija u anogenitalnoj regiji dosad je izolirano oko 60 HPV-genotipova koji su uglavnom mukozotropni, odnosno imaju afinitet za sluznicu. (1) Iz tog razloga s kliničkog aspekta postoji nekoliko klasifikacija HPV tipova, a u suvremenoj je literaturi prihvaćena sljedeća podjela (118):

a) tipovi HPV koji imaju "afinitet" prema koži:

1,63,

4,48,60,65,

41

b) tipovi HPV koji imaju "afinitet" prema sluznici:

6,11,13,44,55,

16,31,33,35,52,58,67,

18,39,45,59,68,70,

26,51,69,

30,53,56,66,

32,42,

34,64,73,

54

c) tipovi HPV koji imaju "afinitet" i prema koži i prema sluznici:

2,27,57,

3,10,28,29,

7,40,43,

61,62,72

d) tipovi HPV povezani s dg. epidermodysplasia verruciformis:

5,8,12,36,47,

9,15,17,37,38,

14,19,20,21,25,

22,23,

24,

49,

50

Neki literani podaci ukazuju na činjenicu da bi „intervencije“ poput probira HPV-om induciranih premalignih i malignih lezija kao i cijepljenje možda mogli rezultirati za sada nepredvidivim promjenama u cirkulaciji HPV-a, dinamici unutar domaćina i epidemiološkoj slici u globalu, no, za dokaz tih predviđanja zaista nedostaju brojnije i cjelovitije studije. (108)

1.7 HPV i onkogeneza

Oko 20 usko filogenetski povezanih virusa čini skupinu s najvećim onkogenim potencijalom za čovjeka. (1, 108) Svi su redom humani papilloma virusi i klasificirani su u rod *Alphapapillomavirus* te se tipično smatraju visoko rizičnim genotipovima. Karcinomi inducirani HPV-om obično se razviju nekoliko godina nakon infekcije. (108)

Za razumijevanje procesa karcinogeneze u kontekstu anogenitalnih HPV-infekcija, potrebno je prije svega razlikovati nekoliko stadija bolesti. Prvi je stadij do kojeg dolazi nakon spolnog odnosa sa zaraženim partnerom. U toj se fazi virusni genetski materijal može detektirati nakon nekoliko dana, čak u odsutnosti infekcije. Iz tog se razloga taj stadij još naziva i tranzitornom infekcijom, ili točnije tranzitornom detekcijom. (120) U daljnjem se tijeku neke infekcije uspješno uspostave uz replikaciju virusnog genoma, produkciju viriona i u konačnici nestaju. To se naziva akutnom infekcijom. (120) Međutim, neke akutne infekcije samo prividno nestaju ali virusni genom ostaje u zaraženim stanicama bez detektibilne aktivnosti, što se naziva latentnom infekcijom. (120-121) To je stanje u kojem je replikacija virusne DNA sinkronizirana sa staničnim ciklusom, no nema proizvodnje viriona niti se mogu detektirati citopatski učinci HPV-a. U tijeku latentne infekcije ponekad se može detektirati virusni genetski materijal. Mnogo kasnije kod latentnih infekcija može doći do reaktivacije virusne aktivnosti, pri čemu npr. imunosupresija može djelovati kao okidač. (122) Isto se ponekad događa i bez očitog razloga. Infekcije koje ne nestanu s vremenom i zadrže virusnu aktivnost nazivamo kroničnim infekcijama. Kod kondiloma je virusna aktivnost velika, a mogu nestati spontano u periodu od nekoliko mjeseci ili čak godina. Iz toga slijedi da akutna faza kod HPV-infekcija može trajati godinama te je stoga donekle nejasna „praktična“ granica između akutne i kronične infekcije, što nije slučaj s većinom drugih DNA virusa. (120-122)

Pretpostavlja se da pojedine HPV-infekcije odmah ulaze u latentnu fazu, bez prethodnog razvoja akutne faze. Druge se pak nastavljaju na akutnu produktivnu fazu ukoliko nakon nje ne dođe do nestanka virusa. (123-126)

Papilomavirusi koloniziraju kožu i sluznice čovjeka od vrlo rane dobi i repliciraju se sporo, održavajući svoju replikaciju na vrlo niskoj razini bez ikakve vidljive štete na kliničkoj i/ili celularnoj razini. U tom smislu kod ljudi kontinuirano dolazi do infekcije i reinfekcije HPV-om te većina ljudi zapravo nosi u svom organizmu veliki broj latentnih ili kroničnih HPV-infekcija. Epidemiološki podaci upućuju na činjenicu da je većina HPV-infekcija akutna, čak i kada se radi o onkogenim genotipovima, te nikada ne prelaze u kroničnu infekciju. (123-124) U žena incidencija infekcija s onkogenim HPV-genotipovima opada s godinama života. Nasuprot tome, u ženskoj populaciji perzistencija infekcije raste s godinama života. U muškaraca se incidencija ne smanjuje s dobi, nego ostaje relativno konstantna u različitim dobnim skupinama. Prevalencija je u oba spola najveća u mlađoj odrasloj dobi, točnije u drugoj i trećoj dekadi. (108, 120, 123, 125)

Za razliku od virusa koji uzrokuju akutnu infekciju brzim umnožavanjem unutar stanice inducirajući potom i smrt stanice domaćina te oslobađanje viriona i jak imunosni odgovor, humani papilloma virusi (HPV) ne uzrokuju smrt stanice. Naprotiv, većina HPV infekcija perzistira desetljećima i nije osobito produktivna. Iznimka su virusne bradavice koje imaju kraću evoluciju te je u njima produkcija viriona značajna. Prirodna infekcija humanim papilloma virusom potencira imunološki odgovor, no kod malog broja zaraženih dolazi do stvaranja visokog titra antitijela koji bi ih štitili od reinfekcije istim tipom virusa. Osim toga, utvrđena je razmjerno česta koinfekcija s više različitih tipova humanog papilloma virusa u tkivima zdravih pojedinaca, kao i kod lezija niskog rizika. (126) Pri tom zasad nije razjašnjeno postoji li veća vjerojatnost za simultanu infekciju s određenim tipovima virusa, odnosno da li je vjerojatnost da će se pojedini tipovi HPV-a pojavljivati zajedno veća nego što bi se moglo očekivati iz statističke perspektive. Poznato je, međutim, da istovremena prisutnost dvaju ili više onkogenih tipova HPV-a ima veći potencijal za razvoj lezija visokog rizika. (127) Unatoč tome, rizik razvoja karcinoma ne dovodi se u vezu s istodobnom infekcijom s više tipova HPV-a i njihovom interakcijom s imunološkim sustavom domaćina s obzirom da pojedini karcinomi nastaju kao posljedica ekspanzije jednog klona te su pojedini tumori povezani sa (samo) jednim tipom virusa. (120-121, 125-127)

Onkogeni potencijal HPV-a ovisi primarno o sposobnosti virusnog E6 proteina da inducira degradaciju staničnog p53 proteina i o prisutnosti konkretnog E7 proteina koji ima sposobnost smanjiti izloženost virusa imunološkom sustavu u zaraženim stanicama. (127) Sinergijski učinak ovih virusnih proteina ima za posljedicu uspostavljanje kronične infekcije putem niske razine replikacije zaražene stanice te izbjegavanje izlaganja imunološkom odgovoru. Rezultat je proizvodnja niskih razina viriona i kronična infekcija koja traje desetljećima. U suprotnosti s tim su neonkogeni tipovi virusa koji potenciraju proizvodnju velike količine viriona te nastanak benignih lezija koje brzo rastu ali i evociraju jak imunološki odgovor zbog čega brzo i nestaju. Dugotrajna nekontrolirana stanična replikacija kod kroničnih infekcija dovodi do akumulacije mutacija i u nekim slučajevima genomske nestabilnosti uzrokovane ugradnjom virusnog genoma u genom stanice domaćina. S evolucijskog stajališta, razvoj karcinoma je završna faza kako za sam virus jer karcinomi ne proizvode virione i stoga nisu zarazni , tako i za domaćina jer su tumori, za razliku od prekanceroznih lezija, ireverzibilni. (120, 126-129)

1.8 Imunološki aspekti HPV-infekcija

Malo je studija kojima su ispitivani udio i brzina serokonverzije nakon preboljele anogenitalne infekcije HPV-om u muškoj populaciji.

Za proučavanje prirodnog humoralnog imunološkog odgovora kod HPV-infekcije služimo se antitijelima čiji ciljni antigen su čestice nalik virusu (engleski virus-like particles, VLP) nastali slaganjem L1 proteina. Specifična IgG protutijela usmjerena su na određene epitope za svaki HPV genotip. Tipično se sporo razviju i niskog su titra, međutim perzistiraju više godina. Zasad nema dokaza da njihova prisutnost mijenja tijek bolesti. U serumu i cerviksu u žena mogu se dokazati i IgA protutijela također usmjerena na L1, no ona brzo nestaju. Smatra se da je seropozitivnost na proteine E6 i E7 posljedica razvoja tumora, no nije još utvrđeno postoje li i drugi faktori osim prolongirane ekspozicije koji bi mogli na to utjecati. (130-131)

Pojedinim studijama seroprevalencije utvrđene su značajno (četiri do deset puta) niže vrijednosti protutijela na HPV16 tip-VLP u muškaraca u odnosu na žene iz istog geografskog područja, što može biti posljedica smanjene virusne ekspresije ili manjeg pristupa imunološkom sustavu. (131, 133) Niža stopa serokonverzije kod muškaraca nakon preboljele HPV infekcije može barem djelomično objasniti opservaciju da je u muškoj populaciji češća rekurentna infekcija istim HPV genotipom te da prevalencija i incidencija anogenitalnih HPV

infekcija ostaju visoke u svim dobnim skupinama. Nadalje, teško je dokazati sposobnost navedenih protutijela da štite od reinfekcije obzirom da je u slučaju HPV-a teško razlikovati prvu infekciju od reinfekcije, ili od reaktivacije prethodne infekcije. (132-134) Uočene su također i razlike u stopi serokonverzije među pojedinim HPV genotipovima, a spekulira se da kod muškaraca imunološki odgovor varira i ovisno o anatomskoj lokalizaciji infekcije. (130) Konkretno, serokonverzija je najveća i najbrža kod perzistentne (za razliku od prolazne) infekcije sa HPV6 genotipom. (130, 134) Interesantno je da kod žena nisu uočene takve razlike ovisne o genotipu HPV-a. (130-132)

Faktori koji su udruženi s prisutnošću protutijela na HPV6/11 razlikuju se od faktora koji se dovode u vezu s prisutnošću protutijela na HPV16. Od faktora koji se vežu uz status protutijela na HPV16 spominju se starija životna dob i preboljeli sifilis. (133) Međutim, prisutnost protutijela na HPV6/11 je vezana za faktore poput 10 ili više seksualnih partnera u posljednjih 12 mjeseci, pozitivna osobna anamneza na kondilome i herpes simplex virus 2 (HSV-2). (130, 132-134)

S druge strane, HPV seronegativnost ne isključuje ekspoziciju, djelomično i zato jer su trenutno dostupni serološki testovi za svega nekoliko HPV genotipova. Osim toga, križna reaktivnost, relativno niska osjetljivost i činjenica da infekcije drugih sluznica (osim anogenitalne) mogu inducirati stvaranje protutijela koja se ne mogu razlikovati od onih koja su nastala posljedično anogenitalnoj infekciji. (130-132)

1.9 Psihološki aspekti HPV-infekcija

Porast znanja i svjesnosti o HPV infekciji uglavnom se odnosi na žensku populaciju dok je vrlo malo takvih studija u muških ispitanika. Rezultati takvih malobrojnih studija nedvojbeno ukazuju na nižu razinu znanja i razumijevanja prirode bolesti, načina transmisije i dugoročnih posljedica u muškaraca u odnosu na žene. Štoviše, studije potvrđuju činjenicu da je stigma udružena sa spolno prenosivim infekcijama ključna zapreka za traženje informacija, skrininga, liječenja, vakcinacije i bihevioralne intervencije. (135-139) Sve navedeno može varirati među pojedinim etničkim skupinama. Konkretne multidisciplinarne intervencije su potrebne kako bi se smanjili rizici razvoja sekvela anogenitalne HPV infekcije kod muškaraca i kod njihovih seksualnih partnera oba spola. (140-141)

1.10 Patogeneza i prirodni tijek HPV-infekcije

Poznato je da je za razvoj prekanceroznih lezija visokog stupnja i karcinoma potrebna perzistentna infekcija onkogenim HPV genotipom. Ipak, zasad ne postoji konsenzus oko definicije perzistentne infekcije. Većina autora perzistentnom infekcijom smatra onu kod koje je isti HPV genotip ili skupina HPV genotipova detektirana u dva uzastopna pregleda pri čemu interval između dva pregleda varira od četiri mjeseca do 5-7 godina. (121) Iz tog je razloga predložena nova definicija prema kojoj se mjeri trajanje incidentne infekcije. Mnogi aspekti koji se tiču prirodnog tijeka bolesti ostaju nejasni. Konkretno, nemoguće je utvrditi točno vrijeme kada je do infekcije došlo. Nadalje, mogućnost postojanja latentne infekcije, njezino trajanje, razlozi koji uzrokuju prijelaz latentne infekcije u manifestnu kao i udio karcinoma koji se razviju nakon perioda latencije također ostaju otvorena pitanja. Iz tih je razloga zasad nemoguće precizno utvrditi granicu između prolaznih i perzistentnih infekcija. (120)

Zasad ne postoje pouzdani precizni podaci o vremenu potrebnom do rezolucije infekcije HPV-om kod muškaraca. Prema podacima kojima raspolažemo, prosječno vrijeme do nestanka infekcije kod muškaraca iznosi 5.9 mjeseci. (84)

Početni podaci proizašli iz kliničkih studija na manjim uzorcima upućuju na manju vjerojatnost da će infekcija HPV-om perzistirati kod muškaraca u odnosu na žene. Stopa nestanka onkogenih i neonkogenih HPV DNA u godini dana iznosi oko 75%. (75) Za razliku od žena, kod muškaraca dob nije čvrsto povezana sa incidencijom i trajanjem HPV infekcije. (85)

Što se kondiloma tiče, smatra se da vrijeme inkubacije u muškoj populaciji varira od tri tjedna do osam mjeseci, pri čemu se u većini slučajeva kondilomi razviju dva do tri mjeseca nakon infekcije HPV-om. (123, 125, 131) Međutim, spekulira se da bi period inkubacije u pojedinim slučajevima mogao biti i znatno dulji. Razvidno je da prirodni tijek ove infekcije kod muškaraca u velikoj mjeri nije poznat. Iako su benigni i nisu povezani s mortalitetom, kondilomi su vrlo infekciozni te s procjenjuje da će u 65% slučajeva nezaraženi seksualni partner osobe s kondilomima razviti i sam kondilome. (131) Osim toga, morbiditetu značajno doprinosi kompleksnost liječenja, psihosocijalna stigma i osjećaj srama. Iako je poznato da otprilike 20-30% kondiloma spontano regredira, visoka je i značajna stopa recidiva. (120, 126)

U velikoj mjeri zasad je nepoznat razlog zbog kojeg većina infekcija spontano nestaje dok manji dio perzistira i pod određenim okolnostima progredira. Međutim, poznati su faktori koji utječu na vrijeme potrebno do nestanka infekcije; HPV genotip, genetski aspekt domaćina,

dob u kojoj je imao prvi spolni odnos i koinfekcije. Ipak njihova je interakcija nedovoljno razjašnjena te se od budućih istraživanja očekuje rasvjetljavanje ovih aspekata. (126, 142)

1.11 Klinička slika HPV-infekcija

Raspon kliničkih manifestacija infekcije HPV-om izrazito je širok. Razlog tome je što klinička slika ovisi o više čimbenika: virusnom genotipu, vrsti epitela (fenotipu zaražene stanice), genotipu i imunološkom sustavu domaćina.

Iz toga proizlazi kompleksna klasifikacija polivalentnih kliničkih entiteta koji su u starijoj literaturi opisivani samo morfološki i unutar različitih skupina bolesti s obzirom da je tek kasnije utvrđena njihova virusna etiologija. Međutim, brojne varijacije kliničke prezentacije nisu uvijek jednoznačno određene genotipom HPV-a na način na koji se ranije mislilo. Štoviše, sve je veći broj dokaza da HPV DNA visokog onkogenog potencijala, a ne samo niskog mogu biti uzročnici i benignih lezija poput kondiloma.

U suvremenoj literaturi se HPV-infekcije klinički klasificiraju u četiri skupine:

- verukozne promjene kože
- promjene kod epidermodysplasia verruciformis (EV)
- genitalne infekcije
- ekstragenitalne infekcije sluznica (usne šupljine, larinksa, konjuktiva) (1)

S obzirom da je predmet istraživanja ovog rada anogenitalna infekcija HPV-om kod muškaraca, u nastavku će detaljnije biti opisane samo genitalne manifestacije HPV infekcije u muškoj populaciji.

S kliničkog aspekta genitalne HPV infekcije razlikuje se dominantno sedam entiteta: condylomata acuminata (šiljasti kondilomi), condylomata plana (ravni kondilomi), gigantski kondilom Buschke-Löwenstein, papulosis Bowenoides, erythro(dys)plasia Queyrat (stariji klinički naziv koji je ekvivalent intraepitelnoj neoplaziji, no, sasvim adekvatan „suvremeniji“ termin još uvijek ne postoji), morbus Bowen te invazivni karcinom penisa. (142) Od navedenih kliničkih entiteta papulosis Bowenoides, erythro(dys)plasia Queyrat i morbus Bowen patohistološki odgovaraju penilnoj intraepitelnoj neoplaziji. Opisani klinički entiteti dovode se u vezu s oko 40 HPV genotipova koji imaju afinitet za sluznicu i kožu genitalne regije. (119, 142) Valja napomenuti i da su supkliničke lezije znatno češće od vidljivih kondiloma, a u

njihovoj vizualizaciji može pomoći i primjena tehnike povećavanja vidnog polja, ponekad i uz prethodno premazivanje 5% octenom kiselinom. (142-144)

Među navedenim kliničkim entitetima najčešći su šiljasti kondilomi – condylomata acuminata. To su egzofitične papulozne ili nodozne tvorbe glatke ili lobulirane površine zbog čega poprimaju ponekad papilomatozni izgled, čija boja može varirati od boje kože, bjelkaste (u vlažnim arealima) ili sive do različitih nijansi smeđe boje. Prema kliničkom izgledu možemo razlikovati verukozne, papulozne, fibromatoidne kondilome, ili bilo koji prijelazni oblik u tom smislu. Veličina im varira od 1 do 10 mm no mogu konfluirati u veće tumorske lezije, što je osobito izgledno za intertriginozne predjele u kojima maceracija i madidacija imaju važnu patogenetsku ulogu. (142) Broj im također znatno varira; od 1 do više od stotinu lezija. (142) Mogu biti pendulantne ili papilomatozne lezije široke baze. Kliničke prezentacije različitih podtipova šiljastih kondiloma prikazani su na slikama 1.-4. U neobrezanih muškaraca najčešće su lokalizirani na unutrašnjem listu prepucija, frenulumu i u predjelu sulkusa koronarijusa. U obrezanih su muškaraca najčešće lokalizirani na corpusu penisa. Mogu biti vidljivi također i u predjelu vanjskog ušća uretre, distalne uretre, perineuma, na skrotumu, u pubičnoj, ingvinalnoj i perianalnoj regiji. (73, 142)



Slika 1. Šiljasti kondilomi (verukozni tip) na glansu i distalnom dijelu genitala



Slika 2. Šiljasti kondilomi (verukozni tip) u predjelu sulkusa koronarijusa, frenuluma i unutrašnjeg lista prepucija



Slika 3. Kondilomi na distalnom dijelu genitala i u pubičnoj regiji



Slika 4. Kondilomi (fibromatoidni tip) ingvinalne regije

Condylomata plana ili ravni kondilomi su papilomatozne tvorbe ravne površine koje je ponekad teško vizualizirati bez povećala/peniskopa. Ranija literatura svrstava ih pod varijantu kliničke slike šiljastih kondiloma, no danas je poznato da su za razliku od šiljastih kondiloma, ravni kondilomi najčešće uzrokovani onkogenim HPV-genotipovima, primarno HPV16, 18, 31 i/ili 33. (73, 142)

Gigantski kondilom Buschke-Löwenstein (BL) rijedak je tumor genitalne i anorektalne regije koji se ubraja u skupinu tzv. semimalignih verukoznih karcinoma koji su lokalno invazivni, no rijetko metastaziraju. U kliničkom smislu radi se o masivnoj egzofitičnoj tumorskoj leziji anogenitalne regije koja može poprimiti veličinu veću od 10 cm. Dovodi se u vezu sa HPV 6 i 11 genotipom, koji su najčešće detektirani i kod kondiloma, međutim nejasni su uzroci različitog biološkog ponašanja i evolucije u ovom slučaju. Gigantski kondilomi prikazani su na slici 5. Postoje također dokazi da se kod BL gigantskog kondiloma mogu detektirati i onkogeni HPV genotipovi. (143) U rijetkim slučajevima zabilježena je progresija

kondiloma u veliku tumorsku masu koja infiltrira podležeće strukture. Do fokalne maligne transformacije može doći spontano ili nakon iradijacije. (73, 142)



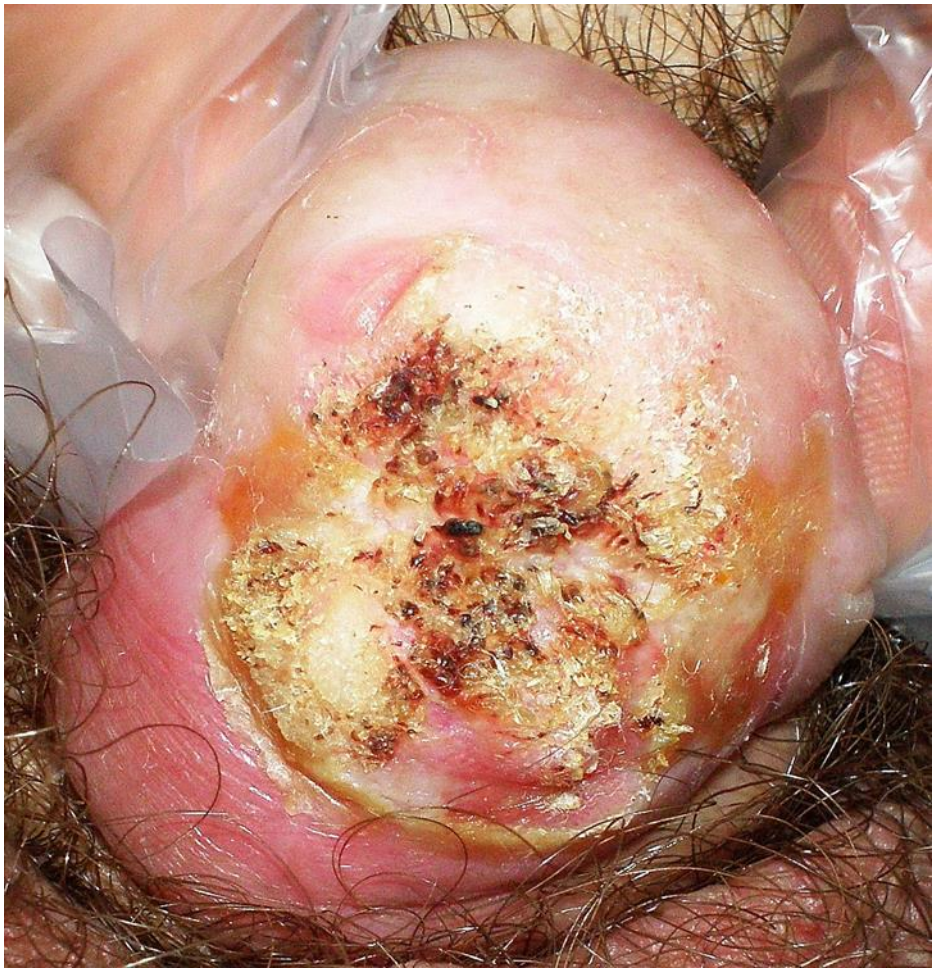
Slika 5. Condyloma giganteum Buschke-Löwenstein perianalne regije

Bowenoidna papuloza klinički se manifestira eritematozno-smeđastim papulama ili plakovima ravne površine, najčešće u predjelu penisa, iako se ponekad nađu i u perineumu ili perianalno. Pojavljuju se u mlađih muškaraca i kliničkim izgledom donekle podsjećaju na šiljaste kondilome no njihova histološka slika upućuje na skvamoznu intraepitelnu neoplaziju visokog rizika ili planocelularni karcinom in situ. (142) Najčešće se iz takvih lezija izolira onkogeni HPV 16 genotip. (73, 142)

Erythro(dys)plasia Queyrat (v. ranije u ovom odjeljku!), kao i morbus Bowen predstavljaju kliničke entitete intraepitelne neoplazije visokog stupnja displazije, najčešće, no ne i jedino u muškaraca starijih od 50 godina. (73) Smatra se da su one prekursori bazaloidnog i bradavičastog karcinoma penisa u kojima je prevalencija HPV DNA visoka (80-100%). Erythro(dys)plasia Queyrat manifestira se nerijetko erozivnim arealima u razini kože. Dominantno je lokalizirana na glansu penisa, sulkusu koronarijusu te unutrašnjem listu prepucija. Bowenova bolest anogenitalne regije prezentira se žarko eritematoznim baršunastim solitarnim oštro ograničenim plakom koji se širi centrifugalno te može zahvatiti i veće areale uključujući pubičnu, perinealnu i perianalnu regiju. Leukoplastična varijanta prezentira se kao bijeli oštro ograničeni plak glatke ili verukozne površine. (73, 142)

Invazivni karcinom penisa može u svojoj kliničkoj prezentaciji imati varijabilnu sliku; u nekim slučajevima manifestira se kao egzofitična tumorska masa, međutim može poprimiti

izgled ravnih, eritematoznih, ponekad egzulceriranih lezija, ili pak nepravilnih zadebljanja, koja mogu imati baršunastu površinu ili biti prekrivene krustama. Sekrecija može biti vidljiva u nekim slučajevima. Ponekad je izražena bolnost iako često potpuno izostaju subjektivne tegobe. Krvarenje se također ponekad može uočiti. Invazivni je karcinom karakteriziran polaganim rastom koji postupno može zahvatiti čitav glans i prepucij te se potom proširiti na korpus penisa. (142, 144) Kliničke slike karcinoma penisa prikazane su na slikama broj 6. i 7.



