

Vrijednosti različitih molekularnih metoda za tipizaciju humanih papiloma virusa u dijagnostici genitalnih infekcija

Žele-Starčević, Lidiya

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:238587>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Žele-Starčević, Lidija (2005) *Vrijednosti različitih molekularnih metoda za tipizaciju humanih papiloma virusa u dijagnostici genitalnih infekcija*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/188>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Lidija Žele-Starčević

**VRIJEDNOSTI RAZLIČITIH MOLEKULARNIH METODA ZA
TIPIZACIJU HUMANIH PAPILOMA VIRUSA U DIJAGNOSTICI
GENITALNIH INFEKCIJA**

Disertacija

Zagreb, 2005.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. POVIJESNI PREGLED

1.2. HUMANI PAPILOMAVIRUSI

1.2.1. Taksonomija

1.2.2. Struktura virusnog genoma

1.2.3. Uloga virusnih bjelančevina

1.2.4. Podjela HPV

1.2.4.1. Podjela prema afinitetu za pojedina tkiva

1.2.4.2. Podjela prema onkogenom potencijalu

1.2.5. Patogeneza HPV infekcija

1.3. KLINIČKE MANIFESTACIJE HPV INFEKCIJA

1.3.1. Verukozne promjene kože

1.3.2. Epidermodysplasia verruciformis (EV)

1.3.3. Ekstragenitalne infekcije sluznica

1.3.4. Genitalne infekcije

1.4. DIJAGNOSTIKA HUMANIH PAPILOMAVIRUSA (HPV)

1.4.1. Tradicionalne metode

1.4.2. Molekularne metode

1.4.2.1. Hibridizacijske metode

1.4.2.1.1. Hibridizacija in situ

1.4.2.1.2. Metoda hibridizacije po Southernu

1.4.2.1.3. Metoda dot-blot

1.4.2.1.4. Hibridizacija in situ na filteru

1.4.2.1.5. Tekućinska hibridizacija

1.4.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

1.4.2.2.1. Genotip-specifične probe

1.4.2.2.2. Grupno-specifične probe

1.4.2.2.2.1. Hibridizacijske probe s genotip-specifičnim probama

1.4.2.2.2.1.1. Metoda dot-blot

1.4.2.2.2.1.2. Metoda reverzni dot-blot

1.4.2.2.2.1.3. Metoda reverzni line-blot

1.4.2.2.2.1.4. PCR-ELOSA

1.4.2.2.2.2. Razgradnja produkata PCR reakcije - RFLP

1.4.2.2.2.3. Određivanje redoslijeda nukleotida (Sekvencioniranje)

1.5. DIJAGNOSTIKA BOLESTI UZROKOVANIH HPV

1.5.1 Dijagnostika preinvazivnih promjena vrata maternice

1.5.2. Uloga citologije i klasifikacija citoloških promjena

1.5.3. Kolposkopija

1.5.4. Uloga HPV testiranja u screeningu i prevenciji cervikalnog karcinoma

1.5.5. Dijagnostika infekcija u muškaraca

1.6. EPIDEMIOLOGIJA

1.6.1 Epidemiologija HPV genitalnih infekcija

1.6.2. Epidemiologija karcinoma vrata maternice

1.6.3. Raspored genotipova HPV

1.6.4. Epidemiološke studije u Hrvatskoj

1.7. LIJEČENJE GENITALNIH INFEKCIJA UZROKOVANIH HPV

1.8. RAZVOJ VAKCINE

2. CILJ I SVRHA RADA

3. ISPITANICI I UZORCI U ISTRAŽIVANJU

3.1. Ispitanici i kontrolna skupina

4. METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Kliničke metode

4.2. Metode molekularne mikrobiologije

4.2.1. HPV DNA test (Digene Hybrid Capture II)

4.2.2. Genotipizacija HPV

4.2.2.1. Izolacija DNA HPV

4.2.2.2. Umnožavanje DNA HPV lančanom reakcijom polimeraze

4.2.2.3. Metoda cijepanja dobivenih amplifikata restrikcijskim enzimima

(engl. restriction fragment length polymorphism – RFLP)

4.3. Kemikalije

4.3.1. HPV DNA test

4.3.2. Izolacija DNA

4.3.3. Lančana reakcija polimeraze

4.3.4. Detekcija produkata

4.3.5. RFLP

4.4. Uređaji

4.5. STATISTIČKA I RAČUNALNA OBRADA

5. REZULTATI

5.1. Ukupna skupina ispitanika

5.2. Ispitanici i kontrolna skupina prema dobi

5.3. Raspodjela genotipova kod muškaraca bez klinički vidljivih promjena u smislu HPV genitalne infekcije

5.4. Raspodjela genotipova u žena s različitim citološkim nalazom

5.5. Raspodjela genotipova u asimptomatskih muškaraca i žena s različitim citološkim nalazom

5.6. Raspodjela genotipova prema dobi u asimptomatskih muškaraca i žena s različitim citološkim nalazom

5.7. RFLP metoda na dijelu genoma E1 umnoženog parom začetnika p1/p2

6. RASPRAVA

7. ZAKLJUČCI

8. SAŽETAK

9. SUMMARY

10. POPIS LITERATURE

11. ŽIVOTOPIS

UVOD

1.1. POVIJESNI PREGLED

Genitalne bradavice (condylomata acuminata) bile su poznate već u doba Hipokrata, a kožne bradavice spominju se već od prvog stoljeća prije nove ere (1, 2). Međutim, tek krajem devetnaestog stoljeća otkrivena je njihova infektivna priroda. Godine 1891. Payne je prvi zapazio da su kožne bradavice prijenosne, a Heidingsfeld je 1901. opisao prijenos genitalnih bradavica spolnim kontaktom (1). Godine 1907. Ciuffo je pretpostavio da se radi o virusu nakon što je uspio prenijeti infekciju ekstraktom tkiva kondiloma iz kojeg su filtracijom bile uklonjene stanice (1). No, tek 1949. godine Strauss i suradnici elektronskim mikroskopom vizualizirali su virus i nazvali ga humanim papilomavirusom (HPV) (1). Kancerogeni potencijal ovih virusa prvi je eksperimentalno dokazao Rous još 30-tih godina prošlog stoljeća (3). Rad na papilomavirusima otežavala je činjenica da se ne razmnožavaju u staničnoj kulturi i da se ne mogu prenijeti na laboratorijske životinje. Na temelju podataka dobivenih biokemijskom i imunološkom analizom virusnih proteina, smatralo se da postoji jedan tip humanih papilomavirusa (HPV); ovakav stav vladao je tijekom 60-tih godina prošlog stoljeća (4). Međutim, razvoj biologije 70-tih godina prošlog stoljeća omogućio je proučavanje humanih papilomavirusa na molekularnoj razini. Bazirajući se na heterolognosti DNA, analizom genoma izoliranih iz različitih lezija u slijedeća dva desetljeća otkriven je velik broj genotipova HPV (5, 6). Međutim, usprkos velikim naporima brojnih laboratorija, tek je devedesetih godina prošlog stoljeća općenito prihvaćeno da su određeni genotipovi HPV bitno povezani s pojavom karcinoma vrata maternice (cerviksa), kao i s pojavom prekanceroznih lezija (7, 8). Potvrđena je i uzročna veza HPV s nekim drugim tumorima (karcinom orofarinksa, larinksa, tonzila) (9, 10). U ljudi je danas poznato više od 100 različitih genotipova HPV, od kojih njih više od 30 inficira anogenitalni trakt (11). Ove infekcije su danas jedna od najčešćih spolno prenosivih bolesti (12, 13).