Slika 6. Planocelularni karcinom penisa pozitivan na HPV 16 u 59-godišnjeg bolesnika



Slika 7. Planocelularni karcinom penisa pozitivan na HPV 16 u 89-godišnjeg bolesnika

1.12 Dijagnostika

Sukladno standardnoj medicinskoj praksi, prvi korak prema postavljanju dijagnoze anogenitalne HPV infekcije predstavlja detaljna anamneza. Poseban osvrt treba biti usmjeren na seksualne navike bolesnika, te na podatke vezane za njegova seksualnog partnera, kolikogod je to praktično i vjerodostojno moguće. Konkretno, za većinu muških bolesnika, bitan je podatak o rezultatu citološke analize obriska vrata maternice (Papanicolau) njegove partnerice, osobito ukoliko postoji u takvom nalazu opis "promjena povezanih s HPV-om" poput koilocitoze i diskarioze, odnosno ukoliko je utvrđena CIN ili SIL (engleski squamous intraepithelial lesion). Također, prisutnost kondiloma kod partnera vrijedan je anamnestički podatak. Na osnovu tih informacija usmjerava se postupak postavljanja ispravne dijagnoze prema detaljnom kliničkom pregledu čitave anogenitalne regije kao i odabiru diferentnih pretraga na temelju kojih bismo, s najvećom mogućom sigurnošću, potvrdili ili isključili HPV genitalnu infekciju. (143, 145)

Za postavljanje dijagnoze anogenitalne HPV infekcije ključan je pažljiv klinički pregled, što je još uvijek najbitniji dijagnostički parametar. Pritom svakako valja imati na umu činjenicu da HPV infekcije penisa mogu biti latentne, supkliničke ili klinički manifestne. (145) Latentna infekcija se definira prisutnošću HPV DNA u tkivu uz odsutstvo bilo kakvih kliničkih

i histoloških promjena. Subkliničke infekcije nisu vidljive golim okom iako ih se u određenim slučajevima može vizualizirati nakon premazivanja s 3-5% octenom kiselinom za što je potrebno znanje i iskustvo kliničara. U histološkoj slici kod supkliničkih infekcija pristune su modifikacije vezane su za prisutnost HPV-a. Isto je i kod kliničkih HPV infekcija kod kojih se i na makroskopskoj razini mogu uočiti klinički vidljive lezije. (142-148)

Kliničke lezije vidljive su golim okom. Za razliku od njih, subkliničke lezije, postoji li indikacija za takvu vrstu pregleda, odnosno pretrage, postaju vidljive tek 2-3 minute nakon primjene 3-5%-tne octene octene kiseline namočene u gazu ili vatu. Kao dodatnu pomoć u njihovoj vizualizaciji može se primijeniti peniskop ili obično povećalo. (149) Primjenom octene kiseline dolazi do pojave bjelkastih areala glatke ravne površine i jasno definiranih rubova. Taj efekt pojavit će se u arealima sa parakeratozom i/ili povećanom gustoćom stanica. Obično se nalaze na mukoznim predjelima poput prepucija ili glansa penisa, a znatno rjeđe na orožnjelom epitelu koji se nalazi na vanjskoj strani genitala. Međutim, biološka podloga za takvu reakciju ostaje nerazjašnjena. Iako ova metoda može biti vrlo korisno pomoćno sredstvo u dijagnostici bolesti muškog genitala, njezina je rutinska primjena za dokazivanje bolesti kod muškaraca s visokim rizikom obolijevanja od HPV infekcije osporavana s obzirom da nije poznata njezina pozitivna i negativna prediktivna vrijednost u populacijama s različitim razinama rizika. (94) Dodatni „otežavajući“ faktor za opravdanost primjene 3-5% octene kiseline leži u činjenici da nije dovoljno specifična. Tome u prilog govori činjenica da će najprije pobijeliti areali s prisutnom upalom ili abrazijom. Otud i bojazan da bi moglo doći do krive interpretacije nalaza te pogrešnog dijagnosticiranja i liječenja lezija koje nisu uzrokovane HPV-om. (94) Metoda je, međutim, ponekad korisna u identifikaciji sitnih klinički neupadljivih ili supkliničkih lezija kod muškaraca koji imaju kondilome. (73)

U muškaraca koji se žale na svrbež ili bolnost te imaju eritem u predjelu genitala, također je potrebno učiniti detaljan pregled s ciljem isključivanja penilne intraepitelne neoplazije (PIN-a) ili invazivnog karcinoma. U tome je od velike pomoći biopsija i patohistološka analiza, međutim ona se rutinski ne primjenjuje često. Indikacija za biopsiju je svaka promjena suspektna na prekanceroznu leziju, odnosno invazivni karcinom; primarno Bowenoidna papuloza, BL, karcinom, kao i svaka „nejasna“ promjena koja se ne uklapa u prethodno navedene kliničke „obrasce“ i ne može se svesti na neki drugi, jasno definirani klinički entitet u genitalnoj regiji te šiljasti kondilomi koji su perzistentni unatoč provedenoj terapiji. U nalazu patohistološke analize kod kondiloma nalazi se akantoza, parakeratoza, koilocitoza (keratinociti s ekscentričnom jezgrom i relativnom velikim perinuklearnim halo-

om – posredni dokaz virusne etiologije promjene) i papilomatoza (pojava intrapapilarnih tračaka koji se šire prema dermisu). Na temelju rezultata imunohistokemijske pretrage strukturnih proteina HPV u bioptatu promjene mogu se dobiti potpuniji podaci o virusnoj etiologiji. Perzistentna infekcija visokorizičnim HPV genotipovima može dovesti do razvoja karcinoma. Prekancerozne lezije predstavljaju jedan kontinuum morfoloških promjena, pri čemu je kod PIN I povećanje i hiperkromazija jezgre prisutno samo u nižim slojevima epidermisa a ponekad je udruženo s koilocitnom atipijom. (143-144) Kako lezija progredira tako se postupno promjene šire na punu debljinu epidermisa pri čemu je kod PIN-a III čitav epidermis prožet nezrelim atipičnim stanicama bez stanične diferencijacije, maturacije i organizacije uz brojne često nepravilne mitoze. (142-144) Kod invazivnog karcinoma tumorske stanice probijaju bazalnu membranu. (73, 142-144)

U dijagnostičkom smislu ni tipična klinička slika kao ni patohistološke promjene ne dokazuju prisustvo virusa. Za izravno dokazivanje HPV DNA u tkivu potrebno je primijeniti neku od metoda molekularne dijagnostike. Radi se, u načelu, o hibridizacijskim testovima ili o metodi lančane reakcije polimerazom. (148, 150)

1.13 Tipizacija HPV DNA

Postoji nekoliko metoda za uzimanje uzoraka s muškog genitala od koji se dvije ističu po broju reproducilnih i adekvatnih uzoraka za HPV DNA detekciju. Jedna metoda uključuje abraziju genitalne kože prije uzimanja uzorka Dacronovim štapićem i prikupljanje eksfoliranih stanica u standarni transportni medij (STM). (151) Druga je metoda kojom se uzorak s genitalne kože uzima izravno Dacronovim štapićem koji je prethodno namočen u fiziološku otopinu i prikupljanje u standardni transportni medij (STM). Međutim, znatno je „reprezentativnije“, osobito u muškaraca, prikupljanje materijala ekskohleacijskom tehnikom. (74, 145, 151)

Temelj hibridizacije je Watsonovo i Crickovo pravilo komplementarnosti dvaju lanaca DNA i istovjetno sparivanje purinskih i pirimidinskih baza. Naime, adenin se spaja s timinom, a guanin s citozinom. Veza između parova baza odnosno između dvostrukih lanaca DNA prekida se pri povećanim temperaturama (denaturacija), a ponovo se uspostavlja hlađenjem (renaturacija). Postoji više vrsta hibridizacijskih metoda. Tako, na primjer, hibridizacija po Southernu omogućuje detekciju točno određenog odsječka DNA u smjesi odsječaka različitih dužina. Genomska DNA se najprije pocijepa restrikcijskim enzimima, a dobiveni odsječci

odijele se prema veličini elektroforezom u gelu agaroze. Zatim se DNA prenese na nitroceluloznu ili najlonsku membranu i denaturira u jednolančani oblik. Relativni položaj odsječaka DNA pri prijenosu na membranu ostaje sačuvan. DNA se na membrani hibridizira sa specifičnom DNA probom koja je obilježena radioaktivno ili kemijski, pomoću posebne boje. Nakon toga se provodi detekcija željenog odsječka DNA koji je hibridizirao s probom. Detekcija se provodi autoradiografskom ili kemijskom metodom. Uspješna detekcija hibridizacije ovisi o više činitelja među kojima treba istaknuti omjer genomske DNA i specifične probe, veličinu probe i njenu specifičnu aktivnost te količinu DNA prenesenu na membranu. HPV DNA može se također dokazati i primjenom dot blot, odnosno slot blot hibridizacije. (152-154)

Reakcija lančane polimeraze (engleski polymerase chain reaction, PCR) je metoda sinteze nukleinskih kiselina *in vitro* kojom se specifični odsječak DNA može umnožiti u velikom broju kopija. (150, 155) PCR je vrlo osjetljiva metoda kojom se umnažanje može započeti od jedne molekule DNA. Preduvjet umnažanja gena je poznavanje barem jednog dijela slijeda nukleotida ispitivanog gena. Zbog toga se odabiru početni oligonukleotidi DNA ("primeri", "klice") komplementarni graničnim dijelovima poznatog slijeda DNA (ciljna DNA). Početni oligonukleotidi sparuju se sa suprotnim lancima ciljne DNA, a orijentirani su tako da se sinteza nove DNA odvija u regiji između njih. Ukratko, metoda se izvodi tako da se mješavina genomske DNA pomiješa s pojedinačnim deoksinukleotidima, parom početnih oligonukleotida, termostabilnom (Taq, Thermus aquaticus) DNA polimerazom te solima i detergentima određenih koncentracija. (156) Takva se mješavina ciklički inkubira na točno određenim temperaturama. Nakon posljednjeg ciklusa cjelokupna se reakcija zaustavlja hlađenjem na 4 stupnja Celzijusa. Svaki ciklus PCR udvostručava količinu ciljne DNA, a rezultat toga je eksponencijalno nakupljanje specifičnih ciljnih fragmenata. Metoda PCR se uspješno primjenjuje i za detekciju virusne DNA. (154-156)

Amplifikacijski kit (INNO-LiPA HPV genotyping Extra Amp) standardiziran je za pripremu biotiniliranog amplificiranog materijala. Ovaj amplifikacijski kit bazira se na PCR. Amplifikacijski produkt se potom hibridizira koristeći nitroceluloznu membranu na kojoj je fiksirano 32 tipno specifičnih DNA proba i 4 kontrolne linije. (156-157)

1.14 Diferencijalna dijagnoza

Premda je u prisustvu tipične kliničke slike šiljastih kondiloma dijagnoza jasna, u diferencijalno dijagnostičkom smislu treba razlikovati nekoliko kliničkih entiteta od HPV-infekcije. Prije svega, moguće je žlijezde lojnice na prepuciju ili koroni glandis penis zamijeniti sa šiljastim kondilomima. Slično je i sa papilama (engleski pearly penile papules) podjednake veličine, boje kože ili nešto svijetlije, poredanima u nekoliko gusto zbijenih redova cirkumferencijalno u području korone glandis penis koje histološki odgovaraju akralnim angiofibromima.

Mollusca contagiosa od tipičnih se kondiloma razlikuju po tome što su glatke sjajne površine i obično umbilicirane, odnosno imaju sitno centralno lokalizirano udubljenje.

Veći macerirani kondilomi sa širom bazom mogu podsjećati na condylomata lata koji su dio kliničke slike sekundarnog sifilisa. Kod ovog tipa kondiloma također treba razmotriti i pemphigus vegetans ili pemphigus familiaris benignus Hailey-Hailey u diferencijalnoj dijagnozi.

Upalne bolesti poput lichen ruber planus i lichen anularis dolaze također u obzir diferencijalno-dijagnostički u anogenitalnoj regiji. (158)

Hiperpigmentirani kondilomi verukoidna izgleda potrebno je razlikovati od seborejičkih keratoza.

U perianalnoj regiji iznimno rijetko se vanjski hemeroidni nodusi mogu zamijeniti za kondilome.

Gigantski kondilom BL potrebno je bioptirati s više mjesta kako bi se isključio fokalni maligni prijelaz u verukozni karcinom. (158)

Kliničke manifestacije Bowenoidne papuloze treba oprezno interpretirati i razlikovati od kondiloma papularnog tipa.

Kod diferencijacije „acetobijelih“ areala nakon primjene 3-5% octene kiseline diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze balanitis, kandidamicetična dermatomikoza i traumatske mikroabrazije.

Diferencijalna dijagnoza kod eritroplazije Queyrat može, u širem smislu, obuhvaćati lichen simplex, iritativni kontaktni dermatitis i psorijazu. (73, 143

1.15 Liječenje

Unatoč činjenici da je kod imunokompetentnih osoba većina HPV infekcija prolazna i spontano s vremenom nestaje, postoji konsenzus za potrebom liječenja klinički manifestnih lezija kao i penilne/analne intraepitelne neoplazije. U pogledu liječenja supkliničkih lezija, mišljenja među pojedinim ekspertima nisu ujednačena. Smisao liječenja sastoji se u sprječavanju progresije bolesti kao i transmisije zaraze na druge osobe. Potrebno je svakako istaknuti da zasad ne postoji specifično protuvirusno (etiološko) liječenje HPV infekcija. Također, ne postoje niti službeni protokoli ni standardi za liječenje anogenitalne HPV-infekcije u muškoj populaciji. Taj nedostatak barem je djelomično posljedica slabog napretka u istraživanjima mogućnosti liječenja HPV anogenitalne infekcije. (159-161)

Dosad je u literaturi opisano više raznovrsnih metoda koje se mogu primijeniti u liječenju HPV-infekcije samostalno ili u kombinaciji. (159-161) Unatoč tome uspješnost liječenja je varijabilna uz učestale recidive (25-65%), velike financijske troškove te moguće emocionalne i psihosocijalne posljedice. (159-160) Učestali recidivi mogu se objasniti činjenicom da je HPV infekcija tipično rasprostranjena po čitavoj anogenitalnoj regiji ili je multifokalna. Rezultati kliničkih studija ukazuju, dok iskustvo u svakodnevnom radu u kliničkoj praksi potvrđuje bolju učinkovitost liječenja uz manje recidiva kada se kombiniraju barem dva oblika liječenja. (161) Proaktivno sekvencijsko liječenje podrazumijeva takvu kombinaciju terapijskih modaliteta primjenom npr. imiquimoda i sinekatehina ili sinekatehina nakon CO_2 lasera ili krioterapije i sinekatehina. (162-164) Koristeći sinergijski učinak obiju metoda liječenja postižu se optimalni rezultati i manji broj recidiva. (162-164)

Mehanizam djelovanja pojedinih terapijskih modaliteta dominantno se osniva na izravnoj destrukciji i/ili uklanjanju postojećih lezija ili na indukciji citotoksičnosti usmjerene na zaražene stanice. Pojedini modaliteti liječenja isključivo se primjenjuju od strane liječnika u ambulanti, dok se drugi mogu primjenjivati samostalno kod kuće uz povremene liječničke kontrole. (159-161)

Izbor načina liječenja anogenitalne HPV-infekcije ovisi o više čimbenika; dobi i općem stanju bolesnika, njegovoj sposobnosti tolerancije nelagode uzrokovane liječenjem, njegovoj motivaciji i sposobnosti za liječenje (osobito kod samostalne primjene lijeka), morfologiji, veličini i lokalizaciji kondiloma, iskustvu terapeuta, te ekonomskim prilikama, odnosno ograničenjima. (73, 143, 159-161)

1. Fizikalna (ablativna) sredstva (lokalna primjena):

1.1. Tekući dušik (N2)
1.2. Ugljikov dioksid (CO2)

2. Kriokirurgija

3. Kiruška terapija

3.1. Ekskohleacija
3.2. Ekscizija/aplanacija
3.3. Elektrokauterizacija

4. Laserska terapija

4.1. CO2 laser
4.2. Neodymium-yttrium aluminium garnet (Nd-YAG) laser
4.3. Pulsed dye laser

5. Kemijska sredstva (lokalna primjena)

5.1. Citotoksična sredstva

5.1.1.1. Podophyllin

5.1.1.2. Podophyllotoxin

5.1.1.3. 5-fluorouracil (5-FU)

5.1.1.4. Bleomycin

5.2. Kaustična sredstva

5.2.1.1. Trikloroctena kiselina (70-90%)

5.2.1.2. Salicilna kiselina

6. Imunomodulatori (lokalna primjena)

6.1. Imiquimod 5%

6.2. Sinekatehini 10-15%

Među navedenim terapijskim opcijama fizikalne ablativne metode, kirurške i kriokirurške te laserske metode zajedno s primjenom kaustičnih sredstava i podofilina isključivo se vrše od strane liječnika u zdravstvenim ustanovama. Imunomodulatori i neka druga „blaža“ citotoksična sredstva mogu se primjenjivati sa strane bolesnika kod kuće.

Sukladno suvremenim smjernicama za liječenje anogenitalne HPV infekcije među kućnim tretmanima najčešće su prema jasno zadanim režimima primjenjivani podofilotoksin u obliku otopine ili kreme, 5% imikvimod te 10-15% sinekatehini također u obliku kreme. Među tretmane koji se obavljaju od strane liječnika u zdravstvenim ustanovama najčešće je primjenjivana krioterapija, 70-90% trikloroctena kiselina, te kirurško ili elektrokirurško, odnosno kriokiruško liječenje i lasersko liječenje. Svakako valja naglasiti da ne postoji terapijski modalitet koji bi sam po sebi bio optimalan, odnosno „bolji od drugih“ za liječenje kondiloma anogenitalne regije. U izboru liječenja potrebno je uvažiti činjenicu kako svaka opcija ima svoje prednosti ali i ograničenja te da je rizik od recidiva razmjerno velik neovisno o načinu liječenja.

Pojedini oblici liječenja među prethodno navedenima, poput podofilina, primjenjuju se rjeđe u svakodnevnoj praksi zbog potencijalnog toksičnog učinka pojedinih sastojaka koji su dokazano mutageni. (160) Iako limitirana, njihova je racionalna primjena dozvoljena uz mjere opreza isključivo kao oblik ambulantnog liječenja od strane liječnika. (165-167)

Valja svakako napomenuti da očekivane nuspojave liječenja variraju od subjektivnog osjećaja nelagode, peckanja, žarenja i bolnosti do nastanka eritema, iritacije, erozija, ulceracija, postupalnih hiper- ili hipopigmentacija te ožiljaka. Kod težih je nuspojava ponekad potrebno privremeno obustaviti liječenje. (159-161, 166)

1.16 Cjepivo protiv HPV-a

Osim navedenih terapijskih opcija, treba spomenuti da su također razvijena i odobrena za primjenu preventivna cjepiva namijenjena djeci i adolescentima prije početka seksualne aktivnosti (poželjno prije navršene 12.-e godine), odnosno od 9-26 godina starosti sa ciljem

prevencije nastanka kondiloma, prekanceroznih lezija i karcinoma. (167-170) S obzirom na HPV genotip protiv kojeg pružaju zaštitu, na tržištu su povijesno bile dostupne tri vrste cjepiva čija je dugoročna učinkovitost potvrđena u populacijama s visokom razinom procijepljenosti (84, 93, 168-179):

- dvovalentno (HPV16, 18)
- četverovalentno (HPV6, 11, 16, 18)
- deveterovalentno (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58)

Sva tri cjepiva baziraju se na VLP (engleski *virus-like particle*) glavnog L1 proteina papilomavirusne kapside. VLP je protein koji ne sadrži virusni genom te je neinfekciozan i neonkogen, zbog čega se cjepiva smatraju sigurnijima od atenuiranih vakcina. (180-182) Generacija cjepiva baziranih na L1-VLP pruža učinkovitu zaštitu isključivo od konkretnih HPV genotipova, uz napomenu kako dvovalentno cjepivo može pružiti određenu križnu zaštitu i od pojedinih filogenetski povezanih genotipova sa HPV genotipovima 16 i 18; prije svega iz klastera α-9 (nalik HPV16 su HPV31, 33, 35, 52, 58) i α-7 klastera (nalik HPV18 su HPV 39, 45, 59 i 68). (183) Studijama je utvrđeno da je moguće spriječiti preko 90% infekcija, abnormalnosti i prekanceroznih lezija uzrokovanih HPV-om ukoliko ih prime osobe prije prvog spolnog odnosa. (183) Isti učinak postići će se u svega 50-60% slučajeva kada se cijepljenje provede nakon početka seksualne aktivnosti. (184-185) Sve više dokaza upućuje na činjenicu da se bolji učinak cijepljenja postiže u populaciji predadolescenta zahvaljujući boljem imunološkom odgovoru na cjepivo u odnosu na odrasle osobe. (180, 186-187)

Metaanalizom koja je uključivala 60 milijuna osoba oba spola iz ukupno 14 zemalja ukazala je značajan učinak dostupnih cjepiva u smanjenju prevalencije HPV-om uzrokovanih bolesti; primarno genitalnih HPV infekcija, anogenitalnih kondiloma, te histološki verificiranih CIN2+ dijagnoza. (188) HPV 16 i 18 reducirani su za 83%, HPV 31, 33 i 45 za 54% među djevojkama u dobi od 13 do 19 godina. (183-185) Prevalencija anogenitalnih kondiloma reducirana je za 67%, dok je dijagnoza CIN2+ reducirana za 51% među djevojkama životne dobi od 15 do 19 godina. (184-185) Osim toga, potvrđen je i učinak kolektivnog imuniteta u populaciji dječaka i starijih žena. (188)

Kumuliraju se dokazi koji potkrijepljuju preporuke o korisnosti cijepljenja osoba oba spola, ne samo djevojčica. (187) Usprkos značajno nižim stopama serokonverzije nakon preboljele HPV infekcije u muškoj populaciji, dokazana je gotovo 100% serokonverzija nakon cijepljenja muškaraca. (130, 189-190) Time vakcinacija muškaraca postaje jedina dugoročno pouzdana

metoda zaštite muškaraca od HPV-om induciranih bolesti. (130) U mnogim je zemljama, uključujući i našu, implementiran program cijepljenja djevojčica i dječaka, a u pojedinima poput Engleske je uvedeno i besplatno cijepljenje za punoljetne homoseksualne osobe muškog spola. (189) Kod osoba s povećanim rizikom obolijevanja od HPV infekcija, uključujući i osobe koje žive sa HIV-om (engleski *human immunodeficiency virus*) te MSM populaciju, HPV cjepivo može biti korisno unatoč smanjenoj učinkovitosti zbog potencijalno slabijeg imunološkog odgovora kao posljedice prethodne ekspozije HPV-u. (190) Iako je rizik razvoja HPV-om induciranih karcinoma deset puta veći kod žena u odnosu na muškarce, poznato je da muškarci imaju veći rizik od oralne infekcije HPV-om te određenih (primarno orofaringealnih) karcinoma induciranih HPV-om. (191-192) To se izravno povezuje sa sveukupno većim brojem seksualnih partner(-ic)a tokom života te konzumacijom duhana. (191-192) Protektivna uloga vakcinacije osoba ženskog spola na rizik obolijevanja od karcinoma uzrokovanih HPV-om kod muškaraca manifestira na sljedeći način: ukoliko je procijepljeno 60% žena, rizik obolijevanja od karcinoma induciranih HPV-om smanjuje se za 37% a u slučaju kada je procijepljeno 90% žena, rizik se smanjuje za 66%. (193-194) Nažalost u mnogim zemljama procijepljenost kod žena je na razini ispod 60% zbog čega je teško postići priželjkivanu zaštitu osoba muškog spola. (194) Nadalje, taj učinak je minimalan kod osoba homoseksualne orijentacije. (194) Multiplim studijama dokazano je da unatoč nižem omjeru utroška i koristi (engleski *cost-benefit ratio*) kod cijepljenja muškaraca u odnosu na žene, ipak je cijepljenje dječaka i djevojčica korisnije u prevenciji HPV-om induciranih bolesti i karcinoma nego kada se cijepe samo djevojčice.(189-190, 193-196) Jedna od prednosti cijepljenja osoba oba spola je i taj da može omogućiti bolji efekt kolektivnog imuniteta i kod nižih stopa procijepljenosti populacije. (193-196)

Danas se najviše (u svijetu, pa definitivno i u Hrvatskoj) najviše primijenjuje deveterovalentno (9v) cjepivo protiv HPV. Ono je učinkovito u prevenciji infekcije i prekurskorskih cervikalnih lezija (>95% ukoliko se cijepljenje provede prije ekspozicije HPV-u). Također je za 9v cjepivo utvrđena 90%-tna inhibicija incidencije vulvarnih bolesti te 80-85%-tna inhibicija vaginalnih bolesti. (197-198) Antitijela inducirana 9v cjepivom mogu prijeći placentu i tako potencijalno pružiti zaštitu novorođenčeta od infekcije HPV-om 6 i HPV11. (199) Smatra se da 9v cjepivo ima minimalno križnu zaštitnu učinkovitost u prevenciji infekcije i razvoja premalignih i malignih bolesti uzrokovanih drugim HPV genotipovima izuzev onih devet pokrivenih cjepivom. (180, 200) Za nonavalentno cjepivo potvrđen je dobar i dugotrajan imunološki odgovor koji je bio održan i 6 godina nakon cijepljenja. Sigurnosni

profil cijepiva također je vrlo povoljan a među ključne nuspojave ubrajaju se reakcija na mjestu uboda u smislu bolnosti i otekline. (201-203) Iako se mogu pojaviti i opći simptomi, dosad nije uočen statistički značajan povećan rizik od sistemskih simptoma. (201, 203-206) Metaanalizma nisu pronađene značajne nuspojave kao ni negativni utjecaji na trudnoću niti na pojavu novostečenih autoimunih i/ili neuroloških bolesti nakon HPV vakcinacije. (204-206)

Znanstvenici i dalje ulažu napore u razvoj novih cjepiva, primarno kurativnih koji bi potaknuli stanični imunološki odgovor s ciljem izliječenja uspostavljenih infekcija i malignih bolesti. Iduća generacija cjepiva trebala bi pokrivati više HPV genotipova te zasad postoje očekivanja da će se to moći postići primjenom cjepiva koja će se bazirati na L2-VL, odnosno na kimeričkim L1-L2-VLP. (181-182)

Cilj procjepljivanja jest višestruk i do sada su rezultati brojnih studija vrlo jasno pokazali višestruku korist cijepljenja; ovaj čas najvidljivije u brojevima u smislu smanjenja učestalosti šiljastih kondiloma u zemljama u kojima se HPV cijepljenje provodi već niz godina. Osim toga, postoje već brojni dokazi višestruke koristi HPV-cijepljenja u smislu za sada jedinog cjepiva koje može prevenirati nastanak karcinoma i rezultati su u tom smislu ohrabrujući. (207-215) No, razumljive su i barijere koje postoje u raznim zemljopisnim područjima, ovisno i o kulturnom nasljeđu, tradiciji i slično, čak nekad i više nego o financijskom stanju unutar neke zajednice. Međutim, čvrsto vjerujemo da će posezanje za znanstvenim dokazima i zdrav razum prevladati u cilju osiguranja što je moguće bolje kvalitete života i zdravlja bolesnica i bolesnika s HPV-genitalnom infekcijom, kao i u smislu prevencije zloćudnih tumora koji su posljedica HPV-infekcija.Ipak, kritički treba napomenuti da unatoč hvalevrijednim naporima u pronalaženju novih kurativnih i preventivnih modaliteta u kontekstu HPV-infekcije, treba imati na umu je je većina HPV genotipova sastavni dio našeg mikrobioma (viroma) te je stoga malo vjerojatno da će doći do njihove kompletne eliminacije. Štoviše, nije zasad jasno niti da li je to uopće poželjno obzirom na vjerojatnost da HPV igra važnu ulogu u našem ekosustavu. Iz toga slijedi da je uz razvoj novih cjepiva važno nastaviti dalje istraživati prirodni tijek HPV-infekcije, jasnije definirati akutne, latentne i kronične HPV-infekcije, pronaći markere kroniciteta, odnosno faktore presudne za prijelaz akutne u kroničnu infekciju, istražiti interakciju virusa sa imunološkim sustavom domaćina i mogućnosti modifikacije prirodnog odgovora na prisutnost virusa, ispitati utjecaj HPV-infekcije na plodnost te pronaći dugotrajne serološke markere infekcije. U tome će značajnu ulogu imati prospektivne studije sa dugoročnim praćenjem (engleski follow-up) i kratkim intervalima provjere navedenih parametara. (108)

2. Hipoteza

Genotipovi HPV-a visokog onkogenog rizika (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) mogu biti samostalni uzročnici benignih lezija u anogenitalnoj regiji muškaraca u većoj mjeri nego što se do sada opisivalo.

3. Ciljevi rada

3.1 Opći ciljevi

Ispitati zastupljenost 18 genotipova HPV-a (konsenzus regija) i pojedinih genotipova HPV-a u klinički promijenjenoj koži i sluznici genitalne regije muškaraca, te povezati pojedine genotipove HPV-a s lokalizacijom i kliničkim izgledom promjena kože i sluznice u genitalnoj regiji.

3.2 Specifični ciljevi

1. Korelirati klinički izgled i anatomsku lokalizaciju benignih anogenitalnih promjena s pojavom HPV genotipova visokog onkogenog rizika

2. Korelirati klinički izgled i anatomsku lokalizaciju benignih anogenitalnih promjena s pojavom HPV genotipova niskog onkogenog rizika

3. Usporediti osjetljivost i specifičnost dviju metoda za detekciju HPV genotipova u muškoj populaciji

4. Na temelju rezultata istraživanja odrediti što adekvatniju metodu za identifikaciju HPV genotipova u anogenitalnim lezijama muškaraca

4. Ispitanici i metode

Presječno unicentrično istraživanje provedeno je u Ambulanti za spolno prenosive bolesti i genitalne dermatoze Klinike za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ciljanu populaciju primjenjenog opservacijskog istraživanja čine muškarci stari 18 do 65 godina s jasnim kliničkim znakovima HPV genitalne infekcije u smislu verukoidnih, fibromatoidnih, papuloznih i hiperkeratotičnih šiljastih kondiloma. U istraživanje je uvršten susljedni uzorak svih muškaraca koji su tijekom razdoblja uključivanja primljeni u ambulantu radi liječenja kondiloma u anogenitalnoj regiji. Od strane svih ispitanika potpisan je informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju koji je prethodno odobren od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Ekskohleacijskom tehnikom, uz prethodnu primjenu lokalnog anestetika (lokalni pripravak 2,5 % prilokain i 2,5% lidokain, EMLA® krema), uziman je uzorak klinički promijenjene kože/sluznice genitalne regije ispitanika. Zbog potrebe za višestrukom laboratorijskom analizom – najmanje dvjema različitim metodama, kod svakog su ispitanika uzeta dva ekskohleata s iste anatomske regije ili je jedan veći kondilom bio razrezan na dva jednaka dijela. Oba ekskohleata su istoga dana potom poslana na laboratorijsku analizu u zasebnim epruvetama. Potom je za svakog ispitanika (n=70) iz jednog (od dva zasebno pohranjena) uzorka učinjen HPV genotipizacijski test INNO-LiPA (INNOGENETICS, Gent, Belgija) koji se bazira na principu reverzne hibridizacije sa ciljem identifikacije 32 različita HPV DNA tipa uključujući visokorizične i niskorizične. Tom se metodom amplificira fragment L1 gena koji se sastoji od 65 parova baza koristeći SPF10 primer. INNO-LiPA test učinjen je na uzorcima svih 70 ispitanika koliko je bilo uključeno u naše istraživanje.

S obzirom da INNO-LiPA metoda zbog svoje tehničke zahtjevnosti i cijene zasad nije u komercijalnoj primjeni nego se njome služi uglavnom u znanstveno-istraživačke svrhe, korelirali smo kod dijela uzoraka nalaz tog testa sa rezultatima dvaju nama dostupnih testova HPV detekcije. Prvi je komercijalni test Digene HC II HPV DNA Test (Qiagen, Njemačka) koji se osniva na hibridizaciji s amplifikacijom signala. Taj test još uvijek se primjenjuje za HPV detekciju kod žena u velikom broju zemalja iako se u novije vrijeme pomalo napušta i zamjenjuje PCR-om. Dostupna nam je bila još i in-house PCR metoda Bernard HU i sur (217).

Ovom in-house PCR metodom izolira se HPV DNA, a potom se izolirana DNA umnožava metodom lančane polimeraze pomoću četiri degenerativna grupno specifična oligonukleotida: MY09/MY11 koji umnožavaju dio gena L1 veličine 450 bp koji obuhvaća više od 50 različitih genotipova i GH20 i PC04 koji predstavljaju dio gena za ß-globin, veličine 268 bp koji se nalazi u svakoj ljudskoj stanici i koji zbog toga koristimo za kontrolu izolacije ukupne stanične DNA. (217)

Za razliku od INNO-LiPA-e, in-house PCR metoda kao i HC II (Digene) koriste se za detekciju HPV DNA te nisu genotipizacijske metode, što znači da njima ne dobijemo informaciju o HPV genotipu (ili više njih) nego samo potvrdu prisutnosti HPV DNA u uzorku.

4.1 Metode molekularne biologije za detekciju HPV DNA

Temelj hibridizacije je Watsonovo i Crickovo pravilo komplementarnosti dvaju lanaca DNA i istovjetno sparivanje purinskih i pirimidinskih baza. Naime, adenin se spaja s timinom, a guanin s citozinom. Veza između parova baza odnosno između dvostrukih lanaca DNA prekida se pri povećanim temperaturama (denaturacija), a ponovo se uspostavlja hlađenjem (renaturacija).

Za detekciju HPV se koriste brojne tehnički različite molekularne metode bazirane na hibridizaciji nukleinskih kiselina. Princip svih metoda je sparivanje, odnosno hibridizacija između komplementarnih predjela malih označenih dijelova nukleinskih kiselina nazvanih probe i ciljne DNA. Hibridizacija obuhvaća postupak denaturacije dvolančane DNA u jednolančanu i detekciju jednolančane DNA s obilježenim, komplementarnim probama DNA. Probe su obilježene s različitim radioaktivnim i neradioaktivnim markerima (biotin, digoksigenin). Čvrstoća vezanja između probe i ciljne DNA je ovisna od sukladnosti rasporeda oligonukleotida u oba lanca, i od uvjeta u kojima se odvija hibridizacija.
Postoji više vrsta hibridizacijskih metoda. Digene Hybrid Capture 2 je jedna od njih. Bazira se na tekućinskoj hibridizaciji s amplifikacijom signala.

4.1.1 Hybrid capture II (HC II) – Digene

Tekućinska hibridizacija je metoda na kojoj se temelji HC II test (Digene Laboratories, Silver Spring, SAD). Danas se koristi druga generacija ovog testa. Metoda se temelji na tekućinskoj hibridizaciji; naime, do hibridizacije ciljne DNA HPV s označenom RNA HPV

probom dolazi u tekućini. Nastali hibridizacijski kompleksi se vežu za stijenke epruvete koje su prekrivene protutijelima protiv hibrida RNA:DNA. Nakon ispiranja dodaju se protutijela protiv hibrida RNA:DNA označena s alkalnom fosfatazom, i kemiluminiscentan supstrat. Na svako protutijelo konjugirano je nekoliko molekula alkalne fosfataze. Ako se supstrat veže na alkalnu fosfatazu, emitira svjetlo koje se mjeri luminometrom.

Test omogućuje razlikovanje infekcije s genotipovima visokog rizika od infekcije s genotipovima niskog rizika, međutim, identifikacija pojedinog genotipa nije moguća. Tim testom obuhvaćeno je 13 genotipova visokog rizika (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) i 5 genotipova niskog rizika (6, 11, 42, 43, 44) (referenca). Ovim testom detektira se čak 1 pg DNA HPV/ml; njegova osjetljivost se gotovo može uspoređivati s PCR. Prednost ovog testa je relativno jednostavna izvedba i dobra reproducibilnost rezultata.

Princip testa je slijedeći: do hibridizacije ciljne DNA HPV s označenom RNA HPV probom dolazi u tekućini. Nastali hibridizacijski kompleksi vežu se za stijenke epruvete koje su prekrivene protutijelima protiv hibrida RNA:DNA. Nakon ispiranja dodaju se protutijela protiv hibrida RNA:DNA označena s alkalnom fosfatazom, i kemiluminiscentan supstrat. Na svako protutijelo konjugirano je nekoliko molekula alkalne fosfataze. Ako se supstrat veže na alkalnu fosfatazu, emitira svjetlo koje se mjeri luminometrom.
Test se sastojao od slijedećih faza:

- Denaturacija uzorka

Kod otvaranja novog testa reagensu za denaturaciju (NaOH 1x50 mL) dodaje se 5 kapi boje za indikaciju; tako pripremljen stabilan je 3 mjeseca na 2 - 8°C.

Svakom uzorku (i kontrolnim uzorcima) treba dodati ½ količine reagensa za denaturaciju (na 1 mL uzorka dodaje se ½ mL reagensa za denaturaciju); nakon vorteksiranja (5 sek.) svaki uzorak mora biti ljubičaste boje. Tako obrađeni uzorci inkubiraju se u vodenoj kupelji 45 minuta na 65°.

- Hibridizacija

Probama za HPV genotipove visokog rizika (proba B), ili za genotipove niskog rizika (proba A) dodaje se diluent u razrjeđenju 1:25.

Epruvete za hibridizaciju (po 8 ih je vezano zajedno) stave se u stalak za hibridizaciju; u svaku epruvetu ukapalo se 25 µL probe A ili probe B (mješavina genotipova niskog, odnosno, visokog rizika) i 75 µL denaturiranog uzorka i kontrole. Najprije se ukapava negativna kontrola (3 x), pa pozitivna kontrola (3 x), a zatim određenim redom uzorci. Nakon što se epruvete pokriju plate sealer-om (ljepljivom folijom) i na stalak stavi poklopac, miješaju se na rotary

shaker-u kod 1100 rpm 3 - 5 minuta. Uzorci promijene boju u žuto. Inkubiraju se u vodenoj kupelji 60 minuta na 65°C da se dovrši hibridizacija.

- Vezanje hibrida za dno mikropločice

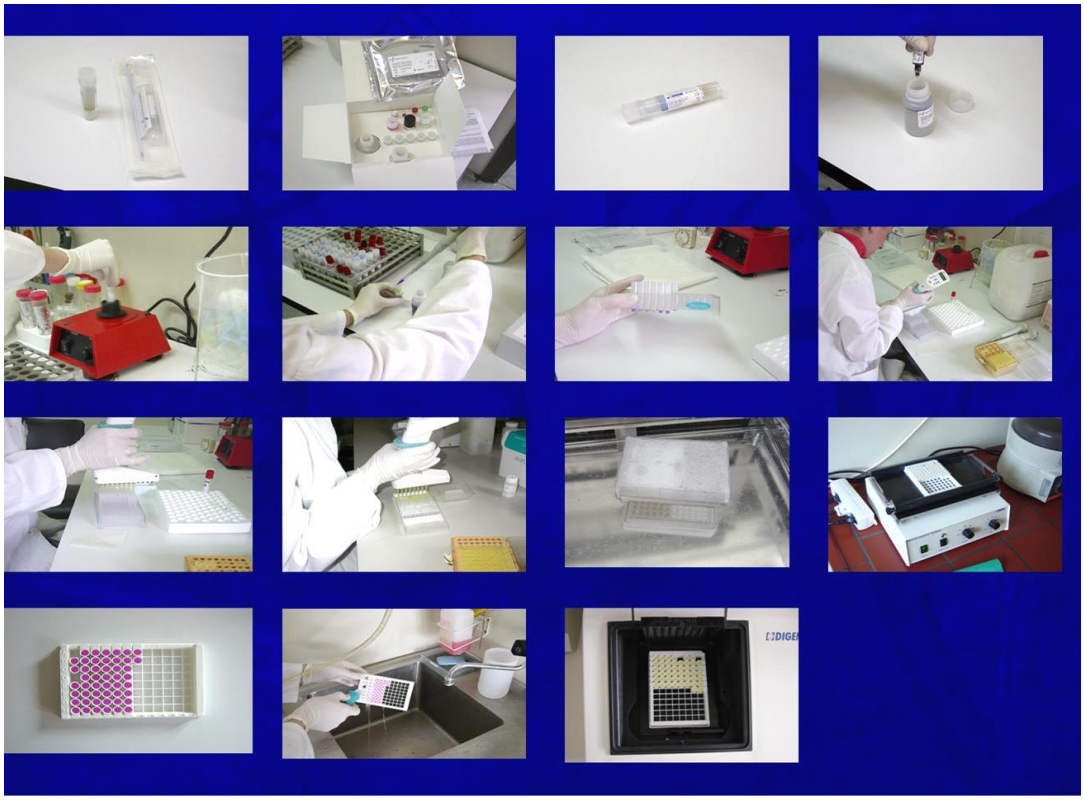
Na dno mikropločice vezana su anti RNA:DNA protutijela. Cijeli sadržaj iz hibridizacijskih epruveta prenosi se na mikropločicu 8 - kanalnim pipetorom. Zatim se mikropločica prekrije plate sealer-om i inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi tresući se pri 1100 rpm na shaker- u da bi se vezao hibrid RNA:DNA. Nakon toga se odstrani supernatant.

- Detekcija nastalog hibrida

Wash buffer (pufer za ispiranje) priprema se tako da se 100 mL koncentrata pomiješa s 3 L destilirane vode; tako razrijeđeni pufer stabilan je 3 mjeseca na 2 - 25°C. Reagensi za detekciju (1 i 2) priremaju se neposredno prije upotrebe. S obzirom da se reagensi dodaju 8 – kanalnom pipetom, potrebno je u kadicu odmjeriti točnu količinu reagensa prema broju uzoraka.

U svaku jažicu ukapa se 75 µL reagensa za detekciju 1 (alkalna fosfataza vezana na specifična protutijela protiv RNA:DNA hibrida), prekrije se parafinom i ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi (20-25°C). Nakon što se dekantira supernatant i mikropločica otrese na staničevinu, ispire se 6 puta puferom za ispiranje i osuši 5 minuta na staničevini. Zatim se dodaje 75 µL reagensa za detekciju 2 (kemiluminiscentan supstrat, CDP-Star s emeraldom II) u svaku jažicu, pokrije se parafinom i inkubira u mraku na sobnoj temperaturi.

Odmah po isteku inkubacije, rezultati se očitavaju na luminometru DML2000 koji mjeri "relativne jedinice svjetla" – RLU (prema engl. Relative Light Units) i dobivene rezultate uspoređuje sa srednjom vrijednosti pozitivne kontrole koristeći Digene system software. (216)



Slika 8. Postupak izvođenja Digene Hybrid Capture 2 testa

4.1.2 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

PCR je metoda in vitro sinteze nukleinskih kiselina kojom se specifični odsječak DNA može umnožiti u velikom broju kopija. PCR je vrlo osjetljiva metoda kojom se umnažanje može započeti od jedne molekule DNA. Osnovni princip testa je da svaki mikroorganizam posjeduje jedinstvenu DNA ili RNA "potpisnu sekvencu" koja se ponavljanim ciklusima sinteze oligonukleotidnog lanca umnožava do detekcijske razine.

Preduvjet umnažanja gena je poznavanje barem jednog dijela slijeda nukleotida ispitivanog gena. Zbog toga se odabiru početni oligonukleotidi DNA ("primeri", "klice") komplementarni s graničnim dijelovima poznatog slijeda DNA (ciljna DNA). Početni oligonukleotidi sparuju se sa suprotnim lancima ciljne DNA, a orijentirani su tako da se sinteza nove DNA odvija u regiji između njih.

Ukratko, metoda se izvodila tako da se mješavina genomske DNA pomiješa s pojedinačnim nukleotidima, parom početnih oligonukleotida, termostabilnom (Taq, Thermus aquaticus) DNA polimerazom te solima i deterdžentima određenih koncentracija. Takva se mješavina ciklički inkubira na točno određenim temperaturama. Nakon posljednjeg ciklusa

cjelokupna se reakcija zaustavlja hlađenjem na +4 °C. Svaki ciklus PCR udvostručava količinu ciljne DNA, a rezultat toga je eksponencijalno nakupljanje specifičnih ciljnih fragmenata. Metoda PCR se uspješno primjenjuje i za detekciju virusne DNA .

4.1.2.1 Izolacija DNA HPV za umnožavanje primerima MY09/ MY11

Izolacija se vrši iz originalnog transportnog medija. U sterilnu epruvetu za mikrocentrifugiranje od 1.5 mL stavi se 200 µL uzorka, 20 µL proteinaze K (800 µL/mL) i 2 µL Tween 20. Ova mješavina trese se najmanje 2 sata u termobloku na 55°C. Na taj način uništimo staničnu i jezgrinu membranu. Nakon toga inaktiviramo proteinazu K 10 --minutnim grijanjem uzorka u termobloku na 95°C. Tako obrađeni uzorak možemo čuvati 24 sata na +4°C ili duže na – 20°C.

4.1.2.2 Umnožavanje DNA HPV lančanom reakcijom polimeraze

Izoliranu DNA koju smo dobili obradom uzorka umnožavali smo lančanom reakcijom polimeraze. Za umnožavanje smo koristili 2 i degenerativna grupno specifična oligonukleotida, kao i unutarnju kontrolu:

- MY09 i MY11, koji umnožavaju dio gena L1 veličine 450 bp koji obuhvaća više od 50 različitih genotipova.

- GH20 i PC04; to je dio gena za ß-globin, veličine 268 bp koji se nalazi u svakoj ljudskoj stanici i koji zbog toga koristimo za kontrolu izolacije ukupne stanične DNA;
  naime, uspješno umnožena unutarnja kontrola pokazuje da je izolacija DNA bila uspješna i da u uzorku nema inhibitora PCR-a.

U sterilnu epruvetu se za svaki par začetnika otpipetirali smo oko 49.75 µL PCR mješavine (master mix) i 0.25 µL uzorka. Master mix sadrži: 200 mM dATP, dCTP, dGTP i d TTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 pmol svakog začetnika i 2.5 U enzima Taq polimeraze.

Umnažanje (amplifikacija) je učinjena u Perkin-Elmer 9600 aparatu. Termalni ciklusi za oligonukleotide MY09/11 bili su:

- inicijalna denaturacija 95°C 1 minuta 1 ciklus
- denaturacija 94°C - 15 sekundi
- sljepljivanje 50°C - 10 sekundi
- ekstenzija 72°C - 20 sekundi 40 ciklusa

Nakon zadnjeg ciklusa PCR slijedi inkubacija od 5 minuta na 72°C. Reakcijsku mješavinu smo držali na +4°C.

4.1.2.3 Detekcija produkata

Specifičnost produkata PCR reakcije određivali smo elektroforezom u gelu.
Gel (4%) se priprema na slijedeći način:

- u čašu dodamo 2 g metafor agaroze i 50 mL 1x TEA pufera te zagrijavamo do temperature vrelišta; otopinu ohladimo i tada dodajemo SYBR safe gel stain. To je fluorescentna boja koja se veže na dvolančanu DNA; pri izlaganju UV svjetlu SYBR safe gel stain vezan za dvolančanu DNA omogućuje vizualiziranje prisutne DNA.
    - stvrdnuti gel stavimo u kadu za elektroforezu i dodamo toliko 1x TEA pufera da pokrije gornju površinu gela.
    - u prvu jažicu dodamo molekularni marker. Upotrijebili smo molekularni marker od 100 bp.
    - u 5 µL produkta PCR dodamo 2 µL loading otopine. Ovu otopinu ukapamo u slijedeću jažicu.
    - elektroforeza u gelu odvija se na sobnoj temperaturi 1 – 2 sata pri naponu od 100 V.
    - nakon toga gel osvjetlimo na transluminatoru i snimimo polaroidnom kamerom

Prisutnost HPV DNA određujemo uspoređivanjem veličine produkta PCR, pozitivne kontrole i dijelova DNA koji sadrži molekularni marker.

4.1.3 INNO-LiPA

INNO-LiPA HPV genotipizacija je metoda koja se bazira na principu reverzne hibridizacije. Ukratko, dio L1 regije HPV genoma se amplificira pomoću početnica SPF10. Rezultat te amplifikacije su biotinilirani PCR produkti koji se potom denaturiraju i hibridiziraju sa specifičnim oligonukleotidnim probama. U INNO-Li testu se koriste nitrocelulozne membrane (test trakice) na kojima su hibridizirane DNA probe specifične za pojedine genotipove HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 73, 81, 82, 83 i 89). Sve probe su imobilizirane kao paralelne linije na nitroceluloznoj membrani, a obilježene su digoksigeninom. Nakon hibridizacije i ispiranja, dodaje se konjugacijska otopina (streptavidin obilježen alkalnom fosfatazom) koja se veže na svaki prethodno formirani biotinilirani hibrid.

Zatim se dodaju dvije supstratne otopine: BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) i NBT (nitro blue tetrazolium) u DMF (dimethylformamide) i inkubira se 30 minuta na 49°C uz njihanje u vodenoj kupelji. Otopina se ukloni, a razvijanje boje zaustavlja se ispiranjem traka destiliranom vodom.



Slika 9. Inkubacija u vodenoj kupelji

Boja nastaje kao posljedica djelovanja alkalne fosfataze na supstratnu otopinu, jer ona cijepa supstratnu otopinu, pa na nitroceluloznim membranama (test trakicama) nastaje ljubičasti precipitat tako da se rezultati mogu vizualno interpretirati.



Slika 10. Jažice sa probama imobiliziranim na nitroceluloznoj membrani

Amplifikacijski kit (INNO-LiPA HPV genotyping Extra Amp) standardiziran je za pripremu biotiniliranog amplificiranog materijala. Ovaj amplifikacijski kit bazira se na polimeraza lančanoj reakciji (PCR).

Amplifikacijski produkt se potom hibridizira koristeći nitroceluloznu membranu na kojoj je fiksirano 32 tipno specifičnih DNA proba i 4 kontrolne linije.

Genotipizacija metodom INNO-LiPA uključuje:

- Amplifikaciju ekstrahirane DNA
- Hibridizaciju amplificiranog produkta na nitroceluloznu membranu, nakon čega slijedi temeljito ispiranje
- Dodatak konjugata i supstrata što rezultira razvijanjem boje
- Vizualno očitavanje i interpretacija rezultata

(Dodatni par početnica za amplifikaciju humanog HLA-DBP1 gena dodaje se radi monitoriranja kvalitete uzorka i njegove ekstrakcije).

4.1.3.1 Očitavanje i interpretacija rezultata

Uzorak se smatra pozitivnim kada se pojavi jasno naznačena linija ljubičaste ili smeđe boje na kraju postupka. Trakica s linijama prikazuje položaj različitih oligonukleotidnih proba. Prva linija neposredno ispod linije markera je linija kontrole konjugata kojom se nadzire dodatak reaktivne otopine konjugata i supstrata u postupku detekcije. Ona treba uvijek biti pozitivna i morala bi biti istog intenziteta boje na svim trakicama u istoj testnoj seriji.
Druga linija je kontrola humane DNA kojom se kontrolira kvaliteta uzorka i efikasnost ekstrakcije. Ona također treba uvijek biti pozitivna, osim u slučaju kada je amplifikacija humane DNA onemogućena zbog velike količine HPV DNA u uzorku.
Uzorak se smatra pozitivnim ukoliko je najmanje jedna od tipno-specifičnih linija ili jedna od HPV kontrolnih linija pozitivna. Uvijek treba učiniti test pozitivne i negativne kontrole. Ukoliko se dobije pozitivna linija na liniji gdje je negativna kontrola, rezultati tog testa se zanemaruju i cijeli postupak je potrebno učiniti ispočetka.

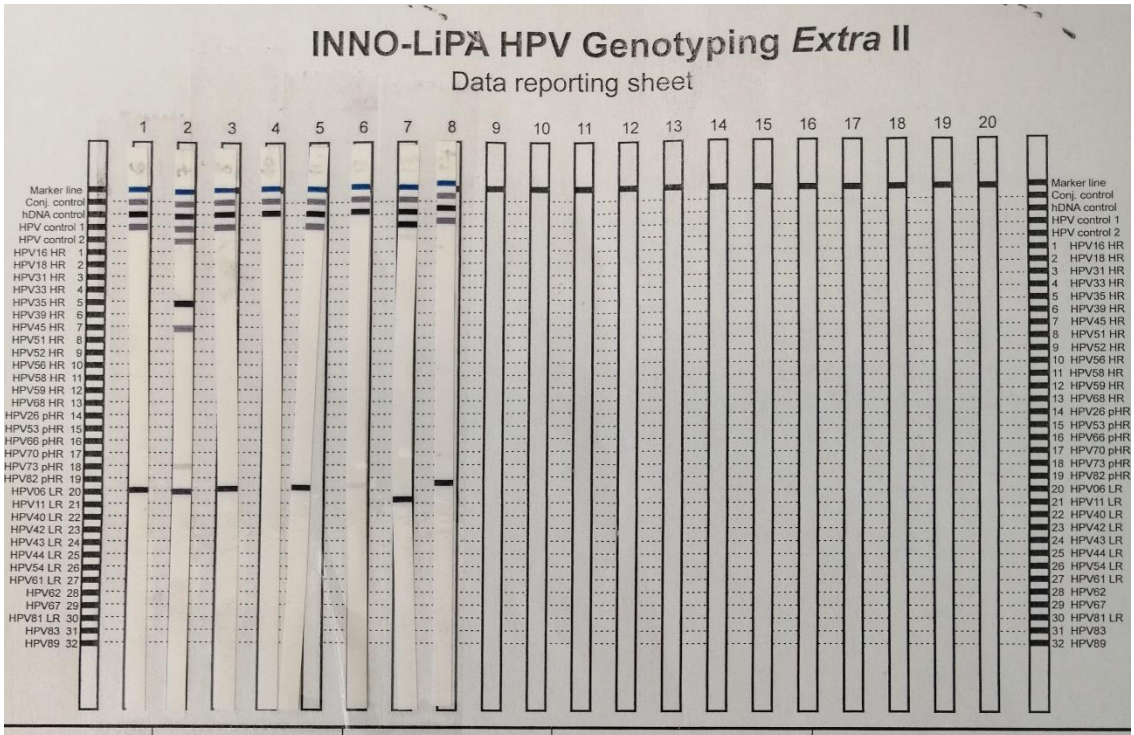


Slika 11. Vizualna interpretacija rezultata INNO-LiPA testa

Trakice se smiju očitavati isključivo kada su u potpunosti suhe. Uzorak se smatra pozitivnim ukoliko je najmanje jedna od tipno-specifičnih linija ili jedna od HPV kontrolnih linija pozitivna. Sve jasno pozitivne linije potom se ocjenjuju koristeći INNO-LiPA HPV Genotyping Extra interpretacijsku karticu koja je priložena uz kit. U toj kartici označene su sa "X" pozitivne linije za različite HPV tipove (kolumne). Na slici broj 12 može se vidjeti primjer dokumenta s očitanim rezultatima.

Svi HPV genotipovi koji imaju slabiju liniju za određeni genotip (u usporedbi s interpretacijskom karticom), moraju se označiti kao prisutni ili moguće prisutni u uzorku.
Moguće je da ja neki HPV tip prisutan u uzorku ukoliko su sve linije koje formiraju njegov specifični hibridizacijski uzorak već dio jednog ili multiplih specifičnih hibridizacijskih uzoraka drugih HPV tipova.

Uzorci kod kojih se dobije uzorak koji se ne može pripisati nijednom uzorku genotipa ili koji nema tipno-specifične linije (1-32) ali ima barem jednu liniju HPV kontrole pozitivnu, mora se označiti kao HPV pozitivan ali neidentificiran (HPVX).
Materijal kod kojeg se samo dio linijskog uzorka može pripisati jednom ili više specifičnih genotipova sadrži HPV X (neidentificirani HPV tip) kao i konkretne genotipove.
Kada se dobije reaktivnost na svim linijama takav nalaz se smatra neprikladnim za interpretaciju te se cijeli postupak mora ponoviti počevši od ekstrakcije DNA kod svih uzoraka koji imaju takav rezultat.



LiPA Strip	Sample ID	Reactive lines	Genotyping Result	Remarks
1 PCR –	6	CC, hDNA, HPVC1, 20	HPV 6 LR	
2 PCR –	7	CC, hDNA, HPVC1, HPVC2 5, 7, 20	HPV 35 HR, HPV 45 HR, HPV 6 LR	(18) HPV 73 pHR
3 PCR –	8	CC, hDNA, HPVC1, 20	HPV 6 LR	
4 PCR –	10	Ø	—	
5 PCR –	11	CC, hDNA, HPVC1, 20	HPV 6 LR	(20) HPV 6
6 PCR –	12	Ø	—	(20) HPV 6
7 PCR –	13	CC, hDNA, HPVC1, 21	HPV 11 LR	HPVC2, (20) HPV 6
8 PCR –	14	CC, hDNA, HPVC1, 20	HPV 6 LR	
9				

Slika 12. Očitavanje rezultata INNO-LiPA testa

4.1.3.2 Ograničenja procedure

INNO-LiPA genotipizacijska metoda ne razlikuje HPV69 i HPV71. Osim toga, INNO-LiPA Genotyping Extra ne razlikuje HPV tipove u koinfekciji kada je uzorak tog tipa već dio uzorka jednog ili više specifičnih hibridizacijskih uzoraka drugih HPV tipova (npr. HPV31+54 i HPV31; HPV33+54 i HPV33).