1.2. HUMANI PAPILOMAVIRUSI

1.2.1. Taksonomija

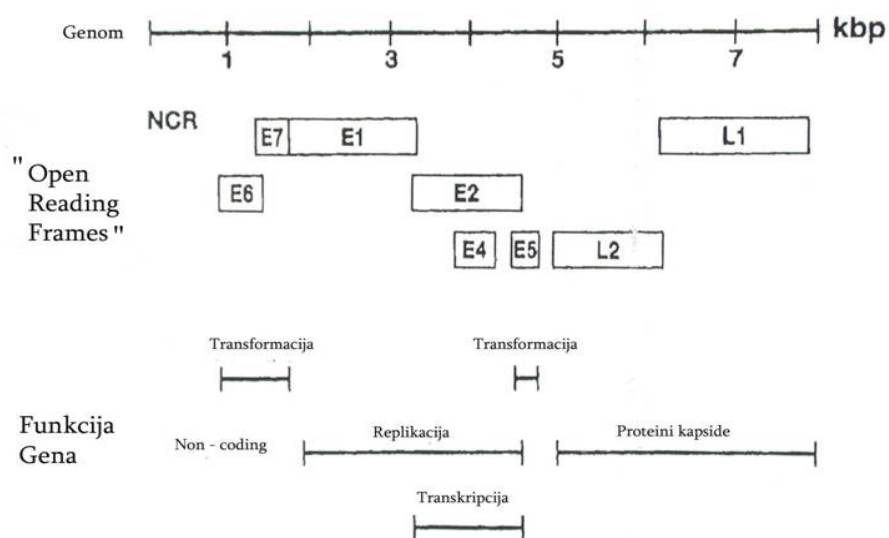
Humani papilomavirusi taksonomski su uvršteni u porodicu *papillomaviridae*, u koju su uključeni i papilomavirusi koji inficiraju druge domaćine. Do nedavno su papilomavirusi, zajedno s polyomavirusima, pripadali porodici papovaviridae (10). Pokazuju značajnu specifičnost u odnosu na domaćina; nije poznato da inficiraju drugu vrstu osim prirodnog domaćina. Papilomavirusi su nađeni i u velikom broju kralježnjaka (14).

1.2.2. Struktura virusnog genoma

HPV su mali dvolančani DNA virusi. To su ikozaedrično simetrični virusi koji u promjeru iznose 55 nm. Genom DNA obavija dvoslojni bjelančevinski plašt ili kapsida. Elektronskom mikroskopijom je pokazano da je virusna kapsida sastavljena iz 72 morfološke jedinice ili kapsomere. Kapsidu čine najmanje dvije strukturne bjelančevine. Glavna bjelančevina kapside (L1) koja čini 80% težine virusne čestice ima molekularnu masu 55 kDa. Mala bjelančevina kapside ima molekularnu masu od 70 kDa. HPV nemaju lipidne virusne ovojnice i zato su otporni na djelovanje 70% etanola, deoksiholata, etera, kloroforma i drugih otapala (10).

HPV imaju dvolančani, kružni, kovalentno zatvoren genom DNA od otprilike 7500-8000 parova baza (bp). Molekularna masa DNA HPV iznosi 5.2×10^6 Da (10, 15, 16). Virusni genom dijelimo na kodirajuća i nekodirajuća područja. Sva kodirajuća područja (open reading frames, ORFs) smještena su na jednom lancu, a sastoje se od gena koji se djelomično preklapaju (slika 1). Geni su podijeljeni na rane – E (prema engl. early) i kasne - L (prema engl. late). Većina genotipova HPV ima šest različitih ranih gena – E1, E2, E4, E5, E6 i E7 koji kodiraju bjelančevine koje su potrebne za razmnožavanje virusa (replikaciju i transkripciju virusne DNA). Međutim, kod genotipova visokog rizika, rani geni sudjeluju i u transformaciji zaraženih stanica. Geni L1 i L2 kodiraju strukturne bjelančevine virusnog plašta (10, 15, 16).

Slika 1. Organizacija genoma HPV 16



(prema Brentjens i sur., 16)

1.2.3. Uloga virusnih bjelančevina

Virusna bjelančevina E1 koja posjeduje aktivnost ATP-aze i helikaze potrebna je za razmnožavanje virusa i inhibiciju njegove integracije u genom domaćina (17).

Virusna bjelančevina E2 značajno povećava aktivnost bjelančevine E1 u procesu razmnožavanja virusa (17). Istraživanja su pokazala da su za proces replikacije virusa potrebne obje bjelančevine (18). Bjelančevina E2 ima ulogu i u procesu transkripcije virusa. Gen E2 je istraživao kod papilomavirusa goveda: on kodira tri različite bjelančevine koje djeluju tako da pojačavaju ili smanjuju transkripciju virusa (19). Dowhanick i sur. su pokazali da bjelančevina E2 inhibira rast stanice koja sadrži DNA visokorizičnih genotipova 16 i 18 (20). Ovi podaci sugeriraju da bjelančevina E2 ima veliku ulogu u sprečavanju onkogene transformacije stanica zaraženih HPV. O ulozi bjelančevine E4 ne zna se mnogo. Istraživanja su pokazala da vezanjem na citokeratin dovodi do urušavanja stanične citokeratinske mreže; na taj način možda olakšava izlazak virusa iz stanice (21). Čini se da ova bjelančevina nema nikakvu ulogu u onkogenoj transformaciji zaražene stanice.

Bjelančevina E5 može dovesti do transformacije zaražene stanice modifikacijom tirozin kinaznih receptora određenih faktora rasta (22).

Onkogeni potencijal visokorizičnih genotipova je najčešće povezan s bjelančevinama E6 i E7. Terminalno diferenciranim keratinocitima nedostaje sposobnost replikacije DNA. Bjelančevine E6 i E7 zaustavljaju proces diferencijacije keratinocita i na taj način omogućavaju HPV da koriste stanične bjelančevine za kontinuiranu replikaciju virusa (15). Naime, pokazalo se da ove bjelančevine inhibiraju djelovanje tumorskih supresorskih bjelančevina p53 i Rb (15). Bjelančevina E6, posebno u

visokorizičnih genotipova, veže se s velikim afinitetom na p53 i značajno povećava njegovu degradaciju (15). Kao i bjelančevina p53, i bjelančevina Rb ima važnu ulogu u regulaciji dijeljenja stanica. Ako se nalazi u hipofosforiliranom obliku, od bjelančevine Rb otcjepljuje se bjelančevina E2F; na taj način sprečava se prepisivanje gena koji imaju ulogu u regulaciji staničnog ciklusa (23). Na sličan način djeluje vezanje bjelančevine E7 na bjelančevinu Rb (15). Bjelančevina E7 visokorizičnog genotipa 16 dovodi do razgradnje Rb (15). Istraživanja također pokazuju da zajedničkim djelovanjem bjelančevine E6 i E7 onemogućavaju djelovanje gena odgovornog za stvaranje interferona (IFN), kao i sam IFN, i na taj način smanjuju odgovor domaćina na infekciju (24). Postoje i brojni drugi mehanizmi koji mogu objasniti ulogu bjelančevina E6 i E7 u patogenezi bolesti povezanih s HPV infekcijom (25).

1.2.4. Podjela HPV

HPV su vrlo heterogena grupa DNA virusa koji su razvrstani u različite genotipove prema genetičkoj srodnosti. Kao što je već spomenuto, do danas je poznato preko 100 različitih genotipova HPV, a svakodnevno se otkrivaju novi (11). Nomenklatura za HPV prvi puta je predložena 1978.godine: novim genotipom smatrat će se onaj novootkriveni HPV koji se po sukladnosti nukleotidnoga rasporeda više od 50% razlikuje od do tada poznatih genotipova (15). Nakon što je upoznat redoslijed baza u velikom dijelu genoma, 1991. godine su promijenjeni kriteriji za određivanje novih genotipova, odnosno podtipova; novim genotipom će se smatrati svaki virus koji se po sukladnosti nukleotidnoga rasporeda u dijelu genoma E6, E7 i L1 više od 10% razlikuje

od do tada poznatih virusa. Ako je razlika 2-10% novootkriveni virus smatrat će se podtipom, a ako je razlika manja od 2%, radi se samo o varijanti istoga virusa (15). Na Internacionalnom kongresu o papilomavirusima, održanom u Quebec Cityju 1995. godine, ova definicija je ponovo revidirana; novim genotipom smatrat će se onaj čiji se nukleotidni raspored u dijelu genoma L1 razlikuje više od 10% od do tada poznatih genotipova (15).

Na temelju rasporeda nukleotida u najočuvanim dijelovima genoma (E6, E1, L1), konstruirano je filogenetsko stablo u kojem su prema srodnosti grupirani brojni genotipovi HPV (26). Ovaj vrlo složeni način grupiranja uključuje sve genotipove koji inficiraju sluznicu, i dio genotipova koji su uglavnom, ili isključivo kožni genotipovi. Iako postoji zadovoljavajuća korelacija između filogenetske povezanosti, afiniteta prema pojedinim tkivima i patoloških svojstava pojedinog virusa, onkogeni potencijal pojedinog virusa je teško predvidjeti iz smještaja u filogenetskom stablu. Naime, genotipovi koji su nađeni u karcinomu, smješteni su na različitim granama i grančicama filogenetskog stabla (26).

1.2.4.1. Podjela prema afinitetu za pojedina tkiva

HPV su također razvrstani prema afinitetu za pojedina tkiva (dermatotropni ili mukozotropni). Ovisno o genotipu, HPV uzrokuju različite bolesti (tablica 1). Ova podjela nije savršena jer neki genotipovi mogu uzrokovati različite kliničke promjene (27).

Tablica 1Manifestacije različitih HPV genotipova

Manifestacije	HPV genotipovi
Negenitalne	
Plantarne bradavice	1
Obične bradavice	2, 4, 49
Ravne bradavice	3, 10, 28, 49
Keratoakantom	37
Kožni karcinom skvamoznih stanica	38, 41, 48
Oralne lezije	13, 32, 57
Druge negenitalne lezije	6, 7, 11, 60, 63, 65, 78
Epidermodysplasia verruciformis (EV) (također nađene u imunokompromitiranih osoba)	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20-25, 36, 47, 50
Anogenitalne	
Šiljati kondilomi	6, 11, 16, 18, 70
Anogenitalna displazija i neoplazija	16, 18, 26, 27, 30, 31, 33-35, 40, 42-45, 51-59, 61, 62, 64, 66-69, 71-74
Druge anogenitalne lezije	6, 11, 16, 18, 33,, 39
Imunokompromitirani domaćin	72-77 (također genotipovi nađeni u EV)

(Prema referencama 16 i 27)

1.2.4.2. Podjela prema onkogenom potencijalu

HPV genotipovi su kategorizirani i prema onkogenom potencijalu. Naime, na temelju epidemioloških i molekularno bioloških istraživanja, te kliničkih zapažanja utvrđena je uloga HPV infekcija u razvoju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) i karcinoma cerviksa (28, 29). U HPV genotipove "niskog rizika" ubrajaju se genotipovi 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108, a nađeni su kod šiljatih kondiloma i skvamoznih intraepitelnih lezija niskog stupnja (LSIL). U genotipove "visokog rizika" uključeni su: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82, a genotipovi 26, 53, 66 za sada se smatraju se genotipovima "vjerojatno visokog rizika" (29). Ova kategorizacija se stalno mijenja i dopunjuje novim genotipovima (29, 30). Zastupljenost genotipova varira u odnosu na geografske regije. U Sjevernoj Americi i Europi HPV 16 je najčešći genotip visokog rizika (31).

1.2.5. Patogeneza HPV infekcija

HPV može adherirati i ući u nekoliko tipova stanica. Infekcija počinje ulaskom virusa kroz oštećeni epitel; pretpostavlja se da $\alpha 6$ integrin djeluje kao stanični receptor (32). Međutim, mehanizam kojim virus ulazi u stanicu i njegova translokacija u jezgru nisu poznati.

Nakon što virus uđe u stanicu genitalnog pokrova, slijedi jedan od tri različita tijeka infekcije: latentna infekcija, kod koje se prisutnost virusa može dokazati samo molekularnim metodama; subklinička infekcija, kod koje se infekcija može dokazati kolposkopijom ili mikroskopski i, klinička bolest. Većina genitalnih infekcija su latentne ili subkliničke (12).

Razmnožavanje HPV (replikacija i transkripcija virusne DNA) je proces koji ovisi o prisutnosti ili odsutnosti određenih virusnih bjelančevina, kao i stupnja zrelosti epitelnih stanica domaćina. Infekcija s HPV počinje u bazalnim stanicama pločastog epitela koji se nalazi u transformacijskoj zoni na cerviksu. (Transformacijska zona je područje između izvornog pločastog i izvornog cilindričnog epitela). Iako se virus ne replicira u ovim stanicama, dolazi do ekspresije E1 i E2 koji održavaju virusni genom u obliku episoma (kružnih ekstrakromosomalnih dijelova). U svakoj inficiranoj stanici nalazi se jedna kopija virusne DNA. Bazalne stanice s episomima predstavljaju latentnu infekciju i, kao što je već spomenuto, histološki ih nije moguće razlikovati od neinficiranih stanica. Zbog neodgovarajuće sredine, umnožavanje episomske DNA u bazalnim stanicama je ograničeno. U parabazalnim stanicama dolazi do transkripcije E6 i E7 što omogućuje replikaciju virusne DNA. Glavnu virusnu transkripciju kodira nekoliko prvih kodona regije E1 koja se spaja s E4, što dovodi do stvaranja virusne bjelančevine

E1^E4. Ova bjelančevina je promotor koja služi za transkripciju gena L1 i L2. Ovaj proces koji dovodi do stvaranja nove virusne čestice zbiva se samo u terminalno diferenciranim epitelnim stanicama (33).