Miješane infekcije s 2 ili više HPV genotipova su česte. INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp kit koristi početnice koje amplificiraju sve genotipove simultano. Zbog PCR kompeticije

i odsutnosti pojedinih genotipova na trakici, moguće je da pojedini genotipovi prisutni kod miješanih infekcija ne budu detektirani. (157)

4.2 Statistička obrada

Statistička obrada provedena je u programskom paketu Statistica (TIBCO Software Inc. (2018). Statistica (data analysis software system), version 13. http://tibco.com.).

Razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05. U svim analizama koristili su se dvosmjerni (engl. two-tailed) testovi. Deskriptivne vrijednosti varijabli mjerenih nominalnom ili ordinalnom ljestvicom prikazane su kontingencijskim tablicama. Deskriptivne vrijednosti metričkih varijabli, tj. onih mjerenim intervalnom ili omjernom ljestvicom prikazane su kao srednja vrijednost (aritmetička sredina), standardna devijacija, medijan i interkvartilni raspon. Prije provođenja statističkih testova normalnost razdiobe potonjih varijabli ispitana je Shapiro-Wilkovim testom, nakon čega su u statističkoj analizi korišteni odgovarajući parametrijski odnosno neparametrijski testovi, kako je navedeno u poglavlju Rezultati.

Za kontinuirane varijable usporedbe dvaju skupina provedene su Mann Whitneyevim U testom a usporedbe više skupina Kruskal-Wallis ANOVA-om. Analize varijabli mjerenih nominalnom ljestvicom provedene su hi-kvadrat testom.

5. Rezultati

5.1 Opći pokazatelji i deskriptivne vrijednosti

U presječno opservacijsko istraživanje uvršteno je u razdoblju od ožujka do studenog 2017. godine ukupno 70 ispitanika muškog spola, starosti od 18 do 63 godine.

Tablica 1. –Deskriptivni podaci za dob bolesnika

	N	**M**	**-95% IP**	**+95% IP**	**Med**	**Min**	**Maks**	**DK**	**GK**	**SD**
Dob	70	32,06	29,79	34,33	30,50	18,00	63,00	24,00	39,00	9,51

* N = broj ispitanika; M = srednja vrijednost; -95% / +95% IP = intervali pouzdanosti; Med = medijan; Min/Maks = najmanja i naviša vrijednost; DK/GK = donji i gornji kvartil; SD = standardna devijacija

Deskriptivni podaci dobi ispitanika prikazani su u tablici 1.

Tablica 2. – Trajanje bolesti (kondiloma) [mj]

	N	**M**	**-95% IP**	**+95% IP**	**Med**	**Min**	**Maks**	**DK**	**GK**	**SD**
Trajanje	70	15,02	6,478	23,57	6,00	0,50	240,0	4,00	12,00	35,84

Raspon trajanja bolesti (kondiloma) u momentu kada su ispitanici uvršteni u studiju razmjerno je širok; uključujući trajanje od 2 tjedna do 20 godina zbog čega je medijan trajanja infekcije (odnosno pojave kondiloma) izražen u mjesecima bolji pokazatelj od srednje vrijednosti (tablica 2.).

Tablica 3. – Tip kondiloma prema kliničkoj prezentaciji

	N	**%**
fibromatoidni	4	5,71
ravni	8	11,43
papulozni	21	30,00
verukozni	37	52,86
Ukupno	**70**	**100,00**

S obzirom na precizniju kliničku klasifikaciju kondiloma, možemo razlikovati četiri osnovna tipa (iako niti jedna klasifikacija nije sasvim konzistentna i dovoljno obuhvatna): papulozni, verukozni, fibromatoidni i ravni. Među njima je iz tablice 3. vidljivo da su najbrojniji tip kondiloma verukozni (52,86%) i papulozni (30,00%), dok su ostala dva tipa znatno manje zastupljena. U tablici 3. prikazana je raspodjela kondiloma po tipu.

Tablica 4. – Lokalizacija kondiloma

	N	**%**
ingvinalno	1	1,43
sulkus koronarijus	1	1,43
skrotum	2	2,86
perianalno	4	5,71
unutrašnji list prepucija	9	12,86
pubično	10	14,29
korpus	19	27,14
radiks	24	34,29
Ukupno	**70**	**100,00**

U tablici 4. prikazana je raspodjela kondiloma po lokalizaciji.

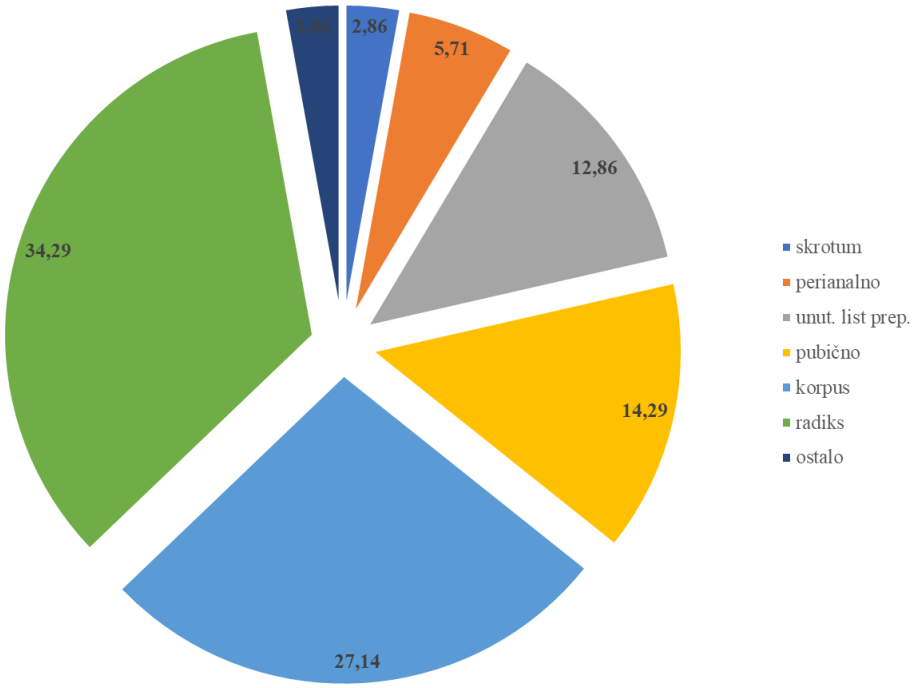
Osim kliničkog izgleda kondiloma, analizirana je i lokalizacija kondiloma kako je prikazano u tablici 4. Razvidno je iz tablice da je najčešća lokalizacija kondiloma u našem istraživanju radiks penisa (34,29%) i distalni dio korpusa penisa (27,14%).

Tablica 5. – Lokalizacija kondiloma

	N	**%**
radiks	24	34,29
skrotum	2	2,86
perianalno	4	5,71
unutrašnji list prepucija	9	12,86
pubično	10	14,29
korpus	19	27,14
ostalo	2	2,86
Ukupno	**70**	**100,00**

Udio kondiloma po njihovoj lokalizaciji prikazan je u tablici 5. Isti su rezultati prikazani grafički na slici broj 13.

S obzirom da su lokalizacije (u koronalnom sulkusu i ingvinalnoj regiji) zastupljene u po samo jednog ispitanika, u daljnjim analizama svrstane su zajedno u kategoriju “ostalo”.



Slika 13. Grafički prikaz lokalizacije kondiloma

Prisutnost HPV DNA VR ispitivana je pomoću dvije metode detekcije; Hybrid Capture II (Digene) kojom je obrađeno ukupno 40 uzoraka i polymerase chain reaction (PCR) kojom je obrađeno ukupno 50 uzoraka.

Tablica 6. – HC II (Digene) VR

	N	**%**
neg	22	55,00
poz	18	45,00
Ukupno	**40**	**100,00**

Rezultati HC II (Digene) VR metode prikazani su u tablici 6.

Tablica 7. – PCR

	N	**%**
neg	30	60,00
poz	20	40,00
Ukupno	**50**	**100,00**

Rezultati dobiveni korištenjem metode PCR prikazani su u tablici 7.

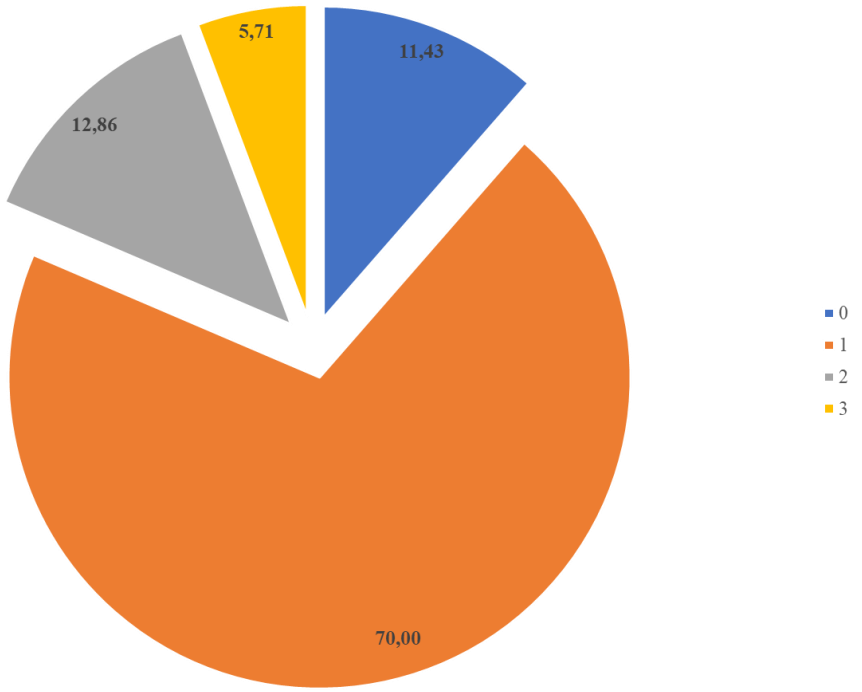
U svrhu HPV DNA tipizacije primijenjena je INNO-LiPA metoda na ukupno 70 uzoraka. Tom metodom utvrđen je konkretan HPV genotip ili više njih.

Tablica 8. – INNO-LiPA

(broj nađenih genotipova)

	N	**%**
0	8	11,43
1	49	70,00
2	9	12,86
3	4	5,71
Ukupno	**70**	**100,00**

Broj genotipova HPV verificiranih po pojedinom uzorku (ispitaniku) metodom INNO-LiPA prikazan je u tablici 8.. U tablici je prikazan je broj genotipova koji su dokazani. Pri tom je dio uzoraka imao negativan rezultat na HPV DNA (kategorija “0”; N=8). Od ukupno 8 ispitanika s negativnim rezultatom INNO-LiPA-e, kod šestorice se radilo o papuloznim kondilomima; a među njima su kod četvorice papulozni kondilomi bili lokalizirani na radiksu penisa. Međutim, u većini uzoraka pronađen je barem jedan genotip HPV-a. U najvećeg je broja ispitanika dokazan samo jedan genotip, dok je u 13 ispitanika (18,58 %) dokazana istovremena (ko)infekcija s dva, odnosno tri genotipa virusa. Jednostavni grafički prikaz rezultata iz tablice broj 8 vidljiv je i na slici broj 14.

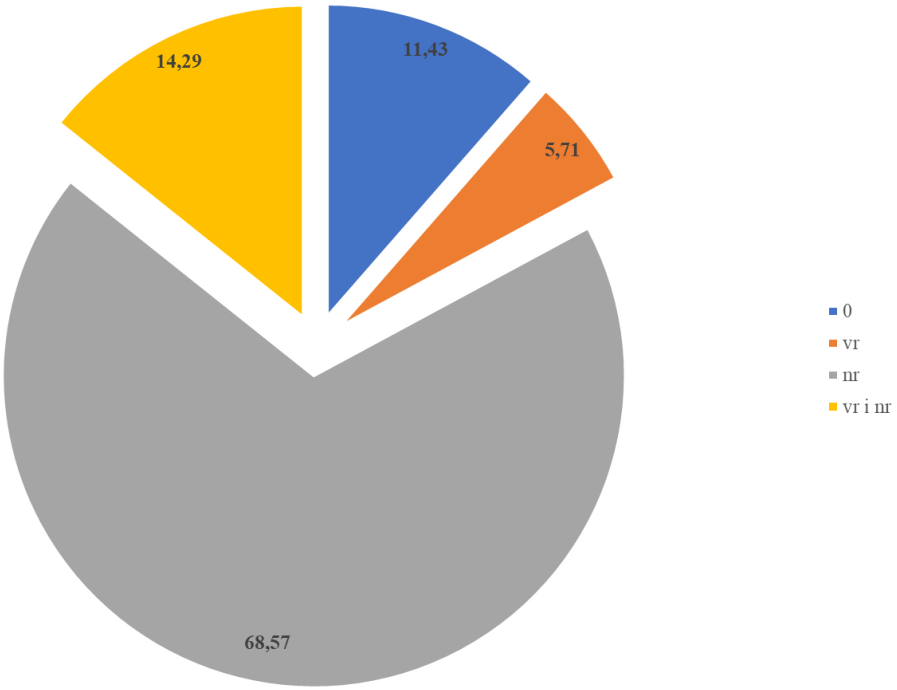


Slika 14. Grafički prikaz broja genotipova HPV verificiranih po pojedinom uzorku (ispitaniku) metodom INNO-LiPA

Tablica 9. – INNO-LiPA (visokorizični i niskorizični tipovi)

	N	**%**
0	8	11,43
VR	4	5,71
NR	48	68,57
VR i NR	10	14,29
Ukupno	**70**	**100,00**

U tablici 9. prikazan je tip virusa (niskorizični ili visokorizični) utvrđen INNO-LiPA metodom. Prisutnost visokorizičnog HPV genotipa utvrđena je u ukupno 14 ispitanika) (20,00%) kao jedini genotip virusa i u 10 ispitanika zajedno s virusima niskorizičnog genotipa (koinfekcija, odnosno miješana infekcija).



Slika 15. Visoko- i niskorizični genotipovi verificirani metodom INNO-LiPA

Na slici 15 dan je grafički prikaz udjela dobivenih rezultata prema vrsti HPV genotipova detektiranih u ispitanika našeg istraživanja.

Tablica 10. – Sve kombinacije HPV genotipova verificirane metodom INNO-LiPA

	N	**%**
HPV6, HPV59	1	1,43
HPV16, HPV66	1	1,43
HPV6, HPV58	1	1,43
HPV52, HPV6	1	1,43
HPV53, HPV66, HPV61	1	1,43
HPV6, HPV66	1	1,43
HPV6, HPV81	1	1,43
HPV58, HPV82, HPV6	1	1,43
HPV6, HPV52	1	1,43
HPV6, HPV16, HPV18	1	1,43
HPV35, HPV45, HPV6	1	1,43
HPV16	2	2,86
HPV18, HPV6	2	2,86
HPV11	3	4,29
Negativan	8	11,43
HPV6	44	62,86
Ukupno	**70**	**100,00**

Tablica 10. prikazuje sve kombinacije HPV genotipova koje su INNO-LiPA metodom pronađene u istraživanju. Od ukupno obrađenih 70 uzorka, u 8 ispitanika nalaz je bio negativan na HPV DNA, što znači da virus nije dokazan. Iz toga slijedi da je pozitivan nalaz INNO-LiPA metodom utvrđen u ukupno 62 ispitanika.

Tablica 11. – INNO-LiPA

(raspodjela genotipova)

	N	**%**
HPV35	1	1,3
HPV45	1	1,3
HPV53	1	1,3
HPV59	1	1,3
HPV61	1	1,3
HPV81	1	1,3
HPV82	1	1,3
HPV52	2	2,5
HPV58	2	2,5
HPV11	3	3,8
HPV18	3	3,8
HPV66	3	3,8
HPV16	4	5,1
HPV6	55	69,6
Ukupno	**79**	**100,0**

S obzirom da je u nekih ispitanika pronađeno više od jednog genotipa HPV-a, ukupan broj pronađenih individualnih genotipova je 79. Tablica 11. prikazuje raspodjelu tih genotipova (N=79) u ispitanika koji su imali pozitivan nalaz (N=62). Rezultati zapravo pokazuju distribuciju HPV genotipova u promatranoj populaciji.

5.2 Povezanost tipa i lokalizacije kondiloma s drugim parametrima

Tablica 12. – Srednja dob [g] ispitanika prema lokalizaciji kondiloma

Lokalizacija	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95 % IP**	**DK**	**Med**	**GK**
unutrašnji list prepucija	27,33	9	5,96	22,75	31,91	25,00	27,00	31,00
korpus penisa	30,37	19	8,75	26,15	34,59	24,00	27,00	36,00
perianalno	44,00	4	17,53	16,10	71,90	29,50	44,00	58,50
radiks penisa	32,17	24	9,44	28,18	36,15	24,00	30,50	41,50
pubično	33,20	10	8,65	27,01	39,39	26,00	34,50	42,00
skrotum	38,50	2	3,54	6,73	70,27	36,00	38,50	41,00
ostalo	32,00	2	1,41	19,29	44,71	31,00	32,00	33,00

p = 0,378; Kruskal-Wallis ANOVA

Tablica 12. prikazuje distribuciju srednje dobi ispitanika prema lokalizaciji kondiloma.

Može se uočiti niža srednja dob ispitanika s kondilomima u predjelu unutrašnjeg lista prepucija.

Tablica 13. – Srednje trajanje [mj] bolesti prema lokalizaciji kondiloma

Lokalizacija	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
unutrašnji list prepucija	4,78	9	2,17	3,11	6,44	4,00	5,00	6,00
skrotum	120,38	2	169,18	-1399,60	1640,35	0,75	120,38	240,00
radiks penisa	10,23	24	14,84	3,96	16,49	3,50	6,00	8,50
pubično	11,80	10	13,15	2,40	21,20	6,00	7,00	12,00
perianalno	15,00	4	10,39	-1,54	31,54	6,00	15,00	24,00
korpus penisa	17,39	19	40,15	-1,96	36,74	3,00	8,00	12,00
ostalo	7,00	2	1,41	-5,71	19,71	6,00	7,00	8,00

p = 0,433; Kruskal-Wallis ANOVA

U tablici 13. prikazani su rezultati srednjeg trajanja bolesti izraženo u mjesecima prema lokalizaciji kondiloma.

Tablica 14. – Srednja dob [g] ispitanika prema tipu kondiloma

Tip	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
ravni	29,88	8	8,44	22,82	36,93	22,50	28,50	37,50
verukozni	31,11	37	9,52	27,94	34,28	24,00	27,00	35,00
fibromatoidni	33,75	4	10,14	17,61	49,89	25,00	34,00	42,50
papulozni	34,24	21	9,98	29,69	38,78	26,00	34,00	41,00

p = 0,531; Kruskal-Wallis ANOVA

U tablici 14. prikazana je distribucija srednje dobi ispitanika prema tipu kondiloma.

Tablica 15. – Srednja trajanje [mj] bolesti prema tipu kondiloma

Tip	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
fibromatoidni	4,75	4	2,75	0,37	9,13	2,50	4,50	7,00
ravni	5,50	8	2,14	3,71	7,29	4,00	5,00	7,00
verukozni	14,43	37	30,84	4,15	24,72	3,00	6,00	12,00
papulozni	21,65	21	51,12	-1,61	44,92	6,00	8,00	12,00

p = 0,314; Kruskal-Wallis ANOVA

Tablica 15. prikazuje rezultate srednjeg trajanja bolesti izraženo u mjesecima prema tipu kondiloma. Uočljivo je kraće srednje trajanje bolesti kod fibromatoidnih i ravnih kondiloma u odnosu na ostale tipove kondiloma.

Tablica 16. – Broj genotipova prema tipu kondiloma

Tip	**M**	**N**	**SD**	**DK**	**Med**	**GK**
papulozni	0,90	21	0,77	0,00	1,00	1,00
verukozni	1,14	37	0,42	1,00	1,00	1,00
fibromatoidni	1,25	4	0,50	1,00	1,00	1,50
ravni	1,63	8	1,19	1,00	1,00	3,00

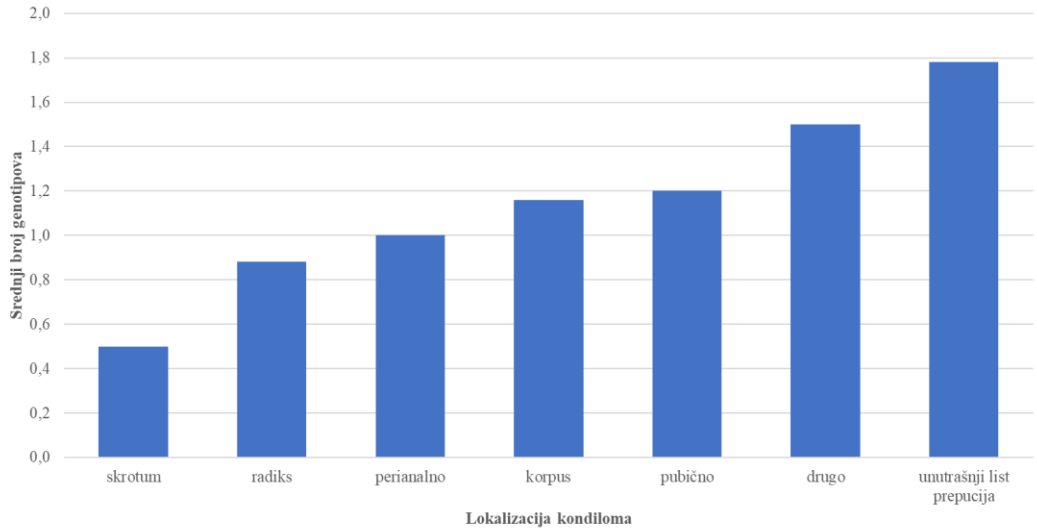
p = 0,162; Kruskal-Wallis ANOVA

U tablici 16. vidljiv je veći broj genotipova kod ravnih kondiloma nego kod papuloznih kondiloma.

Tablica 17. – Broj genotipova prema lokalizaciji kondiloma

Tip	M	N	SD	DK	Med	GK
skrotum	0,50	2	0,71	0,00	0,50	1,00
radiks penisa	0,88	24	0,45	1,00	1,00	1,00
perianalno	1,00	4	0,82	0,50	1,00	1,50
korpus penisa	1,16	19	0,50	1,00	1,00	1,00
pubično	1,20	10	0,79	1,00	1,00	1,00
unutrašnji list prepucija	1,78	9	0,97	1,00	1,00	3,00
ostalo	1,50	92	0,71	1,00	1,50	2,00

p = 0,061; Kruskal-Wallis ANOVA



Slika 16. Broj genotipova prema lokalizaciji kondiloma

Tablica 17. i slika 16. prikazuju broj genotipova prema lokalizaciji kondiloma. Pri tom je uočljiv veći broj genotipova kod kondiloma lokaliziranih na unutrašnjem listu prepucija.

Tablica 18. – Distribucija tipova kondiloma prema genotipu HPV

	Tip	neg	NR	NR	NR i VR	**Ukupno**
N	ravni	1	1	4	2	8
%		12,50%	12,50%	50,00%	25,00%	
N	papulozni	6	1	11	3	21
%		28,57%	4,76%	52,38%	14,29%	
N	verukozni	1	2	30	4	37
%		2,70%	5,41%	81,08%	10,81%	
N	fibromatoidni	0	0	3	1	4
%		0,00%	0,00%	75,00%	25,00%	
N	**Ukupno**	8	4	48	10	70

p = 0,182; hi-kvadrat test

U tablici 18. prikazana je distribucija tipova kondiloma prema genotipu HPV-a ovisno o tome je li utvrđen niskorizični, visokorizični ili miješana infekcija niskorizičnim i visokorizičnim HPV genotipovima, odnosno negativan nalaz na HPV DNA.

Tablica 19. – Tip kondiloma prema genotipu HPV

	Tip	VR	NR	**Ukupno**
N	ravni	3	4	**7**
%		42,86%	57,14%	
N	papulozni	4	11	**15**
%		26,67%	73,33%	
N	verukozni	6	30	**36**
%		16,67%	83,33%	
N	fibromatoidni	1	3	**4**
%		25,00%	75,00%	
N	**Ukupno**	**14**	**48**	**62**

p = 0,471; hi-kvadrat

U tablici 19. prikazan je tip kondiloma prema tipu rizika HPV. Može se primjetiti veći udio visokorizičnih genotipova kod ravnih kondiloma u odnosu na ostale tipove kondiloma.

Tablica 20. – Lokalizacija kondiloma prema genotipu HPV

	Lokalizacija	Neg	VR	NR	NR i VR	**Ukupno**
N	unutrašnji list prepucija	0	0	5	4	9
%		0,00%	0,00%	55,56%	44,44%	
N	korpus penisa	1	2	13	3	19
%		5,26%	10,53 %	68,42%	15,79%	
N	perianalno	1	0	2	1	4
%		25,00 %	0,00%	50,00%	25,00%	
N	pubično	1	1	7	1	10
%		10,00 %	10,00 %	70,00%	10,00%	
N	radiks penisa	4	1	18	1	24
%		16,67 %	4,17%	75,00%	4,17%	
N	skrotum	1	0	1	0	2
%		50,00 %	0,00%	50,00%	0,00%	
N	ostalo	0	0	2	0	2
%		0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	
N	**Ukupno**	8	4	48	10	70

p = 0,498; hi-kvadrat test

U tablici 20. prikazana je lokalizacija kondiloma prema HPV genotipu.

Tablica 21. – Lokalizacija kondiloma prema tipu rizika HPV

	Lokalizacija	VR	NR	**Ukupno**
N	radiks penisa	2	18	**20**
%		10,00%	90,00%	
N	pubično	2	7	**9**
%		22,22%	77,78%	
N	perianalno	1	2	**3**
%		33,33%	66,67%	
N	skrotum	0	1	**1**
%		0,00%	100,00%	
N	unutrašnji list prepucija	4	5	**9**
%		44,44%	55,56%	
N	korpus penisa	5	13	**18**
%		27,78%	72,22%	
N	ostalo	0	2	**2**
%		0,00%	100,00%	
N	**Ukupno**	**14**	**48**	**62**

p = 0,466; hi-kvadrat

U tablici 21. prikazana je lokalizacija kondiloma prema prema tipu rizika HPV. Pri tom je na unutrašnjem listu prepucija uočljiv veći udio visokorizičnih HPV genotipova nego na ostalim lokalizacijama.

Dodatno je na raspolaganju bila informacija o postojanju anogenitalne HPV infekcije (ispunjen barem jedan od kriterija: klinički izražena bolest (kondilomi) i/ili pozitivan HPV test)kod nerice ili partnera ispitanika. Rezultati su prikazani u tablicama 22. , 23. i 24.

Tablica 22. – HPV infekcija u partnera/ice (kondilomi ili pozitivan nalaz HPV testa)

	N	**%**
ne	50	71,43
da	20	28,57
Ukupno	**70**	**100,00**

Tablica 23. – Tip kondiloma prema HPV pozitivnosti partnera/ice

	Tip kondiloma	Partner -	Partner +	**Ukupno**
N	ravni	5	3	8
%		62,50%	37,50%	
N	papulozni	15	6	21
%		71,43%	28,57%	
N	verukozni	27	10	37
%		72,97%	27,03%	
N	fibromatoidni	3	1	4
%		75,00%	25,00%	
N	**Ukupno**	50	20	70

p = 0,944; hi-kvadrat test

U tablici 23. prikazan je tip kondiloma u odnosu na poznati HPV status partnera/-ice.