Zbog razmnožavanja HPV u terminalno diferenciranim epitelnim stanicama, one se morfološki promijene i postupno propadaju; ovakav citopatski efekt naziva se koilocitoza. Koilocitoza kao marker citopatskog efekta produktivnih HPV infekcija najbolje korelira s kondilomima, a slabije sa subkliničkom infekcijom (34). Međutim, koilocitoza nije patognomonična za infekcije HPV.

Klinički i histopatološki, prisutnost HPV infekcije može s dokazati nakon inkubacije od 1 do 8 mjeseci (35). Ako ne dođe do transformacije, slijedi već opisani normalni ciklus razmnožavanja virusa: pričvršćivanje, prodiranje, transkripcija i translacija virusnih gena, replikacija virusnog genoma i stvaranje virusne čestice, te otpuštanje (33). Infekcija se manifestira zadebljanjem epidermisa, hiperplazijom stratum spinosum i hiperkeratozom (10). Ako se ne liječe, ove lezije mogu spontano nestati, perzistirati kao benigne lezije, ili napredovati do prekanceroznih lezija, i eventualno karcinoma (36).

Načini na koje genotipovi visokog rizika dovode do onkogene transformacije nisu u potpunosti poznati. Prema sadašnjim spoznajama za onkogenu transformaciju potrebna je integracija virusnog genoma u genom domaćina (37, 38, 39). Lokus na DNA domaćina na kojem se zbiva integracija nije specifičan, međutim, kružni HPV genom najčešće puca u regiji E1 - E2. To ima za posljedicu gubitak kontrole u prepisivanju ranih gena E6 i E7 (37, 38, 39). Kao što je ranije spomenuto, bjelančevine E6 i E7 sudjeluju u degradaciji regulatornih bjelančevina p53 i Rb. Smanjivanje količine regulatornih bjelančevina i njihovog djelovanja je vjerojatno ključni događaj u razvoju karcinoma. Međutim, većina lezija, uzrokovana i visokorizičnim genotipovima HPV, spontano

regredira bez ikakvih dugotrajnih posljedica (27). Brojna epidemiološka istraživanja pokazala su da su za nastanak karcinoma u inficiranim stanicama potrebni i neki drugi čimbenici. Pokazalo se da je pušenje značajan rizik za nastanak karcinoma cerviksa, a neki autori čak smatraju da je to nakon infekcije HPV najznačajniji i nezavisan rizični faktor (40, 41). Naime, uočeno je da nikotin i kotinin dovode do oštećenja DNA pločastih stanica vrata maternice, a takve stanice su podložnije malignim promjenama (40, 42). Drugi mogući mehanizam je smanjenje broja Langerhansovih stanica što može rezultirati smanjenim lokalnim imunitetom na HPV (43). Od ostalih rizičnih čimbenika navode se slijedeći: veći broj spolnih partnera, niže obrazovanje, dob pri prvom stupanju u spolni odnos, veći broj poroda i trudnoća, veći broj namjernih prekida trudnoće, dugotrajno korištenje oralne kontracepcije, ne korištenje kondoma, klamidijska infekcija, genetske karakteristike koje onemogućuju imunom sistemu da suprimira ili eliminira HPV infekciju (41, 44, 45).

1.3. KLINIČKE MANIFESTACIJE HPV INFEKCIJA

Kao što je već spomenuto i prikazano u tablici 1, HPV se mogu, ovisno o genotipu, različito manifestirati (26, 27). S obzirom da je za većinu tih promjena virusna etiologija dokazana relativno nedavno, u starijoj literaturi kliničke su promjene opisivane samo morfološki i unutar različitih skupina bolesti (2). Danas se HPV infekcije najčešće klasificiraju na slijedeći način (9, 46):

- verukozne promjene kože
- epidermodysplasia verruciformis
- ekstragenitalne infekcije sluznica
- genitalne infekcije

1.3.1. Verukozne promjene kože

Verukozne promjene kože uključuju duboke plantarne bradavice (veruke), obične (verucca vulgaris), i ravne. Radi se o hiperkeratotičnim papulama, plakovima ili nodusima koji se najčešće javljaju na šakama i stopalima. Duboke plantarne bradavice najčešće nalazimo kod adolescenata i mladih odraslih ljudi. Ove lezije su često vrlo bolne, a mogu se naći i na dlanovima (palmarne). Obične bradavice su dobro demarkirane, egzofitične i hiperkeratotične papule s hrapavom površinom. Mogu se naći na rukama, oko prstiju ili noktiju, na dlanovima i tabanima, i rijetko na sluznicama. Mogu

biti solitarne, mozaične ili filiformne. Ravne bradavice često nalazimo u djece, kao multiple, lagano izdignute papule s glatkom površinom. Pojavljuju se na licu, vratu i rukama.

Mikrotrauma i autoinokulacija imaju važnu ulogu u nastanku i širenju bradavica. Do spontanog nestanka bradavica dolazi u 50 – 90% djece unutar 1 do 5 godina (46).

1.3.2. Epidermodysplasia verruciformis (EV)

EV je rijetka genetski determinirana bolest. Manifestira se pojavom brojnih bradavica, makuloznih ili skvamoznih promjena uzrokovanih multiplim genotipovima HPV, koji se ne viđaju kod zdravih osoba. Pretpostavlja se da je ova osjetljivost posljedica oštećenja staničnog imuniteta (46). Javlja se u djetinjstvu, a promjene zahvaćaju leđa, prsa i udove (48). Navedene promjene progrediraju u spinocelularni karcinom u 25 – 63% slučajeva, posebno na mjestima koja su izložena suncu (49). Samo nekoliko genotipova ima onkogeni potencijal (najčešće 5 i 8) (49).

1.3.3. Ekstragenitalne infekcije sluznica

Infekcije HPV uzrokuju benigne i maligne lezije sluznice usne šupljine, respiratornog trakta, jednjaka i očiju. Od dobroćudnih promjena u dječjoj dobi je najčešća benigna papilomatoza larinksa, dok se kod odraslih javlja solitarni papilom larinksa koji

se smatra prekancerozom, zatim fokalna epitelijska hiperplazija, leukoplakija sluznice usne šupljine, te papilomi konjunktive. Iz ovih lezija najčešće su izolirani genotipovi 6 i 11 (10), osim kod fokalne epitelijske hiperplazije koja se javlja gotovo isključivo kod Indijanaca i Eskima, a nađeni su genotipovi 13 i 32 (50).

Od malignih lezija u ovu skupinu se ubrajaju karcinomi larinksa, ždrijela, jednjaka, usne šupljine, tonzila, očnog kapka, konjunktive i suzne vreće. Najčešće se izoliraju genotipovi 16 i 18, iako su relativno česti i genotipovi 33, 35 i 30 (9, 10).

1.3.4. Genitalne infekcije

Kao što je već spomenuto, infekcije uzrokovane HPV mogu biti klinički vidljive, ili mogu biti takve da se ne vide na pregledu (subkliničke infekcije), ali se virus mikroskopki može dokazati u inficiranoj koži ili sluznici, ili se kolposkopski mogu prikazati promjene do kojih je doveo ovaj virus. Međutim, postoji i latentna infekcija, kod koje se prisutnost virusa može dokazati samo molekularnim metodama. Većina genitalnih infekcija su latentne ili subkliničke (12).

Najčešće kliničke manifestacije genitalne infekcije uzrokovane HPV su izrasline na koži i sluznicama, koje se obično nazivaju spolnim bradavicama ili kondilomima; takvi kondilomi mogu biti šiljasti (*condylomata acuminata*), ravne površine (*condylomata plana*), a ponekad su osobito veliki, te se u takvim slučajevima govori o gigantskim kondilomima (*Buschke-Löwenstein*). Ponekad s javljaju tvorbe sastavljene od multiplih papula (*papulosis bowenoides*) (9, 51).

Od navedenih entiteta najčešći su šiljasti kondilomi (*condylomata acuminata*). To su obično multiple papulozne ili nodozne tvorbe, papilomatoznog, odnosno verukoidnog

izgleda, smeđkaste ili boje kože. Površina im je hrapava, no ponekad može biti glatka. Najčešće su lokalizirani na vanjskim genitalijama: na distalnom dijelu korpusa penisa ili na prepuciju kod muškarca, odnosno na vulvi kod žena ili u analnoj regiji u oba spola (33) (slika 2). Međutim, njihova lokalizacija može biti na stijenci vagine, na vratu maternice, intrauretralna, ingvinalna ili perinealna (33).



Fotodokumentacija
prof.dr.sc. M. Skerlev

Slika 2. Šiljasti kondilomi (condylomata acuminata)

Značenje intrauretralnih kondiloma je u mogućnosti prijenosa HPV u proksimalni dio uretre, i rijetko, u mjehur, kao i zbog njihove moguće povezanosti s nastankom karcinoma mjehura i karcinoma prostate (52, 53).

Promjene su obično multiple. Često konfluiraju i premašuju veličinu papule, te ovisno o lokalizaciji mogu doseći veličinu od nekoliko centimetara. Konfluentne su promjene češće vidljive na intertriginoznim regijama (ingvinum, skrotum, perianalno); smatra se da madidacija i maceracija imaju važnu ulogu u patogenezi (9, 33).

Anogenitalni kondilomi se prvi puta mogu pojaviti tijekom trudnoće, kao posljedica nedavne infekcije, ili kao rezultat reaktivacije latentne HPV infekcije (slika 3). Osim toga, u trudnoći kondilomi mogu postati veliki i brojni, ali rijetko stvaraju probleme tijekom porođaja. Indikacija za carski rez postoji samo u slučaju brojnih kondiloma u porođajnom kanalu (33). Ako do infekcije dođe prolaskom kroz porođajni kanal zaražene majke, nakon faze inkubacije kondilomi se mogu javiti u ranom djetinjstvu (54, 55). Međutim, relativno često se opisuje pojava HPV genitalne infekcije i u kasnijoj dječjoj dobi (56, 57).



Fotodokumentacija
prof.dr.sc. M. Skerlev

Slika 3. Anogenitalni kondilomi

Iz šiljastih kondiloma najčešće se izoliraju genotipovi 6 i 11, međutim, neki autori našli su i druge genotipove npr. 16, 18, 70, 42, 2 (9, 26).

Ravni kondilomi (*condylomata plana*) su papilomatozne tvorbe ravnog oblika. Najčešće su uzrokovani genotipovima visokog rizika (16, 18, 31, 33). Ranije ih se smatralo varijantom šiljastih kondiloma, međutim, u novijoj literaturi izdvojeni su u poseban entitet zbog drukčijeg oblika i teže uočljivosti, a posebno zbog većeg onkogenog potencijala (58, 59, 60).

Gigantskim kondilomom *Buschke-Löwenstein* (BL) naziva se masivna tumorska lezija u anogenitalnoj regiji. Javlja se rijetko, a unatoč impresivnoj kliničkoj slici, histološki ne nalazimo znakova malignosti; najčešće se iz njega izoliraju genotipovi 6 i 11. Pretpostavlja se da imunosupresija ima značajnu ulogu u patogenezi BL (61, 62) (slika 4).



Fotodokumentacija
prof.dr.sc.M. Skerlev

Slika 4. Gigantski kondilom *Buschke-Löwenstein*

Nasuprot tome, već spomenuta bovenoidna papuloza (*papulosis bowenoides*), najčešće lokalizirana na vanjskom spolovilu, histološki pokazuje znakove stanične atipije koji podsjećaju na Morbus Bowen ili spinocelularni karcinom (63). Iz ove bolesti najčešće je izoliran genotip 16 (53, 63, 64).

Danas je nedvojbeno dokazano da je dugotrajna infekcija s visokorizičnim genotipovima HPV glavni etiološki faktor za nastanak karcinoma vrata maternice (31, 44, 65, 66). Preinvazivne, intraepitelne promjene vrata maternice su obično asimptomatske i nevidljive golim okom. Stoga se, uglavnom, otkrivaju rutinskim citološkim pregledom, i prema potrebi kolposkopijom. Ove promjene obično ne dovode do specifičnih simptoma. Često je prisutan mukopurulentni ili purulentni iscjedak, koji je najčešće posljedica cervicitisa ili kolpitisa. Kod uznapredovalih invazivnih promjena javlja se kontaktno krvarenje, koje se, međutim, može javiti i kod eritroplakije (67).

Osim s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN) i karcinomom vrata maternice, HPV visokog rizika uzročno su povezani i s vulvarnom intraepitelnom neoplazijom (VIN), vaginalnom intraepitelnom neoplazijom (VAIN), analnom intraepitelnom neoplazijom (AIN) i penilnom intraepitelnom neoplazijom (PIN) (33, 56, 63, 68, 69, 70).

1.4. DIJAGNOSTIKA HUMANIH PAPILOMAVIRUSA (HPV)

Kao što je već spomenuto, HPV se razmnožavaju samo u terminalno diferenciranim epitelnim stanicama i zato se ne mogu uzgajati u staničnoj kulturi (14, 33).

1.4.1. TRADICIONALNE METODE

Infekcija s HPV može se dijagnosticirati običnim svjetlosnim mikroskopom; naime, mikroskopskim pregledom tkivnog uzorka ili staničnog razmaza opažaju se značajno promijenjene stanice s hiperkromnim i polimorfnim jezgrama okružene velikom svjetlom citoplazmom. Navedena promjena prvi puta je opisana 1956. godine, a naziva se koilocitoza (71).