Tablica 24. – Lokalizacija kondiloma prema HPV pozitivnosti partnera/ice

	Lokalizacija	Partner -	Partner +	**Ukupno**
N	unutrašnji list prepucija	8	1	9
%		88,89%	11,11%	
N	korpus penisa	11	8	19
%		57,89%	42,11%	
N	perianalno	4	0	4
%		100,00%	0,00%	
N	pubično	7	3	10
%		70,00%	30,00%	
N	radiks penisa	18	6	24
%		75,00%	25,00%	
N	skrotum	1	1	2
%		50,00%	50,00%	
N	ostalo	1	1	2
%		50,00%	11,11%	
N	**Ukupno**	50	20	70

p = 0,456; hi-kvadrat test

Tablica 24. prikazuje lokalizaciju kondiloma prema poznatom HPV statusu partnera/-ice.

Tablica 25. – Odnos rezultata dobivenih metodama HC II (Digene) VR i PCR

	HC II VR	PCR -	PCR +	**Ukupno**
N	-	0	11	11
%		0,00%	100,00%	
N	+	0	9	9
%		0,00%	100,00%	
Ukupno		0	20	20

Tablica 26. – Odnos rezultata dobivenih metodama HC II (Digene) VR i PCR

	PCR	HC II VR -	HC II VR +	**Ukupno**
N	-	0	0	0
%		0,00%	0,00%	
N	+	11	9	20
%		55,00%	45,00%	
Ukupno		11	9	20

Tablice 25. i 26. prikazuju odnos pozitivnih i negativnih rezultata dobivenih metodama HC II VR odnosno PCR. Radi se o istim podacima prikazanima na dva različita načina, radi bolje preglednosti. Iz druge tablice je vidljivo da su ispitanici koji su imali pozitivni rezultat testom PCR imali podjednaku šansu (55%/45%) imati ili pozitivan ili negativan rezultat metodom Digene VR.

Tablica 27. – Odnos rezultata dobivenih metodama HC II (Digene) VR i INNO-LiPA

		INNO-LiPA				
	HC II VR	0 genotipova	1 genotip	2 genotipa	3 genotipa	**Ukupno**
N	-	3	15	3	1	22
%		13,64%	68,18%	13,64%	4,55%	
N	+	0	13	4	1	18
%		0,00%	72,22%	22,22%	5,56%	
Ukupno		3	28	7	2	40

Tablica 28. – Odnos rezultata dobivenih metodama PCR i INNO-LiPA

		INNO-LiPA				
	PCR	0 genotipova	1 genotip	2 genotipa	3 genotipa	**Ukupno**
N	-	5	21	2	2	30
%		16,67%	70,00%	6,67%	6,67%	
N	+	0	14	5	1	20
%		0,00%	70,00%	25,00%	5,00%	
Ukupno		5	35	7	3	50

Tablice 27. i 28. prikazuju odnos rezultata dobivenih metodom HC II (Digene) VR odnosno PCR i rezultata dobivenih metodom INNO-LiPA. Smatramo li metodu INNO-LiPA referentnom, može se uočiti da i HC II VR i PCR prepoznaju podjednako mali broj istinski pozitivnih uzoraka kao pozitivne – 18/40 = 45% za HC II VR odnosno 20/50 = 40% za PCR.

5.3 „Alternativno“ grupiranje rezultata

Prema lokalizaciji, kondilome je moguće podijeliti i na druge načine osim načina koji je već izložen u prvom dijelu rezultata. To uključuje podjelu na genitalnu i ekstragenitalnu odnosno na proksimalnu i distalnu genitalnu regiju, kako je prikazano u tablicama koje slijede.

U kategoriju genitalne regije ubrajaju se kondilomi lokalizirani na radiksu, korpusu, unutrašnjem licu prepucija i sulkusu koronarijusu. Ekstragenitalnu kategoriju čini kondilomi u pubičnoj, ingvinalnoj, skrotalnoj i perianalnoj regiji. Kategoriju proksimalne regije čine kondilomi lokalizirani pubično, ingvinalno, skrotalno, perianalno te na radiksu penisa. Kategorija distalne regije podrazumijeva kondilome korpusa penisa, unutrašnjeg lista prepucija i sulkusa koronarijusa.

U ovom dijelu disertacije bit će prikazani podaci s pripadajućom tablicom i grafikonom za koje su dobiveni statistički značajni rezultati, a na temelju kojih su izvedeni konkretni zaključci te dani prijedlozi za postupanje (detaljnije u Raspravi i Zaključcima). Svi ostali rezultati dobiveni pregrupiranjem na gore opisan način nalaze se u Prilogu.

Tablica 29. – Broj genotipova prema lokalizaciji kondiloma **[P/D]**

Tip	**M**	**N**	**SD**	**DK**	**Med**	**GK**
D	1,38	29	0,73	1,00	1,00	2,00
P	0,95	41	0,59	1,00	1,00	1,00

p = 0,032; Mann Whitney U test

Iz tablice 29. vidljiv je značajno veći broj HPV genotipova u distalnoj genitalnoj regiji u odnosu na proksimalnu genitalnu regiju.

6. Rasprava

Unatoč velikoj znanstvenoj aktivnosti u području humanog papiloma virusa, relativno je malo istraživanja koja se bave muškom populacijom u kontekstu ubikvitarne infekcije s dobro opisanim posljedicama koje HPV ima na muško zdravlje i reproduktivni sustav. Osim nedvojbene uloge muškaraca u transmisiji bolesti, s vremenom se proširuje i znanje o biološkim aspektima infekcije u muškaraca, što je osobito važno radi ispravnog prepoznavanja, pravovremenog liječenja i prevencije kojoj težimo, a u koju je, sukladno objektivnim pokazateljima, neminovno uračunati i osobe muškog spola. Da bismo razumjeli sve aspekte anogenitalne infekcije HPV-om kod muškaraca i mogli te iste spoznaje inkorporirati u dijagnostičke, kurativne i preventivne algoritme, potrebna su klinička istraživanja na reprezentativnom uzorku muške populacije. S obzirom da trenutno u svijetu, pa tako ni kod nas, ne postoje standardizirani dijagnostički postupci u zbrinjavanju anogenitalne infekcije muškaraca, postoji realna potreba za izučavanjem i korelacijom kliničkih i laboratorijskih parametara koji bi nam bili korisni i široko dostupni u dijagnosticiranju i planiranju liječenja ove vrlo česte infekcije čija prevalencija doseže i do 72%. (74, 77)

U našoj studiji istraženo je više parametara kod muškaraca s klinički manifestnom bolesti. S kliničkog stajališta značajnije su informacije o prevalenciji pojedinih genotipova u klinički manifestnim lezijama, kako radi mogućnosti donošenja zaključaka o očekivanom tijeku bolesti, tako i o daljnjoj dijagnostičkoj obradi, praćenju i liječenju. Pri tom je poznavanje zastupljenosti pojedinih genotipova u lezijama uzrokovanima HPV-om važno i radi donošenja nacionalnih strategija i planiranja preventivnog, a u budućnosti potencijalno i kurativnog cjepiva. Osim displastičnih lezija koji su zbog svog onkogenog potencijala u fokusu većine istraživanja, ne smije se zanemariti niti troškove liječenja benignih lezija kao niti njihove psihosocijalne i biološke reperkusije na pojedinca i društvo osobito kada se uzme u obzir da se radi o najčešćoj virusnoj spolno prenosivoj infekciji. Podsjetimo se da su kondilomi visoko infekciozni, udruženi s nelagodom, boli, krvarenjem i/ili svrbežom, sklonosti recidivima, potencijalno udruženi s povećanim rizikom za akviziciju HIV infekcije (i ostalih spolno prenosivih infekcija), a procjene troškova njihova liječenja u Sjedinjenim američkim državama dosežu i 200 milijuna američkih dolara na godišnjoj razini. (218)

Na temelju postavljenih premisa i naših rezultata smatramo da je ovo presječno opservacijsko istraživanje posebno po tome što su komparirane tri metode laboratorijske

dijagnostike (Hybrid Capture II, in-house PCR i INNO-LiPA) te su korelirane kliničke odrednice (tip i lokalizacija kondiloma, dob bolesnika, trajanje bolesti) s HPV genotipom.

6.1 Kliničke odrednice anogenitalne infekcije u istraživanju

Od malobrojnih postojećih studija na muškarcima sa klinički manifestnom infekcijom HPV-om u anogenitalnoj regiji rijetke se uopće bave opisom kliničkog izgleda, odnosno tipa kondiloma. Pri tom valja napomenuti da i među njima postoje razlike u opisu, odnosno u nomenklaturi zbog čega ih je gotovo nemoguće međusobno uspoređivati te izvoditi zaključke koji bi potencijalno bili korisni ili primjenjivi u svakodnevnom kliničkom i/ili istraživačkom radu. Razlozi za takvu disonantnost leže u činjenici da ne postoje univerzalni klinički kriteriji za dijagnosticiranje infekcije humanim papilloma virusom. S druge strane nije opravdano niti potrebno rutinski raditi biopsiju koja je invazivna metoda i patohistološku analizu koja značajno poskupljuje i prolongira dijagnostički postupak za postavljanje dijagnoze svake pojedine lezije. Korisnost patohistološke analize bazira se na potvrdi dijagnoze, te se stoga u svakodnevnom radu oslanjamo primarno na iskustvo kliničara i na cjelokupnu anamnezu i fizikalni pregled. Metode molekularne dijagnostike u klinički jasnim slučajevima nisu potrebne za postavljanje dijagnoze a njihova primjena u muškoj populaciji limitirana je, između ostalog, nedostatkom „kitova“ za primjenu na vanjskom genitalu kao i konsenzusa oko potrebe dijagnosticiranja i liječenja asimptomatskih anogenitalnih HPV infekcija.

U naše istraživanje bili su uvršteni muškarci s klinički manifestnom anogenitalnom HPV infekcijom starosti od 18 do 63 godine (tablica 1.), s razmjerno širokim rasponom trajanja bolesti od pojave prvih simptoma do momenta u kojem su potražili stručnu pomoć i liječenje koji se kretao od dva tjedna do dvadeset godina (tablica 2.). Pri tom je medijan trajanja bolesti iznosio 15 mjeseci, što približno odgovara podacima iz švedske studije u koju su uvrštena ukupno 303 muškarca sa rasponom trajanja bolesti od 1 do 180 mjeseci i medijanom trajanja bolesti koji je iznosio 18 mjeseci. (219)

Prema tipu kondiloma (tablica 3.) razlikovali smo ukupno četiri vrste kondiloma: fibromatoidne, papulozne, verukozne i ravne, pri čemu su najzastupljeniji bili verukozni (52.86%) i papulozni (30.0%). Među iznimno rijetkim studijama koje su dale opis kondiloma ističe se i prethodno spomenuta švedska studija u kojoj su razlikovani na makroskopskoj razini šiljasti, papulozni, makulozni i kondilomi nalik seborejičkim keratozama te su kod neobrezanih muškaraca (91% ispitanika) šiljasti kondilomi bili prisutni u 41% a papulozni u 35%, sa sličnim

udjelima šiljastih (45%) i papuloznih (27%) kondiloma kod obrezanih muškaraca (ukupno 9% ispitanika) dok su ostali tipovi detektirani znatno rjeđe. (219)

6.2 Distribucija kondiloma prema lokalizaciji

Sukladno našim rezultatima distribucija kondiloma prema lokalizaciji (tablica 4.), vidljivo je da su najčešće lokalizacije kondiloma bile radiks penisa (34.29%) i korpus penisa (27.14%). Slijede zatim pubična regija (14.29%) te unutrašnji list prepucija (12.86%) dok su ostale lokalizacije bile su zastupljene znatno rjeđe. Iako nije strogo pravilo, kod neobrezanih muškaraca najčešće lokalizacije kondiloma su unutrašnji list prepucija, frenulum i sulcus coronarius, dok su kod obrezanih muškaraca kondilomi najčešće smješteni na corpusu penisa. Imajući na umu da su u našoj studiji svi muškarci bili neobrezani, razvidno je da naši podaci o distribuciji kondiloma prema lokalizaciji u tom kontekstu pomalo odstupaju od očekivanja. Konkretno, iz frenuluma nije evidentiran nijedan slučaj kondiloma, dok je u sulkusu koronarijusu kondilom utvrđen u svega jednog ispitanika, a na unutrašnjem listu prepucija ukupno je nađeno devet (12,9%) kondiloma. Za usporedbu, u švedskoj studiji 91% ispitanika nisu bili obrezani, a među njima distribucija kondiloma bila je sljedeća: korpus penisa (33%), pubična regija (29%) i prepucij (27%). (219)

Sukladno našim daljnjim rezultatima distribucije kondiloma prema lokalizaciji (tablica 30. i 31. u Prilogu), grupirani su kondilomi prema regijama na genitalnu (76%) i ekstragenitalnu (24%), te na proksimalnu (41%) i distalnu (59%) genitalnu regiju. Pregledom literature nije pronađena slična podjela čiji smisao se sastoji u smanjenju broja podskupina i posljedičnoj disperziji rezultata. Time je omogućena preglednija analiza dobivenih rezultata, osobito ako se uzme u obzir da su kondilomi na pojedinim lokalizacijama utvrđeni kod vrlo malog broja ispitanika, ili čak u izoliranim slučajevima.

6.3 Laboratorijske metode molekularne dijagnostike HPV-a

U naše je istraživanje uvršteno ukupno 70 ispitanika muškog spola kod kojih je prilikom prvog pregleda u Ambulanti za spolno prenosive infekcije i genitalne dermatoze dijagnoza postavljena na osnovu anamneze i kliničkog izgleda kondiloma anogenitalne regije od strane dva specijalista dermatovenerologa koji su se složili oko kliničke dijagnoze. Svim ispitanicima po tom je učinjena genotipizacija primjenom INNO-LiPA metode iz ekskholeata kondiloma,

čime je dijagnoza HPV anogenitalne infekcije konkretnim HPV genotipom ili više njih potvrđena u 88,6%, što je usporedivo sa švedskom studijom na muškarcima sa manifestnom HPV anogenitalnom infekcijom u kojoj je HPV potvrđen u 92% ispitanika. (219)

Dodatno su uzorci bili analizirani sa dvije druge laboratorijske metode; HC II kojim su testirani uzorci ukupno 40 ispitanika uvrštenih u istraživanje, te in-house PCR test kojim su testirani uzorci ukupno 50 ispitanika iz studije. Pri tom su uzorci svakog od ispitanika obrađeni sa (najmanje) dvije različite laboratorijske metode od kojih je jedna uvijek bila INNO-LiPA a druge metoda je bila HC II ili in-house PCR. Kod ukupno 20 ispitanika uključenih u naše istraživanje učinjena su sva tri testa – INNO-LiPA, HC II i in-house PCR. Od triju navedenih metoda, samo INNO-LiPA metodom moguće je utvrditi konkretan genotip ili više njih, što nije slučaj kod Hybrid Capture II ili in house-PCR metode koje mogu samo detektirati prisutnost HPV-a visokorizičnog ili niskorizičnog genotipa u uzorku.

Konkordantnost rezultata detekcijskih metoda (HC II i PCR) u dijelu uzoraka koji su testirani s obje metode u našem istraživanju analizirana je u tablicama 25. i 26.. Interesantan rezultat koji se može iščitati iz njih je da je svega 45% PCR pozitivnih rezultata ujedno bilo pozitivno i u HC II (Digene) testu, dok je preostalih 55% pozitivnih u PCR-u imalo u HC II testu negativan rezultat.

Iz tablica 6. i 7. uočljiv je veliki udio negativnih rezultata na uzorcima obrađenima sa HC II (55%) i PCR metodom (60%). Za razliku od tih metoda, HPV tipizacija metodom INNO-LiPA bila je negativna u 11,4% uzoraka (tablice 8. i 9., slike 13. i 14.). Drugim riječima, PCR pozitivni uzorci imali su gotovo jednaku šansu (45%/55%) imati pozitivan rezultat u HC II testu. U brazilskoj studiji na 263 cervikalna uzorka obrađena sa HC II i PCR testom, rezultati ovih dvaju testova imali su konkordantnost od 76,5%. (220) S praktičnog je aspekta smatramo stoga korisnim “imati na umu” da je za pozitivan rezultat PCR testa potrebno 500 do 1000 kopija HPV genoma, dok je za pozitivan rezultat HC II testa potrebno oko 5000 kopija HPV genoma. (221) Na osjetljivost PCR testova utječu tehničke varijable poput HPV primera koji se koriste, enzima polimeraze i sl. dok je HC II test u tom smislu jednostavniji. (222) Konkordantnost rezultata ovih dvaju testova dakako nije 100%-tna ni u istraživanjima drugih autora, kako u ženskoj tako i u muškoj populaciji. (222) Razlozi za to su brojni; od veće kompleksnosti PCR metode zbog koje je postupak izvođenja testa podložniji potencijalnim intrinzičnim “biasima” i veće osjetljivosti PCR metode do različitih HPV genotipova u njihovim panelima te potencijalnih križnih reakcija HC II sa raznim niskorizičnim i HPV X

genotipovima u pojedinim slučajevima, te mogućim lažno negativnim rezultatima, kao i ovisnosti HC II o celularnoj komponenti uzorka zbog čega može dati lažno pozitivne rezultate kod očitanja sa niskim RFU (eng. *relative light units*). (223)

Nadalje, valja istaknuti da od uzoraka koji su u našem istraživanju INNO-LiPA metodom bili pozitivni na jedan ili više HPV genotipova, u svega 45% uzoraka HC II metodom dobiven je pozitivan nalaz. Analogno tome, PCR-om je detektirano čak i manje, konkretno 40% pozitivnih nalaza od svih INNO-LiPA pozitivnih rezultata. Takvi rezultati dokaz su slabe osjetljivosti ovih metoda. U tablicama 27. i 28. analizirani su rezultati HC II i PCR metoda prema broju genotipova koji su verificirani u uzorcima INNO-LiPA metodom. Iz rezultata je vidljivo kako je kod ispitanika sa INNO-LiPA potvrđenim jednim HPV genotipom nalaz detekcijskih metoda PCR-a bio pozitivan u 70%, a HC II metodom kod 72,2%. Kada su INNO-LiPOM bila pozitivna dva HPV genotipa značajno manji dio pozitivnih rezultata bio je utvrđen detekcijskim metodama; 25% pozitivnih PCR-om a 22,2% pozitivnih te HC II metodom je dokazano. U slučajevima kada su INNO-LiPA metodom utvrđena tri genotipa, svega 5% pozitivnih rezultata dobiveno je u PCR-u , dok je HC II metodom dobiveno 5,56% pozitivnih rezultata. Razlog tome barem djelomično leži u činjenici da je u našem istraživanju miješanih infekcija sa dva ili više genotipova općenito bilo znatno manje nego onih s jednim genotipom. U danskoj studiji koja je rađena na asimptomatskim vojnicima primjenjene su dvije metode rezultati kojih su potom komparirani: radi se o HC II i INNO-LiPA uz 77% podudarnost njihovih rezultata. INNO-LiPA metoda se pokazala osjetljivijom; od INNO-LiPA pozitivnih, čak 50,9% imalo je negativan rezultat u HC II testu. (224) U drugim studijama INNO-LiPA metoda je demonstrirala visoku efikasnost u detekciji visokorizičnih HPV genotipova kao i miješanih infekcija s više HPV genotipova. Pretpostavlja se da je uzrok takve superiornosti metode INNO-LiPA pred ostalim metodama mala veličina HPV amplikona (65bp), koja je ujedno zaslužna i za mogućnost detekcije i onda kada je količina HPV DNA u uzorku niska ili kada je suboptimalno prezervirana. (225) Međutim, važno je napomenuti kako je moguće da je među INNO-LiPA pozitivnim rezultatima i udio HPVX infekcija za koje se spekulira da su dio heterogene skupine HPV genotipova, odnosno u velikoj mjeri tzv. kutani HPV genotipovi koji križno reagiraju sa pojedinim anogenitalnim HPV genotipovima. (224)

Uz već spomenutu činjenicu kako za muškarce još uvijek ne postoje standardizirane metode ni "kitovi" za HPV detekciju, svakako treba napomenuti da ni kod žena ne postoji još uvijek optimalna metoda ni standardizacija HPV detekcije. Rezultati studije kineskih autora na ženama pokazali su tako da se za detekciju HSIL (eng., *high grade squamous intraepithelial*

lesion) u screening skupini (žene koje ranije nisu imale abnormalne nalaze papa testa) i u dijagnostičkoj skupini (žene koje su imale abnormalnosti u papa testu ranije) prednost treba dati HC II testu u odnosu na PCR jer je utvrđena usporediva osjetljivost i značajno veća specifičnost HC II testa. S druge strane, kada se radilo o LSIL (eng. *low grade squamous intraepithelial lesion*), tada se primjena HC II testa ne preporuča zbog dokazano manje osjetljivosti a veće specifičnosti nego PCR. (226) Što se muške populacije tiče, tek se trebaju uspostaviti dijagnostički algoritmi i protokoli za praćenje tijeka bolesti. Uvažavajući činjenicu kako je na sreću ipak većina HPV infekcija prolazna i nije popraćena citološkim abnormalnostima i/ili kliničkim lezijama, screening je potrebno usmjeriti prema identifikaciji onih visokorizičnih lezija koje imaju potencijal za prelazak u invazivni karcinom. Stoga optimalni test nije onaj kojim se pozitivan rezultat dobije kod manjih količina HPV DNA koje su nerijetko prisutne kod zdravih osoba oba spola a koje će s vremenom imunološki sustav domaćina eliminirati jer takav test nije praktično koristan. S obzirom da samo perzistentna infekcija istim visokorizičnim HPV genotipom može s vremenom prijeći u invazivni karcinom, optimalni test morao bi imati visoku specifičnost za prepoznavanje visokorizičnih HPV genotipova. (227)

Među pozitivnim uzorcima INNO-LiPA metodom u 70% ispitanika je utvrđen po jedan HPV genotip dok je značajna manjina (18.6%) imala dva ili tri genotipa (tablica 8., slika 14). Više od tri različita HPV genotipa nisu detektirana, što je potencijalno uvjetovano ograničenjima INNO-LiPA testa te je stoga moguće da nije odraz realnog stanja. Visokorizični HPV genotipovi utvrđeni su ukupno u 20% slučajeva, pri čemu su češće (14.3%) pronađeni kao sastavni dio miješane infekcije (visokorizični i niskorizični HPV genotipovi u istom uzorku). Slične su brojke iz spomenute švedske studije kod koje je isključivo niskorizični genotip utvrđen u 82% uzoraka, isključivo visokorizičan genotip u 8% uzoraka a infekcija sa dva ili više HPV genotipa u 14% ukupno; od toga se u 10% slučajeva multiplih infekcija radilo o kombinaciji visokorizičnih i niskorizičnih HPV genotipova, u 3% slučajeva o kombinaciji isključivo visokorizičnih HPV genotipova, te u 1% slučajeva o kombinaciji isključivo niskorizičnih HPV genotipova. (219) Među miješanim infekcijama u našoj studiji radilo se o kombinaciji visokorizičnih i niskorizičnih HPV genotipova u svim slučajevima osim u jednom gdje je utvrđena kombinacija isključivo visokorizičnih HPV genotipova u kondilomu. Interesantno je da kombinacije isključivo niskorizičnih HPV genotipova u našoj studiji nije bilo. Uloga miješanih infekcija u kondilomima zasad nije jasna. Međutim, sve je više dokaza koji upućuju na činjenicu kako je rizik obolijevanja od karcinoma anogenitalne regije veći u

osoba oba spola koje u anamnezi imaju kondilome. (228) Potrebno je napomenuti da unatoč konzistentno prijavljenom većem riziku obolijevanja od karcinoma anogenitalne regije kod žena i muškaraca sa anogenitalnim kondilomima u anamnezi, nijednom se prospektivnom, kao niti "case-control" studijom ne analizira izravno prisutnost HPV 6 i/ili HPV 11 genotipa u samim tumorima. Među iznimno rijetkim studijama koje su prijavile HPV status u tumorima, vrlo rijetko su (ali, ipak jesu) dokazani HPV 6 i/ili HPV 11. S druge strane, ostaje otvoreno pitanje u kojoj mjeri je proces karcinogeneze u tim slučajevima izravno posredovan visokorizičnim HPV genotipovima i ukoliko jest, koji bi bili mehanizmi (sklonost perzistenciji ili nešto drugo?), odnosno postoji li u podlozi određeni defekt imunološke obrane. Kada govorimo o prisutnosti visokorizičnih HPV genotipova u kondilomu koji je po definiciji benigna lezija, treba svakako naznačiti mogućnost da i takva klinički (i patohistološki) benigna lezija pod utjecajem visokorizičnog HPV genotipa progredira u malignu leziju. (228). Zasad se, međutim, u rutinskoj praksi (u većini slučajeva) ne smatra korisnim genotipizirati klasične kondilome primarno iz razloga jer nije poznat značaj prisutnosti visokorizičnih HPV genotipova na koži, odnosno sluznici anogenitalne regije kod muškaraca. Slijedom navedenoga proizlazi zaključak da je u znanstveno-istraživačke svrhe važno proučavati zastupljenost HPV genotipova kako u kondilomima tako i u asimptomatskih, odnosno latentnih bolesnika, pri čemu bi od osobite praktične koristi bile longitudinalne prospektivne studije. Rezultati takvih studija uvelike bi pomogli rasvijetliti evoluciju anogenitalne HPV infekcije kod muškaraca te bi potencijalno razjasnili ulogu visokorizičnih HPV genotipova u kondilomima u procesu karcinogeneze.

Od ostalih relevantnih studija čiji rezultati su usporedivi s našom, valja spomenuti i veliku multinacionalnu studiju na muškarcima u kojoj je HPV 6 verificiran je u 43,8% kondiloma, HPV 11 u 10,7% dok je HPV 16 dokazan u 9,8% kondiloma. Onkogeni HPV genotipovi pronađeni su u 33,1% kondiloma. (229)

Od rezultata kineske studije na muškarcima s kondilomima treba istaknuti kako je u 63,1% uzoraka utvrđen HPV 6 i/ili HPV 11. (230) U 26,2% uzoraka uz HPV 6 i/ili HPV 11 bio je prisutan bar još jedan HPV genotip, a sveukupno je u 33,8% potvrđena infekcija s više HPV genotipova. (230) HPV 16 i/ili HPV 18 pozitivni su bili u 9,2% uzoraka . (230) U 10.8% kondiloma uopće nisu potvrđeni HPV 6 i/ili HPV11, nego su bili prisutni drugi HPV genotipovi. (230)

U kliničkoj studiji iz Slovenije na muškarcima sa kondilomima u 23% slučajeva koji su bili pozitivni na HPV 6/ HPV 11 utvrđeno je da je u uzorku bio pozitivan još (barem) jedan drugi HPV genotip, konkretno HPV 16, 31, 51, 53, 55, 62, 66, 70, 73, 84. (231)

U rezultatima studije na muškarcima s kondilomima u sjevernoj Španjolskoj dominirale su miješane infekcije koje su dokazane u čak 58.7% uzoraka. (232) Takav udio miješanih infekcija značajno je veći nego u drugim studijama. Pritom su, slično kao i u većini drugih studija uključujući i našu, visokorizični HPV genotipovi češće bili prisutni u miješanim infekcijama s 2 ili više HPV genotipova, za razliku od niskorizičnih koji su češće utvrđeni samostalno. Najmanje jedan visokorizični HPV genotip pronađen je u 51.4% slučajeva, što je također značajno više nego se dosad opisivalo. Pretpostavlja se da kondilomi nisu nastali pod utjecajem visokorizičnog HPV genotipa nego upravo niskorizičnih kako je i ranije potvrđeno u većini slučajeva. (232) Međutim, prisutnost visokorizičnog HPV genotipa u kondilomu mogao bi biti indikatorom seksualne aktivnosti pacijenta, što je potvrđeno i značajno većim udjelom HPV 16 pozitivnih nalaza u kondilomima kod muškaraca koji su imali više seksualnih partner(-ic)a tijekom života, pri čemu se te brojke, očekivano, povećavaju s dobi ispitanika. (232) Iako je poznato da s dobi raste stopa "klirensa" HPV infekcije, ipak je uočen trend dulje perzistencije infekcija visokorizičnim HPV genotipovima u odnosu na niskorizične, te se time tumači i veći udio visokorizičnih HPV infekcija kod starijih muškaraca. (123) Za sada se prethodno navedeni zaključci, iako zanimljivi, mogu (i moraju), sukladno našem mišljenju, prihvatiti "s rezervom" jer još uvijek dokazi nisu sasvim nepobitni.

Navedene razlike u rezultatima između pojedinih studija pri tom su prvenstveno uvjetovan razlikama u populaciji koja je u fokusu istraživanja, načinu uzimanja uzoraka i obradi materijala i podataka te zemljopisnom području na kojemu je istraživanje provedeno.

Dominantna zastupljenost niskorizičnog HPV 6 genotipa u 69.6% uzoraka u našoj studiji u skladu je s očekivanjima i rezultatima dosadašnjih studija (tablica 11.). Od ukupno 55 uzorka pozitivna na HPV 6 genotip u našem istraživanju, u 80% slučajeva utvrđen je samostalno, dok je u preostalih 20% uzoraka pronađen u kombinaciji sa jednim ili dva druga HPV genotipa. Drugi najčešći genotip je HPV 16 zastupljen u 5.1% uzoraka koji je u našem istraživanju u 50% slučajeva bio detektiran u kombinaciji s drugim HPV genotipovima, konkretno s HPV 66 i s HPV 6 i HPV 18 (tablica 11.). U prethodno spomenutom danskom istraživanju, HPV 16 bio je prisutan u 5.8% asimptomatskih muškaraca. (224) Ostali genotipovi zastupljeni su znatno manje. Treće mjesto po učestalosti dijele HPV 11, HPV 18 i

HPV 66 koji su zastupljeni u 3.8% slučajeva svaki, pri čemu su HPV 18 i HPV 66 prisutni isključivo u kombinacijama sa drugim HPV genotipovima dok je HPV 11 verificiran isključivo samostalno. Iz ovih se rezultata može uočiti kako je, za razliku od većine drugih istraživanja, HPV 11 u našoj studiji značajno rjeđe zastupljen. Za usporedbu, u švedskoj studiji iz 2012. godine zajednički udio HPV 6 i HPV 11 iznosio je 89%, čime su potvrđeni rezultati velike stockholmske studije iz 1980-ih kojom je utvrđeno da je 90% kondiloma pozitivno na HPV 6 i HPV 11. (219) Zbirni rezultat udjela HPV 6 i HPV 11 u našem istraživanju nešto je manji i iznosi 73,4%. U gotovo svim dosadašnjim studijama, uključujući i našu, HPV 16 je najčešće zastupljen visokorizični genotip u kondilomima pri čemu udio HPV 16 pozitivnih uzoraka značajno varira među studijama. U američkoj studiji na 463 asimptomatska muškarca HPV 16 genotip bio je najčešće detektiran onkogeni HPV genotip sa zastupljenošću od 18.4%, dok su HPV51 i HPV52 bili prisutni u 9.6% i 7.3% uzoraka. (233)

Važnost poznavanja distribucije HPV genotipova u kondilomima u pojedinim zemljopisnim lokacijama bitna je radi procjene očekivane uspješnosti programa HPV vakcinacije, osobito imajući u vidu miješane infekcije kod kojih su uz one najčešće HPV 6, HPV 11, HPV 16 i/ili HPV 18 prisutni i drugi HPV genotipovi čija uloga je nejasna u prirodnom tijeku bolesti kod muškaraca. Jednostavnim izračunom na osnovu rezultata dobivenih u našem istraživanju, moguće je procijeniti kako bi četverovalentna HPV vakcina mogla prevenirati razvoj HPV anogenitalne infekcije u 82,3% muške populacije, a nonavalentna vakcina isti efekt postigla bi kod 88,6% naših ispitanika.

Među kombinacijama pojedinih genotipova koje su navedene u tablici broj 10 može se primjetiti da nijedna kombinacija nije utvrđena značajno češće od ostalih, naprotiv ujednačeno su zastupljene sve kombinacije. Niti iz drugih studija nisu proizašle pojedine češće prisutne kombinacije kod miješanih infekcija. (77, 232, 234)

6.4 Rezultati vezani za dob bolesnika i trajanje bolesti

Niža srednja dob ispitanika s kondilomima na unutrašnjem listu prepucija, iako ne i statistički značajno niža, može se uočiti u tablici broj 12. Manje upadljiva razlika koja ne dostiže statističku značajnost vidi se i kod podjele na proksimalnu i distalnu genitalnu regiju pri čemu su prosječno mlađi muškarci sa kondilomima u distalnoj genitalnoj regiji (tablica 38. , slika 17 iz Priloga).

Slično je i sa srednjim trajanjem bolesti od momenta kada je ispitanik uočio pojavu kondiloma do momenta kada je potražio medicinsku pomoć. Kondilomi lokalizirani na unutrašnjem listu prepucija prosječno su kraćeg trajanja u odnosu na ostale lokalizacije, iako se niti ta razlika nije pokazala statistički značajnom (tablica 13.). Kada se u tablici 33. (Prilog) analizira srednje trajanje bolesti u genitalnoj i ekstragenitalnoj regiji, uočljivo kraćeg vijeka su oni u genitalnoj regiji u odnosu na ekstragenitalne iako i dalje nedovoljno statistički značajno.

Podaci o srednjoj dobi ispitanika prema tipu kondiloma u tablici 14. također nisu ukazali na značajne razlike.

Interesantan se podatak, međutim, može primjetiti u tablici 15. iz koje je vidljivo kako je srednje trajanje ravnih kondiloma kraće od trajanja ostalih tipova kondiloma. Premda niti ovdje se statističkom analizom nije utvrdilo značajno odstupanje, valja napomenuti da se taj tip kondiloma najteže može uočiti od strane pacijenta i/ili liječnika s obzirom da je vrlo često "diskretan" u izgledu i pojavi. Moguće je da su ti kondilomi koegzistirali uz drugi tip kondiloma ili su se pojavili naknadno te nisu bili inicijalni povod dolaska na liječnički pregled. Osim toga, moguće je da su ti muški ispitanici na pregled dermatovenerologa došli zbog pozitivnog nalaza na HPV kod svojih seksualnih partner(-ic)a te su prilikom pregleda slučajno otkriveni, što nije rijetkost u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Komparacijske podatke iz drugih studija za prethodno navedene karakteristike nemamo jer u dosadašnjim studijama takve analize nisu rađene, zbog čega smatramo da su nam podaci dobiveni u našoj studiji vrijedni.

6.5 HPV genotipovi u odnosu na tip kondiloma i njihovu lokalizaciju

Veći broj genotipova kod ravnih kondiloma u odnosu na papulozne može se iščitati iz tablice 16. premda nije dosegnuta statistička značajnost.

Najveći broj genotipova utvrđen je kod kondiloma lokaliziranih na unutrašnjem listu prepucija (1,78), dok je u kondilomima skrotalne regije utvrđen najmanji broj genotipova, iako razlika nije statistički značajna kako je vidljivo iz tablice broj 17. i slike broj 16. Slično je i u tablici 35. (u Prilogu) u kojoj su kondilomi pregrupirani u odnosu na svoju lokalizaciju na genitalnu i ekstragenitalnu regiju, broj genotipova prema lokalizaciji kondiloma ne ukazuje na bitnije razlike. Međutim, kada se kondilomi pregrupiraju na proksimalnu i distalnu genitalnu regiju (tablica 29.), uočljiv je statistički značajno veći broj genotipova u distalnoj genitalnoj

regiji u odnosu na proksimalnu. Takvih podjela kao i analiza u okvirima istih u studijama drugih autora pronađeno je iznimno malo. Među njima dostupno je za komparaciju i analizu istraživanje hrvatskih autora u kojem je na uzorku od 100 osoba muškog spola sa kliničkim manifestacijama anogenitalne HPV infekcije pronađen visokorizični HPV genotip, dominantno HPV 16 u dvanaest ispitanika te HPV 18 kod sedam ispitanika, dok su HPV 31 i HPV 33 bili zastupljeni svaki u jednom uzorku. (148) Značajno češće u toj studiji visokorizični HPV genotipovi bili su zastupljeni u distalnom dijelu genitala (glans, unutrašnji list prepucija, distalni dio korpusa), dok su niskorizični bili dominantno zastupljeni u proksimalnom dijelu genitala. (148)

Distribucija tipa kondiloma prema genotipu HPV-a ovisno o tome je li utvrđen niskorizični, visokorizični tip, miješana infekcija niskorizičnim i visokorizičnim HPV genotipovima, odnosno negativan nalaz prikazana je u tablici 18.; uočljivo je da se najveći (iako ne i statistički značajan) broj visokorizičnih genotipova, samostalno ili u kombinaciji nalazi kod ravnih kondiloma (VR 12,5%, VR+NR 25%), te kod fibromatoidnih (VR+NR 25%, VR 0%). Iz iste se tablice može također uočiti da je najveći broj kondiloma s negativnim nalazom INNO-LiPA-a izoliran iz papuloznih kondiloma. Isti parametri analizirani su u tablici broj 19 pri čemu su u obzir uzeti samo niskorizični i visokorizični HPV genotipovi. Pritom je uočljiv sveukupno manji broj ravnih i fibromatoidnih kondiloma u odnosu na papulozne i verukozne kondilome. Zbog takvih je diskrepancija nemoguće postići statističku značajnost u rezultatima.

Analizom lokalizacije kondiloma prema genotipu (VR, NR, VR+NR, neg.) pronađenom u uzorku u tablici 20. nisu utvrđene statistički značajne razlike. Može se ipak uočiti da se na unutrašnjem listu prepucija u 44,44% slučajeva nalazi miješana infekcija niskorizičnim i visokorizičnim genotipovima, međutim na toj lokalizaciji bilo je svega 9 kondiloma; iz tog razloga sveukupno gledano ne postoji uvjerljiva povezanost. Kada se uzmu u obzir samo niskorizični i visokorizični HPV genotipovi a zanemare negativni (tablica 21.), rezultat je ponovo upadljiv kod kondiloma na unutrašnjem listu prepucija (44,44%) i perianalne regije (33,33%) iako se zbog relativno malih brojeva ne može govoriti o statistički značajnim odnosima. Identične analize učinjene su u tablicama broj 35 i 36 (u Prilogu) sa alternativno pregrupiranim kondilomima u odnosu na lokalizaciju na genitalnu i ekstragenitalnu te u tablicama 40 i 41 (u Prilogu) gdje su pregrupirani na proksimalnu i distalnu regiju. Iz sve četiri spomenute tablice mogu se iščitati ujednačeni rezultati među kojima se ne ističu pojedini kao statistički značajni.

6.6 HPV status partnerice/-a

Dodatno smo analizirali podatke o HPV statusu partnerice/-a. Pri tom je 28,6% ispitanika prijavilo pozitivan HPV status aktualne/-og seksualne/-og partnerice/-a u smislu klinički manifestne bolesti (kondiloma), odnosno pozitivnog nalaza HPV testa. Analize tipa i lokalizacije kondiloma prema HPV pozitivnosti partnerice/-a (tablice 22. i 23.) općenito nisu statistički značajne, kao ni kod alternativno pregrupiranih podskupina na genitalnu i ekstragenitalnu te na proksimalnu i distalnu genitalnu regiju (tablice broj 37. i 42. u Prilozima). Osim toga, takvi podaci mogu nas navesti na pogrešne interpretacije s obzirom na moguće brojne *confounding* (eng.) elemente; počevši od svjesnog ili nesvjesnog davanja krivog iskaza, pa sve do činjenice da HPV status aktualne seksualne partnerice ne mora biti u vezi sa HPV statusom ispitanika ukoliko je ranije imao i druge partnerice/-e ili ima više konkomitantnih partnerica/-a u danom trenutku. Poznavajući razmjerno dugi period latencije anogenitalne HPV infekcije kao i uvažavajući činjenicu da većina anogenitalnih HPV infekcija ne dovodi do pojave ikakvih simptoma te stoga ostaje često neprepoznata (i neliječena), podaci o HPV statusu aktualne/og seksualne/-og partnerice/-a (bez uvida u konkretnije okolnosti) nisu nam od presudne važnosti u kliničkoj praksi te imaju uglavnom značaj u epidemiološkim studijama koje se intenzivnije bave dinamikom transmisije ove infekcije.

6.7 HPV negativni rezultati

Usprkos 55% negativnih rezultata u HC II te 60% negativnih u PCR-u među INNO-LiPA pozitivnim uzorcima u našoj studiji, u tablicama 27. i 28. uočljivo je kako su svi INNO-LIPA negativni rezultati ujedno bili negativni i u detekcijskim testovima, HC II i PCR-u. Konkordantnost tih nalaza vjerojatno s visokom razinom pouzdanosti govori u prilog stvarno negativnim nalazima u konkretnim uzorcima. S kliničkog aspekta interesantno je da se od osam (11,4%) INNO-LiPA negativnih rezultata u čak 6 (75%) slučajeva radilo o papuloznim kondilomima te je lokalizacija u 50% slučajeva bio radiks penisa, odnosno u 37,5% slučajeva radilo se o papuloznim kondilomima na radiksu. Prosječno trajanje bolesti kretalo se u tim slučajevima od osam mjeseci do dvije godine. Preostale dvije studije na muškarcima s manifestnom HPV anogenitalnom infekcijom imale su 8% (219) i 25% (232) negativnih rezultata na HPV. Ovdje valja spomenuti rad Johanssona i sur. koji su na HPV negativnim kondilomima primjenili metodu metagenomičkog sekvencioniranja te tako utvrdili da se zapravo radilo ipak o HPV pozitivnim kondilomima. (235)

Mogućih uzroka HPV negativnih rezultata ima nekoliko. Prije svega treba istaknuti da zasad ne postoje komercijalno dostupni testovi niti metode koji bi bili odobreni i registrirani za uzimanje uzoraka s kože i/ili sluznice anogenitalne regije kod muškaraca sa ciljem HPV detekcije, odnosno genotipizacije. U tom kontekstu, osobito je problematično uzimanje uzoraka sa orožnjelog epitela koji dominira u predjelima najčešćih lokalizacija kondiloma kod muškaraca. Ipak treba istaknuti da je u svakom slučaju tzv. *off-label* (eng.) testiranje poštujući tehničke postulate i upute o pravilnom izvođenju testova uvjerljivo bolje i razboritije rješenje od izvođenja testova koji nemaju dokazanu validnost osobito ukoliko rezultati takvih testiranja potencijalno mogu utjecati na donošenje kliničkih odluka, te formiranje planova i smjernica za dijagnostiku, liječenje i prevenciju. Štoviše, tehnički ispravna uporaba takvih *off label* testova (u nedostatku validiranih) izvan striktno zadanih okvira ne smatra se *vitium artis* (lat.) nego je dapače općeprihvaćena u znanstvenoistraživačkoj pa i u kliničkoj praksi. Radi jednostavnijeg snalaženja, bolje preciznosti i vjerodostojnosti te točnije interpretacije rezultata u mnogim takvim slučajevima izdani su konsenzusi i smjernice za optimiziranje konkretnih testova, odnosno kitova koji se koriste izvan svog uskog područja indikacije za koji su registrirani. (236)

Nadalje, moguće je da su lezije iz kojih je uzorak uzet pogrešno klinički interpretirane kao kondilomi. Uvažavajući činjenicu kako se u našem istraživanju klinička dijagnoza kondiloma postavljala na osnovu anamneze i kliničke slike neovisno od strane dva specijalista iz područja venerologije koja zajedno imaju više od 40 godina radnog staža u kliničkoj praksi, vjerojatnost za pogrešnu interpretaciju je iznimno mala. Među ostale potencijalne uzroke treba pribrojiti i mogućnost uzimanja tehnički neadekvatnog uzorka (npr. premala količina HPV DNA u uzorku) te komplikacije u transportu i obradi materijala. Nadalje, mogući uzrok svakako može biti i limitiranost postojećih testova na prepoznavanje samo određenog broja HPV genotipova zbog čega je moguće da su u kondilomima bili prisutni genotipovi koje se testom ne mogu detektirati. Osim toga, dosadašnja istraživanja ukazuju na to da su negativni rezultati češće utvrđeni u slučajevima kada su prisutna 3 ili više HPV genotipa. U našem istraživanju nije detektirano više od kombinacije triju različitih HPV genotipova. Ostaje također mogućnost da zbog poznatih limitacija hibridizacijske metode INNO-LiPA osobito onih koje se tiču miješanih infekcija, dio rezultata ostaje neprepoznat i stoga (lažno) negativan.

Među studijama koje se bave anogenitalnom HPV infekcijom kod muškaraca, neovisno imaju li klinički manifestnu bolest ili su asimptomatski nositelji virusa, u dijelu ispitanika utvrđena je tzv. HPVX infekcija, što znači da je PCR metoda dala pozitivan rezultat ali nije

bilo moguće utvrditi konkretan HPV genotip. (237) Pritom se udio HPVX pozitivnih infekcija kreće od 10-22%. (224, 238) Autori navedenih studija, poput danske studije na velikom uzorku od 2460 muškaraca kojom je utvrđeno 18% HVPX pozitivnih uzoraka, smatraju da je uzrok tome križna reaktivnost određenih "kožnih" tipova koji se ubraju u heterogenu skupinu HPV virusa, uključujući β i γ razrede HPV-a sa HPV genotipovima iz α razreda koje detektiraju standardizirani testovi kojima trenutno raspolažemo. (224) Pri tom su istraživanja pokazala da se veći broj HPV genotipova koji se ubrajaju u β- i γ-HPV razrede mogu pronaći na nepromijenjenoj koži anogenitalne regije ali i u kondilomima. Vjeruje se, nadalje, da prisutnost tih drugih HPV genotipova iz β i γ razreda nije razlog nastanka kondiloma iako se i u njima nerijetko mogu detektirati. (239) Spekulira se da je za prisutnost tzv. "kožnih" HPV genotipova iz razreda β i γ u anogenitalnoj regiji velikim dijelom zaslužan prijenos autoinokulacijom s drugih regija (izvan anogenitalne). Sama prisutnost HPV DNA ne mora uvijek nužno implicirati prisutnost infektivnog virusa, iako je novija studija ukazala na statistički značajnu konkordantnost β i γ HPV genotipova prisutnih u anogenitalnoj regiji seksualnih partnera na uzorku od 25 parova. Iz toga se može izvesti zaključak kako se ti HPV genotipovi mogu prenositi i seksualnim putem, što zapravo ukazuje na činjenicu da je anogenitalna regija češće nego se to dosad mislilo područje infektivnosti. (239) Novije studije, iako zasad još malobrojne, mijenjaju dosadašnje razumijevanje kako se HPV genotipovi koji pripadaju β i γ razredu nalaze isključivo na koži, za razliku od otprilike 40 ranije opisanih HPV genotipova iz razreda α koji se isključivo dovode u vezu sa anogenitalnom sluznicom i kožom. (240, 241) Štoviše, prisutnost HPV genotipova iz β i γ razreda detektirana je i u oralnoj šupljini, nosnom vestibulumu, obrvama, sluznici ezofagusa, čak i u fecesu. (242-246) Osim toga utvrđeni su i u bioptatima penilne i analne intraepitelne neoplazije HIV-pozitivnih MSM muškaraca. (247) Zasad nije poznat onkogeni potencijal HPV-a iz β i γ razreda iako je njihova prisutnost detektirana kod određenih tipova karcinoma kože. (248) Ostaje također otvoreno pitanje o ulozi perzistentne infekcije pojedinim β i γ HPV genotipovima na patogenezu karcinoma. (239) Standardizirani testovi imaju sposobnost detektirati isključivo α HPV genotipove i kao takvi koriste se u gotovo svim postojećim studijama koje se bave anogenitalnom HPV infekcijom. Iz tog razloga naša su znanja o raznovrsnosti te potencijalnoj interakciji među pojedinim HPV genotipovima koji pripadaju različitim razredima, odnosno njihovoj sinergiji u patofiziologiji anogenitalne infekcije limitirana objektivnim otegotnim čimbenicima.

6.8 Noviji podaci o HPV onkogenezi i tipovima HPV

Činjenica jest da osim potencijalnih reperkusija na somatsko, psihosocijalno i seksualno funkcioniranje pojedinca, objektivno visokih kumulativnih troškova liječenja, visoku stopu infekcioznosti, anogenitalna HPV infekcija najveću težinu sadrži u svom onkogenom potencijalu. U tom kontekstu vrijedi spomenuti kako postupno raste broj dokaza o značajnom udjelu HPV infekcija u premalignim anogenitalnim lezijama kao i u karcinomima anogenitalne regije. U (PIN) III lezijama visokorizični HPV genotip, konkretno HPV 16 potvrđen je u 75% slučajeva, za razliku od 32% slučajeva PIN I lezija. (249) Pretpostavlja se da liječenje PIN visokog stupnja može smanjiti incidenciju invazivnog karcinoma, no to zapravo nije još egzaktno dokazano. Iako se primjena kondoma muških partnera žena sa cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN) povezuje sa regresijom CIN, još uvijek ne postoje nedvosmisleni dokazi koji bi potvrdili da liječenje lezija uzrokovanih HPV-om smanjuje rizik od infekcije i razvoja bolesti kod žena. (94) Djelomično je i to razlog zašto rutinski skrining primjenom peniskopa/povećala i octene kiseline nije ušao u standardnu praksu. (94)

Što se konkretno karcinoma penisa tiče, podaci iz recentnije literature ukazuju na moguću pojavu ove bolesti i kod mlađih muškaraca nego se ranije mislilo; konkretno u 19% slučajeva pojavjuje se u muškaraca mlađih od 40 godina a u 7% slučajeva u muškaraca mlađih od 30 godina. (250) U našoj studiji nismo se izravno bavili premalignim ni malignim lezijama, međutim treba imati na umu da je progresija u tom smjeru ipak razmjerno spora te stoga ostavlja dovoljno prostora za intervenciju, pod uvjetom da bolesnik pravodobno potraži liječničku pomoć. Za biopsiju i PHD odlučili bismo se kod svake atipične lezije, kao i kod perzistentnih lezija i/ili onih rezistentnih na uobičajene terapijske modalitete. Imunosuprimirane bolesnike također češće kontroliramo i imamo niži prag tolerancije za svaku novonastalu i/ili atipičnu leziju koju ćemo se kod imunosuprimiranih bolesnika češće, odnosno ranije odlučiti bioptirati. Radi detaljnije procjene rizika za pacijenta moguće je dodatno iz bioptata pohranjenog u parafinsku kocku učiniti HPV genotipizaciju i tako odrediti konkretan HPV genotip. Time dobivamo vrijednu informaciju na osnovu koje donosimo daljnje odluke o načinu liječenja i frekvenciji praćenja tog bolesnika.

6.9 Analiza trenutnog stanja i pogled u budućnost

Među relativno malobrojnim postojećim studijama u muškoj populaciji, prevladavaju studije koje se bave genotipizacijom HPV-a vanjskog genitala, odnosno anogenitalnog područja kod asimptomatskih muškaraca. U tom kontekstu valja imati na umu kako većina anogenitalnih HPV infekcija zapravo nije klinički jasno simptomatska. Rezultati studija asimptomatskh muškaraca značajno se međusobno razlikuju prije svega zbog razlika u populaciji, geografskoj lokaciji na kojoj su istraživanja provedena, kao i zbog metoda i tehnika prikupljanja i analize uzoraka. Premda rezultate studija asimptomatskih muškaraca ne možemo izravno komparirati s rezultatima studija muškaraca s klinički manifestnom bolesti te slijedom toga niti donositi izravne zaključke bitne za kliničku praksu, korisno je raspolagati i jednim i drugim podacima radi kompletnijeg uvida u prevalenciju, incidenciju i distribuciju anogenitalne infekcije u muškoj populaciji s istog zemljopisnog podneblja. Osim potrebe za novim osjetljivijim testovima za HPV detekciju koji će biti i službeno odobreni i registrirani za primjenu u muškaraca, smatramo bitnim usuglasiti indikacije za provođenje testiranja (kada?; zašto?; kod koga?), anatomskih lokalizacija s kojih će se uzimati uzorci kao i detaljne upute o samom postupku uzorkovanja i principu izvođenja testa. Trenutno su, u nedostatku konkretnih smjernica, indikacije za HPV detekciju i/ili genotipizaciju u muškoj populaciji varijabilne u kliničkoj praksi. Načelno se, iako ne uvijek, testiraju osobe muškog spola s klinički manifestnom bolesti, muškarci čija spolna partnerica/čiji spolni partner ima verificiranu anogenitalnu HPV infekciju te muške osobe koje prijave spolne odnose sa osobama istog spola. Odgovore o opravdanosti testiranja i/ili potrebi za proširivanjem indikacija za testiranje te usuglašavanjem svakodnevne prakse u tom kontekstu mogu dati samo kliničke studije bazirane na dokazima visoke kvalitete. Kod donošenja odluka o vrsti dijagnostičkih, odnosno *screening* (engleski) testova koji će se raditi u konkretnom slučaju, osim epidemioloških dokaza koji će se prikupiti kroz spomenuti znanstveno-istraživački rad, važnu ulogu imaju i ekonomski čimbenici koje ne treba zanemariti. Uvažavajući aktualni nedostatak sličnih studija, rezultati našeg istraživanja mogli bi, smatramo, biti koristan izvor informacija za usporedbu s rezultatima budućih sličnih studija.

7. Zaključci

1. Benigne HPV kliničke promjene (šiljasti kondilomi) ne moraju nužno biti uzrokovane niskorizičnim HPV genotipovima. Sukladno rezultatima našeg istraživanja, prevalencija HPV DNA tipova visokog onkogenog rizika u kondilomima muškaraca iznosi 20%, što definitivno nije slučajni, odnosno sporadični nalaz. Miješane infekcije visokorizičnim i niskorizičnim HPV genotipovima u kondilomima kod muškaraca prisutne su u 15% slučajeva pri čemu nijedna kombinacija nije izolirana češće u odnosu na druge.

2. Komercijalni HC II test i "in-house" PCR test primjenjeni, između ostalog, u ovom istraživanju nisu dovoljno osjetljive metode za HPV detekciju iz kondiloma kod muškaraca; pozitivan nalaz na HPV utvrđen je kod svega 45% uzoraka obrađenih sa HC II testom te kod 40% uzoraka obrađenih "in-house" PCR testom u odnosu na INNO-LiPA test kojim je detektirano 89% HPV pozitivnih infekcija iz kondiloma.

3. Na temelju rezultata našeg istraživanja nije utvrđena statistički značajna korelacija između kliničkih osobina kondiloma (izgled i lokalizacija) anogenitalne regije u muškaraca i HPV genotipa visokog onkogenog rizika.

4. Međutim, postoji statistički značajna korelacija između broja genotipova u kondilomima (miješane infekcije) i lokalizacije takvih kondiloma u distalnoj genitalnoj regiji. U našoj studiji sve miješane infekcije bile su kombinacija niskorizičnih i visokorizičnih HPV genotipova.

5. Optimalna i jedinstvena laboratorijska metoda koja bi bila "zlatni standard" za rutinsku verifikaciju svih oblika anogenitalne HPV infekcije u muškaraca još uvijek ne postoji, no. Dijagnostički pristup muškarcu s verificiranom HPV-genitalnom infekcijom treba, stoga, biti individualiziran.

6. S obzirom na sve veći broj dokaza koji jasno ukazuju na onkogeni potencijal HPV-a postoji realna potreba za konkretnim usuglašavanjem oko objektivnih indikacija za HPV detekciju i/ili tipizaciju kod muškaraca imajući na umu objektivne mogućnosti i limitacije pojedinih postojećih dijagnostičkih metoda.

7. U razvoju daljnjih istraživanja smatramo smislenim i potrebnim razraditi i usuglasiti metode HPV detekcije, odnosno genotipizacije kod osoba muškog spola koje će biti

standardizirane, široko primjenjive, dostupne i prognostički konkluzivne pri čemu treba voditi računa i o ekonomskoj prihvatljivosti.

8. Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku

Uvod

Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) najčešća je virusna spolno prenosiva bolest. Anogenitalna infekcija HPV-om u muškaraca značajna je kako zbog čestih recidiva, dugotrajnog liječenja, psihosocijalne stigme te smanjene kvalitete zdravlja i života, tako i zbog neosporne povezanosti s karcinomom anusa, penisa i određenim tipovima karcinoma orofarinksa. Najčešća klinička prezentacija HPV-genitalne infekcije infekcije su šiljasti kondilomi.

Metode

U naše presječno opservacijsko istraživanje uvršteno je 70 muškaraca u dobi od 18 do 65 godina s jasnim kliničkim znakovima HPV genitalne infekcije u smislu verukoidnih, fibromatoidnih, papuloznih i šiljastih kondiloma te ravnih kondiloma. Ekskohleacijskom tehnikom uziman je materijal s klinički promijenjene kože/sluznice genitalne regije ispitanika u svrhu genotipizacije INNO-LiPA (INNOGENETICS, Gent, Belgija) testom. Radi usporedbe rezultata dio materijala također je bio tipiziran primjenom jednog od dva detekcijska testa; hybrid capture (HC) II, odnosno „in-house“ PCR testa. Kliničke odrednice (izgled, lokalizacija, trajanje kondiloma, dob ispitanika) korelirane su s dobivenim rezultatima.

Rezultati

Sukladno rezultatima našeg istraživanja „benigne“ HPV kliničke promjene (šiljasti kondilomi) ne moraju biti nužno uzrokovane samo niskorizičnim HPV DNA tipovima s obzirom da je prevalencija HPV DNA tipova visokog onkogenog rizika (kao jedini uzročnik i/ili u kombinaciji s niskorizičnim tipom) u kondilomima muškaraca iznosila 20% što definitivno nije slučajni, odnosno sporadični nalaz. S druge strane, prevalencija HPV genotipova isključivo niskog onkogenog rizika u kondilomima kod muškaraca u našem istraživanju iznosila je 68,57%. Miješane infekcije visokorizičnim i niskorizičnim HPV genotipovima u kondilomima kod muškaraca bile su dokazane u 14,29% pri čemu nijedna kombinacija nije izolirana češće u odnosu na druge. Pozitivan nalaz na HPV utvrđen je kod svega 45% uzoraka obrađenih sa HC II testom te kod 40% uzoraka obrađenih “in-house” PCR

testom u odnosu na INNO-LiPA test kojim je detektirano 88,57% HPV pozitivnih infekcija iz kondiloma. Dakle, komercijalni hybrid capture II (HC II) test i "in-house" PCR test nisu dovoljno osjetljive metode za HPV detekciju iz kondiloma u muškaraca.

Zaključci

Na temelju rezultata našeg istraživanja nije utvrđena statistički značajna korelacija između kliničkih osobina kondiloma (izgled i lokalizacija) anogenitalne regije u muškaraca i HPV genotipa visokog onkogenog rizika. Međutim, postoji statistički značajna korelacija između broja genotipova u kondilomima (miješane infekcije) i lokalizacije takvih kondiloma u distalnoj genitalnoj regiji. Optimalna i jedinstvena laboratorijska metoda koja bi bila "zlatni standard" za rutinsku verifikaciju svih oblika anogenitalne HPV infekcije u muškaraca još uvijek ne postoji. Dijagnostički pristup muškarcu s verificiranom HPV-genitalnom infekcijom treba, stoga, biti individualiziran.

9. Summary

Title:

Association of clinical manifestations and viral genotypes in genital human papillomavirus infection in men

Ivana Čulav, MD, Zagreb, 2021

Introduction

Anogenital HPV infection is the most common viral sexually transmitted disease. It has been estimated that 60 to 80% of sexually active population will at some point acquire at least one HPV genotype.

Methods

Cross-sectional unicentric clinical study was conducted in the Sexually Transmitted Disease Outpatient Clinic of the Department of Dermatology and Venereology and Department of Clinical and Molecular Microbiology of the Zagreb University School of Medicine and ZagrebUniversity Hospital Zagreb, Croatia. Seventy male patients, aged 18 to 63 years of age with condyloma in the anogenital region were included in the study.

Results

Samples from condyloma taken by curretage technique were subjected to INNO-LiPA genotyping test and positive results for at least one HPV genotype was present in 88.6% of cases. Samples were additionally analysed by two HPV detection tests; HC II and „in-house“ PCR test. The latter two tests gave positive results for HPV DNA; 45% of HC II and 40% of „in-house“ PCR results were negative.

Conclusions

Benign HPV lesions in anogenital region are not necessarily caused by low risk HPV genotypes only. In fact, in 20% of condylomas high risk HPV genotypes were detected. We found no correlation between the clinical parameters (clinical morphology, localization) of condyloma in anogenital region in men and high risk HPV genotype.

Bearing in mind the oncogenic potential of HPV infection, there is a justified „imperative“ for reaching a consensus about the reasonably evaluated indications for HPV detection and/or genotyping in men.

10. Popis literature

1. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 90, Human papillomaviruses: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22 February 2005. Lyon: IARC; 2007. 670 p. [pristupljeno 26.07.2021.] Dostupno na: https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono90.pdf. 0
2. McFadyean J, Hobday F. Note on the experimental 'transmission of warts in the dog'. J. comp. Pathol. Ther. 1898;11:341–44.
3. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. G. Ital. Mal. Ven. Pelle. 1907;48:12–17.
4. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. J Exp Med. 1933 Oct 31;58(5):607–24.
5. Rous P, Beard JW. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (teh Shope rabbit papilloma). J Exp Med. 1934 Nov 30;60(6):701–22.
6. Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-indiced rabbit papillomas (Shope). J Exp Med. 1935 Sep 30;62(4):523–48.
7. Rous P, Kidd JG. The carinogenic effect of a papilloma virus on the tarred skin of rabbits. J Exp Med. 1938 Feb 28;67(3):399–428.
8. Rous P, Friedewald WF. The effect of chemical carcinogenesis on virus-induced rabbit papillomas. J Exp Med. 1944 May 1;79(5):511–38.
9. Ito Y, Evans CA. Induction of tumors in domestic rabbits with nucleic acid preparations from partially purified Shope papilloma virus and from extracts of the papillomas of domestic and cotton tail rabbits. J. Exp. Med. 1961;114:485–91.
10. Lewandowsky F, Lutz W. One case of skin cancer undescribed until now (epidermodysplasia verruciformis). Arch. Dermatol. Syphilol. 1922;141, 193–203.
11. Jablonska S, Milewski B. Information on epidermodysplasia verruciformis Lewandowsky-Lutz; positive results of auto- and heteroinoculation. Dermatologica. 1957 Jul;115(1):1–22.
12. Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. Cancer Res. 1972 Mar;32(3):583–9.

13.Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzesa G. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. Proc Natl Acad Sci USA. 1978 Mar;75(3):1537–41.
14. Jablonska S, Orth G, Jarzabek-Chorzelska M, Rzesa G, Obalek S, Glinski W, i sur. Immunological studies in epidermodysplasia verruciformis. Bull Cancer. 1978;65(2):183–90.
15. Orth G, Jablonska S, Breitburd F, Favre M, Croissant O. The human papillomaviruses. Bull Cancer. 1978;65(2):151–64.
16. Jablonska S, Orth G, Jarzabek-Chorzelska M, Rzesa G, Obałek S, Glinski W, i sur. Epidermodysplasia verruciformis versus disseminated verrucae planae: is epidermodysplasia verruciformis a generalized infection with wart virus? J Invest Dermatol. 1979 Mar;72(3):114–9.
17. Jablonska S, Orth G, Jarzabek-Chorzelska M, Obalek S, Rzesa G, Croissant O, i sur. New developments relating to papillomaviruses. Hautarzt. 1979 Aug;30(8):411–7.
18. Orth G, Jablonska S, Jarzabek-Chorzelska M, Obalek S, Rzesa G, Favre M, i sur. Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. Cancer Res. 1979 Mar;39(3):1074–82.
19. Jablonska S, Orth G. Epidermodysplasia verruciformis. Clin Dermatol. 1985 Dec;3(4):83–96.
20. Jablonska S, Orth G, Obalek S, Croissant O. Cutaneous warts. Clinical, histologic, and virologic correlations. Clin Dermatol. 1985 Dec;3(4):71–82.
21. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. J. Virol. 1977;24:108–20.
22. Orth G, Favre M. Human papillomaviruses. Biochemical and biologic properties. Clin Dermatol. 1985 Dec;3(4):27–42.
23. Orth G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. Ciba Found Symp. 1986;120:157–74.
24. Jablońska S, Obalek S, Favre M, Golebiowska A, Croissant O, Orth G. The morphology of butchers' warts as related to papillomavirus types. Arch Dermatol Res. 1987;279 Suppl:S66-72.
25. Jablonska S, Majewski S. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. Curr Top Microbiol Immunol. 1994;186:157–75.

26. Jabłońska S, Majewski S, Obalek S, Orth G. Cutaneous warts. Clin Dermatol. 1997 Jun;15(3):309–19.
27. Jablonska, S. Traditional therapies for the treatment of condylomata acuminata (genital warts). Australas. J. Dermatol. 1998; 39 (Suppl.), S2–S4.
28. Orth G, Favre M, Majewski S, Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis defines a subset of cutaneous human papillomaviruses. J Virol. 2001 May;75(10):4952–3.
29. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, i sur. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature. 1970 Dec 12;228(5276):1056–8.
30. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H. Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus-free" line of Burkitt tumour cells. Nature. 1970 Jul 18;227(5255):245–8.
31. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-secific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. Int J Cancer. 1974 May 15;13(5):650–6.
32. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dörries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. Int J Cancer. 1974 May 15;13(5):657–64.
33. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. Bibl Haematol. 1975 Oct;(43):569–71.
34. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res. 1976;36(2 pt 2):794.
35. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr Top Microbiol Immunol. 1977;78:1–30.
36. Gissmann L, zur Hausen H. Human papilloma viruses: Physical mapping and genetic heterogeneity. Proc. natl Acad. Sci. USA. 1976;73:1310–13.
37. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). Int J Cancer. 1980 May 15;25(5):605–9.
38. Gissmann L, deVilliers EM, zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. Int J Cancer. 1982 Feb 15;29(2):143–6.
39. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. J Virol. 1982 Oct;44(1):393–400.

40. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA. 1983 Jun;80(12):3812–5.
41. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Jan;80(2):560–3.
42. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J. 1984 May;3(5):1151–7.
43. Gissmann L, Boshart M, Dürst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. J Invest Dermatol. 1984 Jul;83(1 Suppl):26s–8s.
44. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. Acta Cytol. 1976 Dec;20(6):505–9.
45. Meisels A., Fortin R., Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic, and histopathologic study. Acta Cytol. 1977;21:379–390.
46. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. Acta Cytol. 1977 Feb;21(1):26–31.
47. Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. Tumori. 1978 Oct 31;64(5):549–53.
48. Laverty CR, Russell P, Hills E, Booth N. The significance of noncondylomatous wart virus infection of the cervical transformation zone. A review with discussion of two illustrative cases. Acta Cytol. 1978 Aug;22(4):195–201.
49. Schneider V, Kay S, Lee HM. Immunosuppression as a high-risk factor in the development of condyloma acuminatum and squamous neoplasia of the cervix. Acta Cytol. 1983 Jun;27(3):220–4.
50. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, i sur. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature. 1985 Mar 7;314(6006):111–4.
51. Schneider A, Oltersdorf T, Schneider V, Gissmann L. Distribution pattern of human papilloma virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections. Int J Cancer. 1987 Jun 15;39(6):717–21.

52. de Villiers EM, Schneider A, Gross G, zur Hausen H. Analysis of benign and malignant urogenital tumors for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. Med Microbiol Immunol. 1986;174(6):281–6.
53. Mincheva A, Gissmann L, zur Hausen H. Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. Med Microbiol Immunol. 1987;176(5):245–56.
54. De Villiers EM, Hirsch-Behnam A, Von Knebel-Doeberitz C, Neumann C, zur Hausen H. Two newly identified human papillomavirus types (HPV 40 and 57) isolated from mucosal lesions. Virology. 1989 Jul 1;171(1):248–53.
55. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology. 1991 Sep;184(1):9–13.
56. de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Munz F, Miklaw H, i sur. Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of a 5-year follow-up study. Gynecol Oncol. 1992 Jan;44(1):33–9.
57. Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, Das DK, Singh V, Gissmann L, i sur. A high frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction. J Med Virol. 1992 Apr;36(4):239–45.
58. Dürst M, Seagon S, Wanschura S, zur Hausen H, Bullerdiek J. Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPKIA) in vitro. Cancer Genet Cytogenet. 1995 Dec;85(2):105–12.
59. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta. 1996 Oct 9;1288(2):F55-78.
60. zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. Semin Cancer Biol. 1999 Dec;9(6):405–11.
61. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):342–50.
62. de Villiers EM, Fauquet, C, Broker, TR., Bernard, HU, zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004; 324, 17–27.
63. Michels KB, zur Hausen H. HPV vaccine for all. Lancet. 2009 Jul 25;374(9686):268–70.
64. zur Hausen H, Mammas IN, Spandidos DA. HPV vaccination in boys: Determining the clinical relevance of this strategy. Exp Ther Med. 2017 Oct;14(4):3327–8.

65. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, i sur. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. N Engl J Med. 2002 Nov 21;347(21):1645–51.
66. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, i sur. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. Lancet. 2004 Nov 13;364(9447):1757–65.
67. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki A-B, Romanowski B, Roteli-Martins CM, i sur. Sustained efficacy up to 4·5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. The Lancet. 2006 Apr 15;367(9518):1247–55.
68. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, i sur. Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. Vaccine. 2012 Nov 20;30:F24–33.
69. Sabeena S, Bhat P, Kamath V, Arunkumar G. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2017;43(3):429–35.
70. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papilomavirus DNA. Virology Journal. 2009 Jun 21;6(1):83.
71. Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK, Goldman D, Kuypers J, Kiviat NB, i sur. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: Results from a prospective cohort study. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 1998 Feb 1;178(2):365–73.
72. Ryndock EJ, Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? Expert Review of Anti-infective Therapy. 2014 Oct 1;12(10):1165–70.
73. Palefsky JM. HPV Infection in Men. Dis Markers. 2007;23(4):261–72.
74. Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kjaer SK, i sur. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, in Cancers other than Cervical and in Benign Conditions. Vaccine. 2008 Aug 19;26(0 10):K17–28.
75. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. J Infect Dis. 2006 Oct 15;194(8):1044–57.

76. Nielson CM, Harris RB, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Flores R, i sur. Risk factors for anogenital human papillomavirus infection in men. J Infect Dis. 2007 Oct 15;196(8):1137–45.
77. Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee J-H, i sur. The Human Papillomavirus Infection in Men Study: Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution among Men Residing in Brazil, Mexico, and the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Aug;17(8):2036–43.
78. Giuliano AR, Lazcano E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee J-H, i sur. Circumcision and sexual behavior: factors independently associated with human papillomavirus detection among men in the HIM study. Int J Cancer. 2009 Mar 15;124(6):1251–7.
79. Colón-López V, Ortiz AP, Palefsky J. Burden of Human Papillomavirus Infection and Related Comorbidities in Men: Implications for Research, Disease Prevention and Health Promotion among Hispanic Men. P R Health Sci J. 2010 Sep;29(3):232–40.
80. Skoulakis A, Fountas S, Mantzana-Peteinelli M, Pantelidi K, Petinaki E. Prevalence of human papillomavirus and subtype distribution in male partners of women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a systematic review. BMC Infect Dis [Internet]. 2019 Feb 26 [pristupljeno 24.01.2020.];19. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6390310/
81. Rodríguez-Álvarez MI, Gómez-Urquiza JL, Husein-El Ahmed H, Albendín-García L, Gómez-Salgado J, Cañadas-De la Fuente GA. Prevalence and Risk Factors of Human Papillomavirus in Male Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Environ Res Public Health. 2018 10;15(10).
82. Dinh T-H, Sternberg M, Dunne EF, Markowitz LE. Genital warts among 18- to 59-year-olds in the United States, national health and nutrition examination survey, 1999-2004. Sex Transm Dis. 2008 Apr;35(4):357–60.
83. Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, i sur. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. J Infect Dis. 2007 Oct 15;196(8):1146–52.
84. Giuliano AR, Anic G, Nyitray AG. Epidemiology and pathology of HPV disease in males. Gynecologic oncology. 2010 May;117(2 0):S15.
85. Giuliano AR, Lu B, Nielson CM, Flores R, Papenfuss MR, Lee JH, i sur. Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men. J Infect Dis. 2008 Sep 15;198(6):827–35.

86. Lu B, Wu Y, Nielson CM, Flores R, Abrahamsen M, Papenfuss M, i sur. Factors associated with acquisition and clearance of human papillomavirus infection in a cohort of US men: a prospective study. J Infect Dis. 2009 Feb 1;199(3):362–71.
87. Campion MJ, Singer A, Clarkson PK, McCance DJ. Increased risk of cervical neoplasia in consorts of men with penile condylomata acuminata. Lancet. 1985 Apr 27;1(8435):943–6.
88. Van Doornum GJ, Prins M, Juffermans LH, Hooykaas C, van den Hoek JA, Coutinho RA, et al. Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners: a prospective study. Genitourin Med. 1994 Aug;70(4):240–6.
89. Giuliano AR, Lazcano E, Villa LL. Factors associated with HPV detection among men internationally: The HIM Study. Apstrakt 8B-04. 24th Međunarodna konferencija i radionica Papillomavirusa; Studeni 2007; Peking, Kina. (Knjiga apstrakata)
90. Wang CJ, Palefsky JM. Human Papillomavirus (HPV) Infections and the Importance of HPV Vaccination. Curr Epidemiol Rep. 2015 Jun;2(2):101–9
91. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. Prev Med. 2011 Oct;53 Suppl 1:S12-21.
92. Ljubojevic S, Skerlev M. HPV-associated diseases. Clin Dermatol. 2014 Apr;32(2):227–34.
93. Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. Med Microbiol Immunol. 2004 Feb;193(1):35–44.
94. Palefsky JM. Human Papillomavirus-Related Disease in Men: Not Just a Women's Issue. J Adolesc Health. 2010 Apr;46(4 Suppl):S12–9.
95. Diorio GJ, Giuliano AR. The Role of Human Papilloma Virus in Penile Carcinogenesis and Preneoplastic Lesions: A Potential Target for Vaccination and Treatment Strategies. Urol Clin North Am. 2016 Nov;43(4):419–25.
96. Johnson LG, Madeleine MM, Newcomer LM, Schwartz SM, Daling JR. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. Cancer. 2004 Jul 15;101(2):281–8.
97. Varnai AD, Bollmann M, Griefingholt H, Speich N, Schmitt C, Bollmann R, i sur. HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN). Impact of

HPV analysis of anal lesions on diagnosis and prognosis. Int J Colorectal Dis. 2006 Mar;21(2):135–42.

98. D'Souza G, Wiley DJ, Li X, Chmiel JS, Margolick JB, Cranston RD, i sur. Incidence and epidemiology of anal cancer in the Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Aug 1;48(4):491–9.
99. Piketty C, Selinger-Leneman H, Grabar S, Duvivier C, Bonmarchand M, Abramowitz L, et al. Marked increase in the incidence of invasive anal cancer among HIV-infected patients despite treatment with combination antiretroviral therapy. AIDS. 2008 Jun 19;22(10):1203–11.
100. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, i sur. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 2007 May 10;356(19):1944-56.
101. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, i sur. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. Oral Oncol. 2008 Mar;44(3):242-50.
102. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Feb;14(2):467-75.
103. Ryerson AB, Peters ES, Coughlin SS, Chen VW, Gillison ML, Reichman ME, i sur. Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998-2003. Cancer. 2008 Nov 15;113(10 Suppl):2901-9.
104. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, i sur. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. J Natl Cancer Inst. 2003 Dec 3;95(23):1772–83.
105. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol. 2010 Aug;11(8):781–9.
106. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? Cancer. 2007 Oct 1;110(7):1429–35.
107. Lohavanichbutr P, Houck J, Fan W, Yueh B, Mendez E, Futran N, i sur. Genomewide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2009 Feb;135(2):180–8.

108. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. Evol Med Public Health. 2015 Jan 1;2015(1):32–51.
109. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol. 2015 Mar;25(Suppl Suppl 1):2–23.
110. Graham SV. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. Viruses [Internet]. 2017 Aug 30 [pristupljeno 17.02.2020.];9(9). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618011/
111. Wakabayashi R, Nakahama Y, Nguyen V, Espinoza JL. The Host-Microbe Interplay in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. Microorganisms [Internet]. 2019 Jul 13 [pristupljeno 17.02.2020.];7(7). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6680694/
112. Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. Front Oncol [Internet]. 2019 Aug 2 [pristupljeno 17.02.2020];9. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688195/
113. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, i sur. Carcinogenicity of human papillomaviruses. Lancet Oncol. 2005 Apr;6(4):204.
114. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Jun;68(2):362–72.
115. Klingelhutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. Virology. 2012 Mar 15;424(2):77–98.
116. Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General Acquisition of Human Papillomavirus Infections of Skin Occurs in Early Infancy. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2509–14.
117. Bravo IG, de Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. Trends in Microbiology 2010; 18(10): 432–8.
118. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. Virology. 2010 May 25;401(1):70–9.
119. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. Virology. 2013 Oct;445(1–2):2–10.

120. Alizon S, Murall CL, Bravo IG. Why Human Papillomavirus Acute Infections Matter. Viruses [Internet]. 2017 Oct 10 [pristupljeno 19.02.2020];9(10). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5691644/
121. Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. J Clin Invest. 2011 Dec 1;121(12):4593–9.
122. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, i sur. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.
123. Giuliano AR, Lee J-H, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, i sur. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. Lancet. 2011 Mar 12;377(9769):932–40.
124. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. Curr Opin Virol. 2013 Aug;3(4):416–21.
125. Moreira ED, Giuliano AR, Palefsky J, Flores CA, Goldstone S, Ferris D, i sur. Incidence, clearance, and disease progression of genital human papillomavirus infection in heterosexual men. J Infect Dis. 2014 Jul 15;210(2):192–9.
126. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. Virology. 2011 Jun 5;414(2):153–63.
127. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. Nat Rev Cancer. 2010 Dec;10(12):878–89.
128. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.
129. Maglennon GA, McIntosh PB, Doorbar J. Immunosuppression facilitates the reactivation of latent papillomavirus infections. J Virol. 2014 Jan;88(1):710–6.
130. Giuliano AR, Viscidi R, Torres BN, Ingles DJ, Sudenga SL, Villa LL, i sur. Seroconversion following anal and genital HPV infection in men: The HIM study. Papillomavirus Res. 2015 Jun 30;1:109–15.
131. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, i sur. EUROGIN 2014 Roadmap: Differences in HPV infection natural history, transmission, and HPV-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. Int J Cancer. 2015 Jun 15;136(12):2752–60.
132. Mooij SH, van der Klis FRM, van der Sande MAB, Schepp RM, Speksnijder AGCL, Bogaards JA, i sur. Seroepidemiology of high-risk HPV in HIV-negative and HIV-

infected MSM: the H2M study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013 Oct;22(10):1698–708.

133. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, i sur. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. J Infect Dis. 2000 Jun;181(6):1911–9.
134. Edelstein ZR, Carter JJ, Garg R, Winer RL, Feng Q, Galloway DA, i sur. Serum Antibody Response Following Genital α9 Human Papillomavirus Infection in Young Men. J Infect Dis. 2011 Jul 15;204(2):209–16.
135. Mortensen GL, Larsen HK. The quality of life of patients with genital warts: a qualitative study. BMC Public Health. 2010 Mar 7;10:113.
136. Sénécal M, Brisson M, Maunsell E, Ferenczy A, Franco EL, Ratnam S, i sur. Loss of quality of life associated with genital warts: baseline analyses from a prospective study. Sex Transm Infect. 2011 Apr;87(3):209–15.
137. Woodhall S, Ramsey T, Cai C, Crouch S, Jit M, Birks Y, i sur. Estimation of the impact of genital warts on health-related quality of life. Sex Transm Infect. 2008 Jun;84(3):161–6.
138. de Camargo CC, D'Elia MPB, Miot HA. Quality of life in men diagnosed with anogenital warts. An Bras Dermatol. 2017;92(3):427–9.
139. Drolet M, Brisson M, Maunsell E, Franco EL, Coutlée F, Ferenczy A, i sur. The impact of anogenital warts on health-related quality of life: a 6-month prospective study. Sex Transm Dis. 2011 Oct;38(10):949–56.
140. Lee TS, Kothari-Talwar S, Singhal PK, Yee K, Kulkarni A, Lara N, i sur. Cross-sectional study estimating the psychosocial impact of genital warts and other anogenital diseases in South Korea. BMJ Open. 2019 20;9(3):e025035.
141. Dediol I, Buljan M, Vurnek-A, Ivković M, Bulat V, Šitum M, Čubrilović A. Psychological burden of anogenital warts. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009 Sep;23(9):1035–8.
142. Gross G. Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. U: Gross G, Tyring SK, editors. Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011 [pristupljeno 19.02.2020.]. Dostupno na: https://www.springer.com/gp/book/9783642146626Gross G. Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. Curr Probl Dermatol. 2014;45:98–122.

143. Gamoudi D, Flew S, Cusini M, Benardon S, Poder A, Radcliffe K. 2018 European guideline on the organization of a consultation for sexually transmitted infections. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33(8):1452-1458

144. Engelsgjerd JS, LaGrange CA. Penile Cancer [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [pristupljeno 2021 Jul 26]. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499930/

145. Flores R, Abalos AT, Nielson CM, Abrahamsen M, Harris RB, Giuliano AR. Reliability of sample collection and laboratory testing for HPV detection in men. J Virol Methods. 2008 Apr;149(1):136–43.

146. Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozenčić J, Pavelić K. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. Anticancer Res. 2000 Jun;20(3B):2097–102.

147. Skerlev M, Grce M, Sirotković-Skerlev M, Husnjak K, Lipozenčić J. Human papillomavirus male genital infections: clinical variations and the significance of DNA typing. Clin Dermatol. 2002 Apr;20(2):173–8.

148. Hippeläinen M, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjänen S, Syrjänen K. Genital human papillomavirus lesions of the male sexual partners: the diagnostic accuracy of peniscopy. Genitourin Med. 1991 Aug;67(4):291–6.

149. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. Expert Rev Mol Med. 2017 06;19:e1.

150. Weaver BA, Feng Q, Holmes KK, Kiviat N, Lee S-K, Meyer C, i sur. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. J Infect Dis. 2004 Feb 15;189(4):677–85.

151. Peyton CL, Schiffman M, Lörincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, i sur. Comparison of PCR- and Hybrid Capture-Based Human Papillomavirus Detection Systems Using Multiple Cervical Specimen Collection Strategies. J Clin Microbiol. 1998 Nov;36(11):3248–54.

152. Cook DA, Mei W, Smith LW, van Niekerk DJ, Ceballos K, Franco EL, i sur. Comparison of the Roche cobas® 4800 and Digene Hybrid Capture® 2 HPV tests for primary cervical cancer screening in the HPV FOCAL trial. BMC Cancer [Internet].

2015 Dec 16 [pristupljeno 21.02.2020.];15. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682219/

153. Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lörincz AT, Burk RD, i sur. Comparison of the Hybrid Capture Tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. J Clin Microbiol. 1997;35:2262–65.
154. Manos MM, Ting Y, Wright DK. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: Furth M, Greaves M (eds), Molecular diagnostics of human cancer: Cancer cells. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 209–14.
155. Gravitt PE, Manos MM. Polymerase chain reactionbased methods for the detection of human papillomavirus DNA. In: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (ur.), The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. Lyon: IARC, 1992: 121–33.
156. INNO-LiPA® HPV Genotyping Extra II | Fujirebio [Internet]. Package insert [pristupljeno 21.02.2020.]. Dostupno na: https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/innolipar-hpv-genotyping-extra-ii
157. Xu L, Padalko E, Oštrbenk A, Poljak M, Arbyn M. Clinical Evaluation of INNO-LiPA HPV Genotyping EXTRA II Assay Using the VALGENT Framework. Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Sep 11 [pristupljeno 21.02. 2020.];19(9). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165258/
158. Pennycook KB, McCready TA. Condyloma Acuminata. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Aug 26]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547667/
159. O'Mahony C, Gomberg M, Skerlev M, Alraddadi A, de las Heras-Alonso ME, Majewski S, i sur. Position statement for the diagnosis and management of anogenital warts. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019 Jun;33(6):1006–19.
160. Skerlev M, Čulav Košćak I, Basarovski J, Stanimirović A. Antiviral Drugs. U: European Handbook of Dermatological Treatments. Katsambas A, Lotti T, Dessinioti C, D'Erme A.M. (ur.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015: 1381-92.
161. Gilson R, Nugent D, Werner RN, Ballesteros J, Ross J. 2019 IUSTI-Europe guideline for the management of anogenital warts. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020;34(8):1644-1653.