Osim svjetlosnim mikroskopom, prisutnost HPV se može dokazati elektronskim mikroskopom (72) i imunohistokemijskim metodama (73). Međutim, sve ove metode imaju relativno nisku osjetljivost i specifičnost, a osim toga ne omogućavaju genotipizaciju HPV (73, 74). Zbog toga se danas za dokazivanje infekcije s HPV i određivanje genotipova koriste visoko osjetljive i specifične metode molekularne biologije (75).

1.4.2. MOLEKULARNE METODE

Zadnjih nekoliko godina razvoj visoko osjetljivih testova baziranih na detekciji DNA revolucionalizirao je dijagnostiku HPV i omogućio istraživanje različitih bitnih aspekata HPV infekcija. Međutim, rezultati dijagnostičkih testova trebali bi se pažljivo interpretirati i zahtijevaju pažljivu laboratorijsku provjeru (76). Zbog velikog broja različitih testova postoji potreba za vanjskom kontrolom kvalitete što bi omogućilo usporedbu različitih dijagnostičkih metoda. Naime, molekularne tehnike za detekciju HPV razlikuju se u osjetljivosti i specifičnosti. Iskustvo laboratorija je presudan uvjet za vjerodostojne rezultate. U rutinskom radu se od metoda baziranih na hibridizaciji najčešće koriste:

1. hybrid capture microplate assay (HC 2)
2. polymerase chain reaction (PCR)

1.4.2.1. HIBRIDIZACIJSKE METODE

Za detekciju HPV koriste se molekularne metode bazirane na hibridizaciji nukleinskih kiselina (77). U literaturi su opisane brojne tehnički različite hibridizacijske metode. Princip svih metoda je sparivanje, odnosno hibridizacija između komplementarnih predjela malih označenih dijelova nukleinskih kiselina nazvanih probe (primeri) 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, digoksinogenin). Čvrstoća vezanja između probe i ciljne DNA je ovisna od sukladnosti rasporeda oligonukleotida u oba lanca, i od uvjeta u kojima se odvija hibridizacija (77). Probe mogu biti značajne za određen genotip (genotip-specifične probe) ili za više genotipova HPV (grupno-specifične probe). Korištenjem genotip-specifičnih proba moguće je odrediti genotip HPV (77).

1.4.2.1.1. Hibridizacija *in situ* ima slabiju osjetljivost od drugih hibridizacijskih metoda, ali omogućuje lokalizaciju DNA HPV u stanici ili lezijama unutar tkiva. Također je dobra za analizu uzoraka fiksiranih u parafinu (78) i potvrđuje prisutnost određenih morfoloških promjena u tkivima inficiranim s HPV (79).

1.4.2.1.2. Metoda hibridizacije po Southernu je zahtjevnija, skupa i dugotrajna metoda za koju su potrebne relativno velike količine DNA, te nije prikladna za dijagnostički laboratorij (80). Međutim, to je jedina metoda kojom je moguće odrediti fizikalno stanje DNA HPV u stanici (da li je u obliku episoma ili je uključena u genom stanice) (81).

1.4.2.1.3. Metoda dot-blot je u usporedbi s hibridizacijom po Southernu brža i primjerenija za analizu velikog broja uzoraka, međutim, osjetljivost i specifičnost je manja (77).

1.4.2.1.4. Hibridizacija *in situ* na filteru je varijacija metode dot blot (82, 83). Metoda je brza, jednostavna i omogućuje analizu velikoga broja uzoraka. Na toj metodi bio je baziran prvi komercijalni test za dijagnostiku HPV -Vira Pap (Digene Laboratories, Silver Spring, MD, SAD). Međutim, zbog niske osjetljivosti i specifičnosti, kao i zbog upotrebe radioaktivno označenih proba, test je brzo maknut s tržišta.

1.4.2.1.5. Tekućinska hibridizacija je metoda na kojoj se temelji Digene Hybrid Capture Test (Digene Laboratories, Silver Spring, SAD). Danas se koristi druga generacija ovog testa. To je trenutno jedini test za dijagnostiku infekcije s HPV koji ima odobrenje američke FDA (Food and Drug Administration) za korištenje u humanoj medicini.

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 (84). 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). (85). 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, što ga čini najbolje standardiziranom metodom za detekciju HPV (85).

1.4.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je trenutno najosjetljivija metoda za dokazivanje infekcije s HPV i za genotipizaciju HPV (86). 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. Genotipizacija HPV, koja se temelji na PCR, se izvodi u dva stupnja (75). U prvom stupnju se *in vitro* umnožava mali odsječak genoma HPV. Nakon toga slijedi analiza produkata PCR s različitim molekularnim metodama, koji omogućavaju određivanje genotipa HPV. Izborom proba određujemo odsječak genoma koji će se umnožiti, te je njihov pravilan odabir najvažniji korak u optimizaciji PCR. Za umnožavanje virusnoga genoma biramo između dvije različite vrste proba:

- a) proba koje umnožavaju sekvencu specifičnu za pojedini genotip (genotip specifični)
- b) proba koje umnožavaju sekvencu zajedničku za više genotipova (grupno specifični)

1.4.2.2.1. Genotip-specifične probe

Produkt umnožavanja virusnoga genoma s genotip-specifičnim oligonukleotidima je značajan samo za određen genotip HPV i zato ga nije potrebno dodatno analizirati. Genotip-specifične probe moraju biti izabrane tako da su komplementarne samo s

dijelom izabranoga područja virusnoga genoma čiji je raspored nukleotida značajan samo za određen genotip HPV. Međutim, spektar genotipova koje možemo odrediti na taj način je malen. Osim toga, da se odredi pojedini genotip, potrebno je izvesti veliki broj PCR reakcija s različitim genotip-specifičnim probama. Zbog toga, usprkos učinkovitosti i visokoj specifičnosti nekih genotip-specifičnih proba, ova metoda nije primjerena za određivanje genotipova velikog broja uzoraka (87).

1.4.2.2. Grupno-specifične probe

Većina metoda genotipizacije HPV, koja se temelji na PCR, izvodi se tako da se određeno područje HPV genoma umnoži s onim probama koje su komplementarne s najbolje očuvanim dijelom izabranoga područja. To su grupno specifične probe koje omogućuju umnožavanje širokoga spektra genotipova u jednoj reakciji (87). U literaturi su opisane brojne grupno-specifične probe koje umnožavaju manje ili veće odsječke gena (88, 89). Najčešće se koriste MY9/MY11 i GP5+/GP6+ koji umnožavaju dio gena L1 veličine 450, odnosno 150 bp (90). Umnoženi fragment mora sadržavati područja koja se kod različitih genotipova razlikuju, da bi se s dodatnim metodama mogao odrediti genotip. To mogu biti slijedeće metode:

- a) hibridizacijske metode s genotip-specifičnim probama
- b) metoda polimorfizma restrikcijskih fragmenata –RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- c) određivanje redoslijeda nukleotida

1.4.2.2.1. Hibridizacijske probe s genotip-specifičnim probama

Genotip-specifične probe moraju biti izabrane tako da su komplementarne samo s dijelom izabranoga područja virusnoga genoma čiji je raspored nukleotida značajan samo za određen genotip HPV.