162. Schöfer H, Tatti S, Lynde CW, Skerlev M, Hercogová J, Rotaru M, i sur. Sinecatechins and imiquimod as proactive sequential therapy of external genital and perianal warts in adults. Int J STD AIDS. 2017;28(14):1433–43.
163. Puviani M, Galluzzo M, Talamonti M, Mazzilli S, Campione E, Bianchi L, i sur. Efficacy of sinecatechins 10% as proactive sequential therapy of external genital warts after laser CO2 ablative therapy: The PACT study (post-ablation immunomodulator treatment of condylomata with sinecatechins): a randomized, masked outcome assessment, multicenter trial. Int J STD AIDS. 2019;30(2):131–6.
164. Wolf R, Davidovici B, Skerlev M. Is it justifiable to treat condylomata acuminata down to the very last visible papule? Skinmed. 2007 Aug;6(4):194–6.
165. Skerlev M, Čulav Košćak I, Ljubojević Hadžavdić S, Sirotković-Skerlev M. Imiquimod. U: European Handbook of Dermatological Treatments. Katsambas A, Lotti T, Dessinioti C, D'Erme A.M. (ur.). Springer-Verlag Belin Heidelberg. 2015: 1465-1471.
166. Skerlev M. HPV-Genital Infections, Men and the HPV Vaccine: New Horizons. Medicus. 2009 Feb 19;18(1_Spolno prenosive b):49–53.
167. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira ED, Penny ME, Aranda C, i sur. Efficacy of Quadrivalent HPV Vaccine against HPV Infection and Disease in Males. New England Journal of Medicine. 2011 Feb 3;364(5):401–11.
168. Dochez C, Bogers JJ, Verhelst R, Rees H. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. Vaccine. 2014 Mar 20;32(14):1595–601.
169. Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Chen MY, Donovan B, Bradshaw CS. Rapid decline in presentations of genital warts after the implementation of a national quadrivalent human papillomavirus vaccination programme for young women. Sex Transm Infect. 2009 Dec;85(7):499–502.
170. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira ED, Aranda C, Jessen H, i sur. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. N Engl J Med. 2011 Oct 27;365(17):1576–85.
171. Wilkin T, Lee JY, Lensing SY, Stier EA, Goldstone SE, Berry JM, i sur. Safety and immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in HIV-1-infected men. J Infect Dis. 2010 Oct 15;202(8):1246–53.
172. FUTURE I/II Study Group, Dillner J, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen O-E, i sur. Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent

vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial. BMJ. 2010 Jul 20;341:c3493.

173. Donovan B, Franklin N, Guy R, Grulich AE, Regan DG, Ali H, i sur. Quadrivalent human papillomavirus vaccination and trends in genital warts in Australia: analysis of national sentinel surveillance data. Lancet Infect Dis. 2011 Jan;11(1):39–44.
174. Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, i sur. Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. JAMA. 2007 Aug 15;298(7):743–53.
175. Van de Velde N, Boily MC, Drolet M, Franco EL, Mayrand MH, Kliewer EV, i sur. Population-level impact of the bivalent, quadrivalent, and nonavalent human papillomavirus vaccines: a model-based analysis. J Natl Cancer Inst. 2012 Nov 21;104(22):1712–23.
176. Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, i sur. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. Lancet Oncol. 2005 May;6(5):271–8.
177. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, i sur. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. N Engl J Med. 2007 May 10;356(19):1928–43.
178. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. N Engl J Med. 2007 May 10;356(19):1915–27.
179. Cheng L, Wang Y, Du J. Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review. Vaccines (Basel) [Internet]. 2020 Jul 16 [pristupljeno 24.11.2020.];8(3). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7565290/
180. Schellenbacher C, Roden R, Kirnbauer R. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. J Virol. 2009 Oct;83(19):10085–95.
181. Huber B, Schellenbacher C, Shafti-Keramat S, Jindra C, Christensen N, Kirnbauer R. Chimeric L2-Based Virus-Like Particle (VLP) Vaccines Targeting Cutaneous Human Papillomaviruses (HPV). PLoS One. 2017;12(1):e0169533.
182. Malagón T, Drolet M, Boily MC, Franco EL, Jit M, Brisson J, i sur. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2012 Oct;12(10):781–9.

183. Markowitz LE, Hariri S, Lin C, Dunne EF, Steinau M, McQuillan G, i sur. Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003-2010. J Infect Dis. 2013 Aug 1;208(3):385–93.
184. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X, i sur. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. Lancet Oncol. 2012 Jan;13(1):89–99.
185. Castle PE, Maza M. Prophylactic HPV vaccination: past, present, and future. Epidemiol Infect. 2016 Feb;144(3):449–68.
186. Baussano I, Lazzarato F, Brisson M, Franceschi S. Human Papillomavirus Vaccination at a Time of Changing Sexual Behavior. Emerg Infect Dis. 2016 Jan;22(1):18–23.
187. Drolet M, Bénard É, Pérez N, Brisson M, HPV Vaccination Impact Study Group. Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. Lancet. 2019 10;394(10197):497–509.
188. Prue G, Baker P, Graham D, Nutting C, Greenhouse P, Lawler M. It is time for universal HPV vaccination. Lancet. 2018 15;392(10151):913–4.
189. Guidance on HPV vaccination in EU countries: focus on boys, people living with HIV and 9-valent HPV vaccine introduction [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2020 [pristupljeno 24.11.2020.]. Dostupno na: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidance-hpv-vaccination-eu-focus-boys-people-living-hiv-9vHPV-vaccine
190. Sonawane K, Suk R, Chiao EY, Chhatwal J, Qiu P, Wilkin T, i sur. Oral Human Papillomavirus Infection: Differences in Prevalence Between Sexes and Concordance With Genital Human Papillomavirus Infection, NHANES 2011 to 2014. Ann Intern Med. 2017 Nov 21;167(10):714–24.
191. D'Souza G, McNeel TS, Fakhry C. Understanding personal risk of oropharyngeal cancer: risk-groups for oncogenic oral HPV infection and oropharyngeal cancer. Ann Oncol. 2017 Dec 1;28(12):3065–9.
192. Bogaards JA, Wallinga J, Brakenhoff RH, Meijer CJLM, Berkhof J. Direct benefit of vaccinating boys along with girls against oncogenic human papillomavirus: bayesian evidence synthesis. BMJ [Internet]. 2015 May 12 [pristupljeno 5.03.2020.];350. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428278/

193. Elfström KM, Lazzarato F, Franceschi S, Dillner J, Baussano I. Human Papillomavirus Vaccination of Boys and Extended Catch-up Vaccination: Effects on the Resilience of Programs. J Infect Dis. 2016 Jan 15;213(2):199–205.
194. Chesson HW, Ekwueme DU, Saraiya M, Dunne EF, Markowitz LE. The cost-effectiveness of male HPV vaccination in the United States. Vaccine. 2011 Oct 26;29(46):8443–50.
195. Datta S, Pink J, Medley GF, Petrou S, Staniszewska S, Underwood M, i sur. Assessing the cost-effectiveness of HPV vaccination strategies for adolescent girls and boys in the UK. BMC Infect Dis. 2019 Jun 24;19(1):552.
196. Giuliano AR, Joura EA, Garland SM, Huh WK, Iversen O-E, Kjaer SK, i sur. Nine-valent HPV vaccine efficacy against related diseases and definitive therapy: comparison with historic placebo population. Gynecol Oncol. 2019;154(1):110–7.
197. Saadeh K, Park I, Gargano JW, Whitney E, Querec TD, Hurley L, i sur. Prevalence of human papillomavirus (HPV)-vaccine types by race/ethnicity and sociodemographic factors in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3/AIS), Alameda County, California, United States. Vaccine. 2020 03;38(1):39–45.
198. Guevara AM, Suarez E, Victoria A, Ngan HY, Hirschberg AL, Fedrizzi E, i sur. Maternal transfer of anti HPV 6 and 11 antibodies upon immunization with the 9-valent HPV vaccine. Hum Vaccin Immunother. 2018 Sep 27;15(1):141–5.
199. Roden RBS, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. Nat Rev Cancer. 2018;18(4):240–54.
200. Phillips A, Patel C, Pillsbury A, Brotherton J, Macartney K. Safety of Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review. Drug Saf. 2018 Apr;41(4):329–46.
201. Ferris DG, Samakoses R, Block SL, Lazcano-Ponce E, Restrepo JA, Mehlsen J, i sur. 4-Valent Human Papillomavirus (4vHPV) Vaccine in Preadolescents and Adolescents After 10 Years. Pediatrics. 2017 Dec;140(6).
202. Huh WK, Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, de Andrade RP, Ault KA, i sur. Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16-26 years: a randomised, double-blind trial. Lancet. 2017 Nov 11;390(10108):2143–59.
203. Gonçalves AK, Cobucci RN, Rodrigues HM, de Melo AG, Giraldo PC. Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review. Braz J Infect Dis. 2014 Dec;18(6):651–9.

204. Descamps D, Hardt K, Spiessens B, Izurieta P, Verstraeten T, Breuer T, i sur. Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: a pooled analysis of 11 clinical trials. Hum Vaccin. 2009 May;5(5):332–40.
205. Arnheim-Dahlström L, Pasternak B, Svanström H, Sparén P, Hviid A. Autoimmune, neurological, and venous thromboembolic adverse events after immunisation of adolescent girls with quadrivalent human papillomavirus vaccine in Denmark and Sweden: cohort study. BMJ. 2013 Oct 9;347:f5906.
206. Garland SM, Brotherton JML, Skinner SR, Pitts M, Saville M, Mola G, i sur. Human papillomavirus and cervical cancer in Australasia and Oceania: risk-factors, epidemiology and prevention. Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 12:M80-88.
207. Ben Hadj Yahia MB, Jouin-Bortolotti A, Dervaux B. Extending the Human Papillomavirus Vaccination Programme to Include Males in High-Income Countries: A Systematic Review of the Cost-Effectiveness Studies. Clin Drug Investig. 2015 Aug;35(8):471–85.
208. Drolet M, Bénard É, Boily M-C, Ali H, Baandrup L, Bauer H, i sur. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2015 May;15(5):565–80.
209. Brisson M, Bénard É, Drolet M, Bogaards JA, Baussano I, Vänskä S, i sur. Population-level impact, herd immunity, and elimination after human papillomavirus vaccination: a systematic review and meta-analysis of predictions from transmission-dynamic models. Lancet Public Health. 2016 Nov;1(1):e8–17.
210. Patel C, Brotherton JM, Pillsbury A, Jayasinghe S, Donovan B, Macartney K, i sur. The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? Euro Surveill [Internet]. 2018 Oct 11 [pristupljeno 5.03.2020.];23(41). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194907/
211. Bastian H. What the systematic review of HPV vaccine clinical study reports does, and does not, reveal: commentary on Jørgensen et al. Syst Rev [Internet]. 2020 Feb 28 [pristupljeno 5.03.2020.];9. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7047360/
212. Effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccine for the prevention of cervical abnormalities: case-control study nested within a population based screening programme in Australia [Internet]. [pristupljeno 5.03.2020.]. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942076/

213. Jørgensen L, Gøtzsche PC, Jefferson T. Benefits and harms of the human papillomavirus (HPV) vaccines: systematic review with meta-analyses of trial data from clinical study reports. Systematic Reviews. 2020 Feb 28;9(1):43.
214. Jørgensen L, Gøtzsche PC, Jefferson T. Benefits and harms of the human papillomavirus (HPV) vaccines: comparison of trial data from clinical study reports with corresponding trial register entries and journal publications. Systematic Reviews. 2020 Feb 28;9(1):42.
215. National Health and Nutrition Survey. Human Papillomavirus in vaginal swab. NHANES 2003-2004. Public release dataset information. Dostupno na: https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2003-2004/labmethods/l37_c_met_-hybrid_capture.pdf
216. National Health and Nutrition Survey. Human Papillomavirus in vaginal swab. NHANES 2003-2004. Public release dataset information [Internet]. [pristupljeno 5.03.2020.]. Dostupno na: https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2003-2004/labmethods/l37_c_met_-hybrid_capture.pdf
217. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, i sur. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis. 1994 Nov;170(5):1077–85.
218. Anic GM, Lee J, Stockwell H, Rollison DE, Wu Y, Papenfuss MR, i sur. Incidence and Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution of Genital Warts in a Multinational Cohort of Men: The HPV in Men Study. J Infect Dis. 2011 Dec 15;204(12):1886–92.
219. Wikström A, Vassilaki I, Hedblad MA, Syrjänen S. The spectrum of genital human papillomavirus infection among men attending a Swedish sexually-transmitted infections clinic: human papillomavirus typing and clinical presentation of histopathologically benign lesions. Acta Derm Venereol. 2013 Mar 27;93(2):223–7.
220. Nonogaki S, Wakamatsu A, Longatto Filho A, Pereira SMM, Utagawa ML, Ferreira Alves VA, i sur. Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identifying HPV infections in samples collected in a new collection medium: a comparison. Acta Cytol. 2004 Aug;48(4):514–20.
221. Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV detection methods. Dis Markers. 2007;23(4):273–81.

222. Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, Kendall H, Fishman S, Dong H, i sur. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. J Med Virol. 2002 Nov;68(3):417–23.
223. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. J Clin Virol. 2002 Dec;25 Suppl 3:S89-97.
224. Hebnes JB, Munk C, Nøhr B, Nielsen A, Jørgensen HO, Iftner T, i sur. Human Papillomavirus Infection Among 2460 Men in Denmark: Prevalence in Relation to Age Using 2 Human Papillomavirus DNA Testing Methods. Sex Transm Dis. 2015 Aug;42(8):463–7.
225. Bihl MP, Tornillo L, Kind AB, Obermann E, Noppen C, Chaffard R, i sur. Human Papillomavirus (HPV) Detection in Cytologic Specimens: Similarities and Differences of Available Methodology. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017 Mar;25(3):184–9.
226. Luu HN, Adler-Storthz K, Dillon LM, Follen M, Scheurer ME. Comparing the Performance of Hybrid Capture II and Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Identification of Cervical Dysplasia in the Screening and Diagnostic Settings. Clin Med Insights Oncol. 2013;7:247–55.
227. Baleriola C, Millar D, Melki J, Coulston N, Altman P, Rismanto N, i sur. Comparison of a novel HPV test with the Hybrid Capture II (hcII) and a reference PCR method shows high specificity and positive predictive value for 13 high-risk human papillomavirus infections. J Clin Virol. 2008 May;42(1):22–6.
228. Bennetts LE, Wagner M, Giuliano AR, Palefsky JM, Steben M, Weiss TW. Associations of Anogenital Low-Risk Human Papillomavirus Infection With Cancer and Acquisition of HIV. Sex Transm Dis. 2015 Oct;42(10):541–4.
229. Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. Prev Med. 2011 Oct;53(Suppl 1):S36–41.
230. Chan PKS, Luk ACS, Luk TNM, Lee KF, Cheung JLK, Ho KM, i sur. Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. J Clin Virol. 2009 Feb;44(2):111–4.
231. Potočnik M, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Distribution of huma papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2007 Sep;16(3):91–6, 98.

232. Arroyo LS, Basaras M, Arrese E, Hernáez S, Esteban V, Cisterna R. Distribution of genital human papillomavirus genotypes in benign clinical manifestations among men from Northern Spain. BMC Public Health. 2016 Jan 27;16:81.

233. Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, i sur. Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution in Male Anogenital Sites and Semen. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Jun 1;16(6):1107–14.

234. Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jørgensen HO, Meijer CJLM, Brule AJC van den. Acquisition and Persistence of Human Papillomavirus Infection in Younger Men: A Prospective Follow-up Study among Danish Soldiers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Jun 1;14(6):1528–33.

235. Johansson H, Bzhalava D, Ekström J, Hultin E, Dillner J, Forslund O. Metagenomic sequencing of "HPV-negative" condylomas detects novel putative HPV types. Virology. 2013 May 25;440(1):1–7.

236. World Health Organisation. Human papillomavirus laboratory manual. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. 1. izd. Geneva, Švicarska. Studeni 2010. hpv_laboratory_manual__who_ivb_2009_2010.pdf [Internet]. [pristupljeno 24.01.2021]. Dostupno na: https://www.who.int/immunization/hpv/learn/hpv_laboratory_manual__who_ivb_2009_2010.pdf

237. Sichero L, Giuliano AR, Villa LL. Human Papillomavirus and Genital Disease in Men: What We Have Learned from the HIM Study. Acta Cytol. 2019;63(2):109–17.

238. Sichero L, Pierce Campbell CM, Ferreira S, Sobrinho JS, Baggio ML, Galan L, i sur. Broad HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study. Virology. 2013 Sep 1;443(2):214–7.

239. Smelov V, Muwonge R, Sokolova O, McKay-Chopin S, Eklund C, Komyakov B, i sur. Beta and gamma human papillomaviruses in anal and genital sites among men: prevalence and determinants. Scientific Reports. 2018 May 29;8(1):8241.

240. Pierce Campbell CM, Messina JL, Stoler MH, Jukic DM, Tommasino M, Gheit T, i sur. Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: a case series within the HPV Infection in Men Study. J Clin Virol. 2013 Dec;58(4):652–9.

241. Nunes EM, Sudenga SL, Gheit T, Tommasino M, Baggio ML, Ferreira S, i sur. Diversity of beta-papillomavirus at anogenital and oral anatomic sites of men: The HIM Study. Virology. 2016 Aug;495:33–41.
242. Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostoloza J, McKinney S, Sun C, i sur. The Oral Cavity Contains Abundant Known and Novel Human Papillomaviruses From the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus Genera. J Infect Dis. 2011 Sep 1;204(5):787–92.
243. Martinelli M, Zappa A, Bianchi S, Frati E, Colzani D, Amendola A, i sur. Human papillomavirus (HPV) infection and genotype frequency in the oral mucosa of newborns in Milan, Italy. Clin Microbiol Infect. 2012 Jun;18(6):E197-9.
244. Forslund O, Johansson H, Madsen KG, Kofoed K. The nasal mucosa contains a large spectrum of human papillomavirus types from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. J Infect Dis. 2013 Oct 15;208(8):1335–41.
245. Tornesello ML, Monaco R, Nappi O, Buonaguro L, Buonaguro FM. Detection of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in oesophagitis, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus. J Clin Virol. 2009 May;45(1):28–33.
246. Di Bonito P, Della Libera S, Petricca S, Iaconelli M, Sanguinetti M, Graffeo R, i sur. A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples. J Gen Virol. 2015 Mar;96(Pt 3):607–13.
247. Mlakar B, Kocjan BJ, Hošnjak L, Komloš KF, Milošević M, Poljak M. Betapapillomaviruses in HIV positive and HIV negative men who have seks with men. *J. Clin. Virol.* 2014; 61: 237-41.
248. Forslund O, Iftner T, Andersson K, et al. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. J Infect Dis. 2007;196(6):876-883.
249. Wikström A, Hedblad MA, Syrjänen S. Penile intraepithelial neoplasia: histopathological evaluation, HPV typing, clinical presentation and treatment. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012 Mar;26(3):325–30.
250. de Sousa IDB, Vidal FCB, Branco Vidal JPC, de Mello GCF, do Desterro Soares Brandão Nascimento M, i sur. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. BMC Urol. 2015 Feb 24;15:13.

11. Životopis

Ivana Čulav, rođena je 1. veljače 1983. u Splitu. Nakon završene gimnazije 2001. godine upisala je studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirala 2007. godine. Pripravnički staž obavljala je u periodu 2007.-2008. godine u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu. 2009. godine započela je specijalizaciju iz dermatovenerologije u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb tijekom koje je završila poslijediplomski stručni studij iz dermatovenerologije pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit iz dermatovenerologije položila je 2013. godine a specijalističko iskustvo stjecala je u Općoj bolnici "Dr. Ivo Pedišić" u Sisku na Odjelu za kožne i spolne bolesti. 2014. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij iz područja Biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Mihaela Skerleva s Katedre za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu objavila je više stručnih radova iz područja spolno prenosivih bolesti. Od 2017. godine radi u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Članica je Hrvatske liječničke komore i nekoliko stručnih društava pri Hrvatskom liječničkom zboru, kao i međunarodnih stručnih organizacija (European Academy of Dermatology and Venereology, European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Cochrane). Majka je dvoje djece Nike i Olivera.

Prilozi

„Alternativno“ grupiranje rezultata – preostali rezultati

Tablica 30. – Grupiranje kondiloma prema lokalizaciji

Genitalna i ekstragenitalna lokalizacija

Lokalizacija	**genitalno**	**ekstragenitalno**	**Ukupno**
perianalno	0	4	4
pubično	0	10	10
scrotum	0	2	2
ostalo	1	1	2
unutrašnji list prepucija	9	0	9
korpus penisa	19	0	19
radiks penisa	24	0	24
Ukupno	**53**	**17**	**70**

Tablica 31. – Grupiranje kondiloma prema lokalizaciji

Proksimalna i distalna genitalna regija

Lokalizacija	**distalna gr**	**proksimalna gr**	**Ukupno**
perianalno	0	4	4
pubično	0	10	10
radiks penisa	0	24	24
skrotum	0	2	2
drugo	1	1	2
unutrašnji list prepucija	9	0	9
korpus penisa	19	0	19
Ukupno	**29**	**41**	**70**

Analizirat će se grupiranje prema genitalnoj/ekstragenitalnoj regiji („G/EG“) odnosno proksimalnoj i distalnoj regiji („P/D“).

Tablica 32. – Srednja dob [g] ispitanika prema lokalizaciji kondiloma **[G/EG]**

Lokalizacija	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
G	30,68	53	8,62	28,30	33,06	24,00	28,00	36,00
EG	36,35	17	11,07	30,66	42,05	27,00	35,00	42,00

p = 0,052; Mann Whitney U test

Tablica 33. – Srednje trajanje [mj] bolesti prema lokalizaciji kondiloma **[G/EG]**

Lokalizacija	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
G	11,79	53	26,03	4,62	18,97	3,00	6,00	9,00
EG	25,10	17	56,53	-3,96	54,17	6,00	8,00	12,00

p = 0,063; Mann Whitney U test

Tablica 34. – Broj genotipova prema lokalizaciji kondiloma **[G/EG]**

Tip	**M**	**N**	**SD**	**DK**	**Med**	**GK**
G	1,15	53	0,66	1,00	1,00	1,00
EG	1,06	17	0,75	1,00	1,00	1,00

p = 0,465; Mann Whitney U test

Tablica 35. – Lokalizacija kondiloma prema genotipu HPV **[G/EG]**

	Lokalizacija	neg	vr	nr	nr i vr	**Ukupno**
N	**G**	5	3	37	8	53
%		9,43%	5,66%	69,81%	15,09%	
N	**EG**	3	1	11	2	17
%		17,65%	5,88%	64,71%	11,76%	
Ukupno		8	4	48	10	70

p = 0,907; hi-kvadrat test

Tablica 36. – Lokalizacija kondiloma prema genotipu HPV **[G/EG]**

	Lokalizacija	Vr	nr	**Ukupno**
N	**G**	11	37	48
%		22,92%	77,08%	
N	**EG**	3	11	14
%		21,43%	78,57%	
Ukupno		14	48	62

p = 0,906; hi-kvadrat test

Tablica 37. – Lokalizacija kondiloma prema HPV pozitivnosti partnera/ice **[G/EG]**

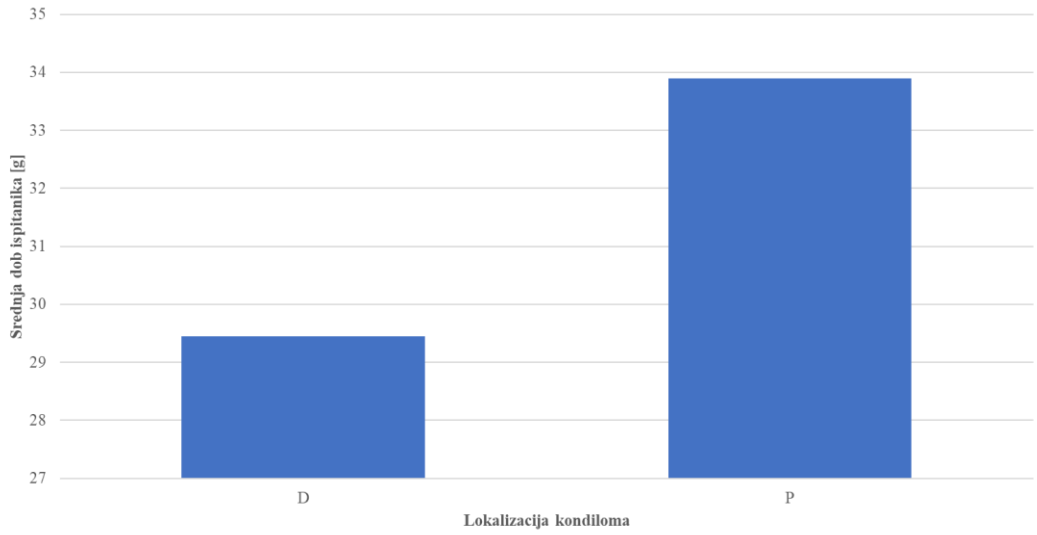
	Lokalizacija	Partner -	Partner +	**Ukupno**
N	**G**	37	16	53
%		69,81%	30,19%	
N	**EG**	13	4	17
%		76,47%	23,53%	
Ukupno		50	20	70

p = 0,597; hi-kvadrat test

Tablica 38. – Srednja dob [g] ispitanika prema lokalizaciji kondiloma **[P/D]**

Lokalizacija	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
D	29,45	29	7,84	26,47	32,43	24,00	27,00	31,00
P	33,90	41	10,23	30,67	37,13	25,00	33,00	42,00

p = 0,086; Mann Whitney U test



Slika 17. Srednja dob [g] ispitanika prema lokalizaciji kondiloma [P/D]

Tablica 39. – Srednje trajanje [mj] bolesti prema lokalizaciji kondiloma **[P/D]**

Lokalizacija	**M**	**N**	**SD**	**-95% IP**	**+95% IP**	**DK**	**Med**	**GK**
D	13,09	29	32,77	0,62	25,55	3,00	6,00	10,00
P	16,40	41	38,21	4,34	28,46	4,00	6,00	12,00

p = 0,362; Mann Whitney U test

Tablica 40. – Lokalizacija kondiloma prema genotipu HPV **[P/D]**

	Lokalizacija	neg	VR	NR	NR i VR	**Ukupno**
N	**D**	1	2	19	7	29
%		3,45%	6,90%	65,52%	24,14%	
N	**P**	7	2	29	3	41
%		17,07%	4,88%	70,73%	7,32%	
Ukupno		8	4	48	10	70

p = 0,097; hi-kvadrat test

Tablica 41. – Lokalizacija kondiloma prema genotipu HPV **[P/D]**

	Lokalizacija	VR	NR	**Ukupno**
N	**D**	9	19	28
%		32,14%	67,86%	
N	**P**	5	29	34
%		14,71%	85,29%	
Ukupno		14	48	62

p = 0,102; hi-kvadrat test

Tablica 42. – Lokalizacija kondiloma prema HPV pozitivnosti partnera/ice **[P/D]**

	Lokalizacija	Partner -	Partner +	**Ukupno**
N	**D**	19	10	29
%		65,52%	34,48%	
N	**P**	31	10	41
%		75,61%	24,39%	
Ukupno		50	20	70

p = 0,357; hi-kvadrat test