Sve metode će biti samo spomenute, a opširnije će biti opisane samo metode koje se češće koriste, kao i metoda korištena u ovom radu.

1.4.2.2.1.1. Metoda dot-blot je ranije bila najčešće upotrebljavana metoda za analizu produkata PCR HPV (91). Za genotipizaciju produkata s ovom metodom, razvijeno je preko 40 genotip specifičnih proba (91, 92).

1.4.2.2.1.2. Metoda reverzni dot-blot nije primjerena za analizu velikoga broja uzoraka pa se često ne koristi (93, 94).

1.4.2.2.1.3. Metoda reverzni line-blot temelji se na hibridizaciji PCR produkta s genotip-specifičnim probama koje su vezane na nitroceluloznu membranu (95, 96). Metoda omogućuje hibridizaciju produkata PCR s velikim brojem genotip-značajnih proba u jednoj reakciji i zato je pogodna za velik broj uzoraka. To omogućuje određivanje širokog spektra genotipova, kao i rješavanje miješanih infekcija. INNO-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics, Belgija) je komercijalni test baziran na ovoj metodi. Njime je moguće odrediti 25 genotipova, međutim, za sada se može koristiti samo za istraživanje (97).

1.4.2.2.2.1.4. PCR-ELOSA je semikvantitativna metoda za dokazivanje HPV i za genotipizaciju HPV. Vezanje produkta PCR reakcije odvija se u mikrotitarskim pločicama. Metoda je relativno jednostavna i omogućuje testiranje većeg broja uzoraka. Opisano je više različitih PCR-ELOSA metoda (98, 99).

1.4.2.2.2.2. Razgradnja produkata PCR reakcije - RFLP

Najjednostavnija i najbrža metoda za genotipizaciju HPV je enzimska razgradnja produkta PCR reakcije (RFLP). Metoda se izvodi tako da dio genoma HPV umnožen PCR izložimo djelovanju restrikcijskih endonukleaza koje ga cijepaju na točno određenom mjestu ovisno o specifičnom nukleotidnom rasporedu. Nakon cijepanja produkti se elektroforetski odvoje i DNA se oboji. Specifični raspored fragmenata odgovara određenim genotipovima. To je potvrđeno i uspoređeno sekvencioniranjem HPV. Opisano je više različitih RFLP metoda koje se među sobom razlikuju u dijelu HPV genoma koji cijepaju, te u broju i vrsti upotrijebljenih endonukleaza (92, 100, 101). Osjetljivost metode je proporcionalna s brojem upotrijebljenih restrikcijskih enzima (92). Većina istraživača bira restrikcijske enzime empirijski, međutim, Forbes i suradnici razvili su metodu kojom se odgovarajući enzim može izabrati na objektivniji način (102). Najosjetljivija je metoda koju su razvili Bernard i suradnici; dio genoma L1 umnožen primerima My09 i My11 izložili su djelovanju 7 različitih restrikcijskih enzima; na taj način može se odrediti 44 različita genotipa (92).

1.4.2.2.3. Određivanje redoslijeda nukleotida (Sekvencioniranje)

Ovo je jedina metoda kojom definitivno možemo odrediti genotip HPV (103). U usporedbi s ostalim molekularnim metodama za genotipizaciju HPV, određivanje rasporeda nukleotida omogućuje preciznije tipiziranje već poznatih genotipova, otkrivanje mutacija i određivanje novih genotipova. Razvoj automatiziranih tehnika otvara mogućnost šire upotrebe ove visoko specifične metode u skoroj budućnosti.

1.5. DIJAGNOSTIKA BOLESTI UZROKOVANIH HPV

1.5.1. Dijagnostika preinvazivnih promjena vrata maternice

Kao što je već spomenuto, preinvazivne, intraepitelne promjene vrata maternice su obično asimptomatske i nevidljive golim okom.

Zbog toga se provodi probir svih žena redovitim citološkim pregledima; prema potrebi radi se kolposkopija s ciljanom biopsijom i patohistološkom analizom uzorka (104, 105).

U novije vrijeme u probir se sve više uključuje i dijagnosticiranje infekcija s HPV (106, 107, 108, 109).

1.5.2. Uloga citologije i klasifikacija citoloških promjena

Karcinom vrata maternice u žena je po učestalosti u svijetu na drugom mjestu (odmah iza karcinoma dojke) (7, 110). Međutim, zbog dugog premalignog stadija bolesti, učinkovitog otkrivanja i liječenja neinvazivnih oblika bolesti, ovo je rijetka onkološka bolest kod koje bi se dobro organiziranim programima probira mogao spriječiti invazivni rak vrata maternice (110, 111).

Još davne 1941. godine Papanicolaou i Traut su objavili povijesni rad o otkriću karcinomskih stanica u sluznici vrata maternice, kao i mogućnost otkrivanja karcinoma i

njegovih pretstadija mikroskopskim pregledom stanica sluznice (112). Kasnije je ova metoda općenito prihvaćena i uvedena u redovni ginekološki pregled kao osnovna metoda za otkrivanje i liječenje prekanceroznih promjena; u upotrebi se zadržala do danas. Prema stupnju promijenjenosti epitelnih stanica sluznice vrata maternice, razlikujemo pet stupnjeva u klasifikaciji po Papanicolau (PAP I – V): normalne stanice, upala ili blaga diskarioza, umjerena diskarioza, teška diskarioza, i maligne stanice (113).

Danas postoji nekoliko različitih citoloških klasifikacija (74). Često se koristi ona koju je krajem 60–tih prošlog stoljeća predložio Richard (114). On je uveo pojam cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN); morfološke promjene podijelio je u tri skupine CIN I - III. CIN I i CIN II opisuju blagu, odnosno umjerenu displaziju. CIN III obuhvaća tešku displaziju i intraepitelnu neoplaziju; to je prednost ove klasifikacije jer je često teško razlikovati ove dvije promjene.

U Bethesda citološkoj klasifikaciji koja je uvedena 1988. godine, prekancerozne promjene su podijeljene u dvije skupine: intraepitelne promjene niskog stupnja – LSIL (engl. low-grade squamous intraepithelial lesion) i intraepitelne promjene visokog stupnja – HSIL (engl. high-grade squamous intraepithelial lesion). LSIL obuhvaća promjene opisane kod blage displazije (CIN I), a HSIL promjene opisane kod umjerene displazije (CIN II), te teške displazije i intraepitelnog karcinoma (CIN III) (115). Epitelne promjene koje se razlikuju od normalnog epitela, ali ne pokazuju znakove diskarioze, uključene su u posebnu skupinu ASCUS (engl. atypical squamous cells of undetermined significance). 2001.godine Bethesda klasifikaciji dodana je nova kategorija ASC-H (engl. atypical squamous cells cannot exclude HSIL) (116). Danas se u Hrvatskoj rabi jedinstvena klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice, nazvana «Zagreb 2002» (117).

Odnosi između pojedinih klasifikacija prikazani su u tablici 2.

Klasifikacijski sistem	Citološka klasifikacija							
Bethesda	Normalne Stanice	Upala	ASCUS	Intraepitelne promjene				Invazivni karcinom
		Reaktivne promjene		LSIL		HSIL		
Richart			Kondilom	Cervikalna intraepitelna neoplazija				
				CIN 1	CIN 2	CIN 3		
Reagan (WHO)		Atipične stanice	Blaga displazija		Umjerena displazija	Teška displazija	Karcinom <i>in situ</i>	
Papanicolaou	I	II	III		IV		V	

Tablica 2. Odnosi između različitih citoloških klasifikacija promjena cerviksa

Prema referenci 74.

1.5.3. Uloga HPV testiranja u probiru i prevenciji cervikalnog karcinoma

Programi probira bazirani samo na konvencionalnoj citologiji imaju značajna ograničenja. U zemljama u kojim je probir uveden još 60-tih godina prošlog stoljeća, mortalitet se smanjio 50-70%, ali se nakon toga stabilizirao jer je dostignuta granica efektivnosti (118).

Naime, citologija ima velika ograničenja, od kojih je najveće niska osjetljivost. Lažno-negativni rezultati imaju velike medicinske i financijske, a u nekim zemljama i zakonske posljedice. I obratno, usprkos relativno visoke specifičnosti, lažno-pozitivni rezultati se javljaju u populaciji s niskom prevalencijom premalignih lezija i karcinoma vrata maternice, te dovode do nepotrebnih, često invazivnih zahvata. Da bi se povećala i osjetljivost i specifičnost, potrebno je poboljšati kvalitetu rada (uzimanje uzoraka, obradu, mikroskopiranje) i primjeniti nove metode u citologiji, kao Liquid-based thin layer Cytology – citologiju tanjih preparata i automatizirani screening (118).

Ova situacija, potaknuta razvojem medicinske tehnologije, dovela je do razvoja novih testova za detekciju pretstadija karcinoma vrata maternice. Najvažniji od njih je detekcija HPV. Testiranje HPV visokog rizika je osjetljivija metoda za otkrivanje ozbiljnih premalignih promjena (HSIL, CIN III) nego citologija, ali ima nižu specifičnost; naime, infekcija ovim virusima je vrlo česta i visok postotak žena ima infekciju s genotipovima visokog rizika, ali samo kod malog broja se razviju intraepitelne promjene visokog stupnja ili karcinom vrata maternice (9, 15, 26). Prevalencija HPV visokog rizika posebno je visoka u mladih žena kod kojih su češće tranzitorne infekcije (118).

Zbog toga je mjesto i uloga HPV testiranja u dijagnostičkom postupniku još uvijek predmet brojnih rasprava (119, 120, 121).

2003. godine u Americi je održan skup u organizaciji Ministarstva zdravstva i svih društava koja su uključena u ovu problematiku (122). S ciljem da se kliničarima pomogne efektivno korištenje testiranja HPV, te da se smanje nepotrebne kontrole i liječenja, testiranje HPV preporučuje se kao primarni screening uz dodatak citologiji za žene iznad 30 godina;

žene kod kojih su oba testa negativna, trebale bi se ponovo testirati tek za 3 godine; žene kod kojih je citološki test uredan, ali imaju prisutan HPV visokog rizika, imaju relativno nizak rizik za HSIL, i ne treba im se rutinski raditi kolposkopija, nego ponoviti oba testa za 6 – 12 mjeseci; ako je tada bilo koji od testova pozitivan, treba napraviti kolposkopiju. Ovaj postupnik prikazan je na slici 5:

Međutim, kod žena čija je citološka dijagnoza ASC-US, HPV testiranje indicirano je kod svih dobnih skupina; naime, prema nalazu HPV radi se trijaža za kolposkopiju.

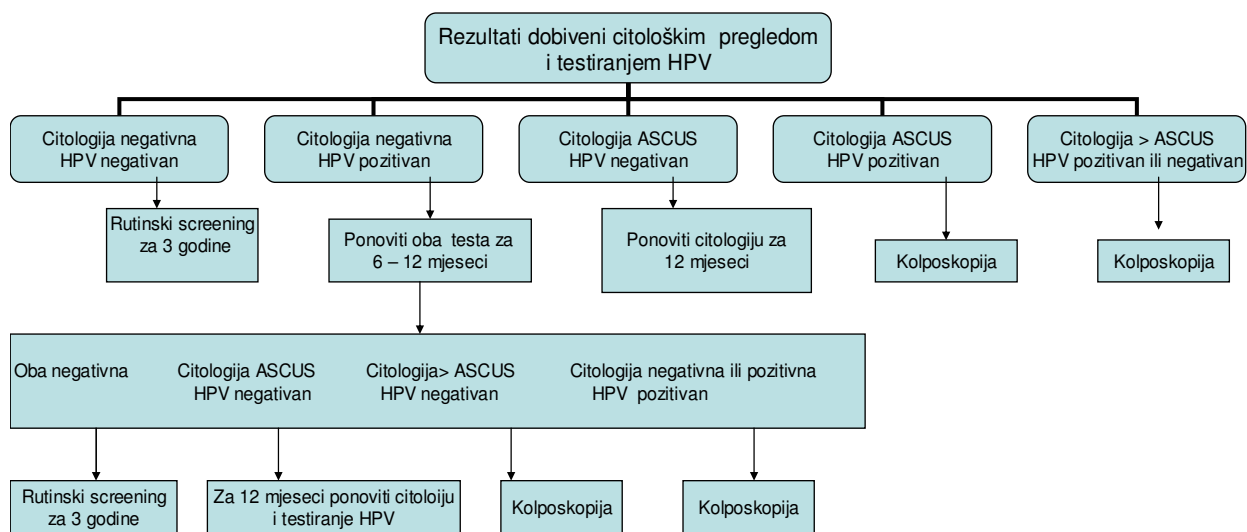
Rezultati nekih autora pokazali su da je uvođenje HPV testiranja u primarni probir kao dodatak citologiji značajno smanjilo pojavu premalignih lezija visokog stupnja (123, 124). Uz značajno smanjenje incidencije karcinoma vrata maternice, na taj način može se produžiti interval za probir na 5 godina i duže, pogotovo za žene starije od 50 godina koje su uvijek imale uredan citološki nalaz.

Kod 10-15% žena nakon konizacije i dalje je prisutan CIN, ili se javlja ubrzo nakon zahvata. Invazivni karcinom javlja se nakon konizacije koja je učinjena zbog CIN III, u jedne od 1000 žena godišnje. U praćenju tih žena testiranje HPV visokog rizika pokazalo se osjetljivijom metodom nego citologija (123, 124).

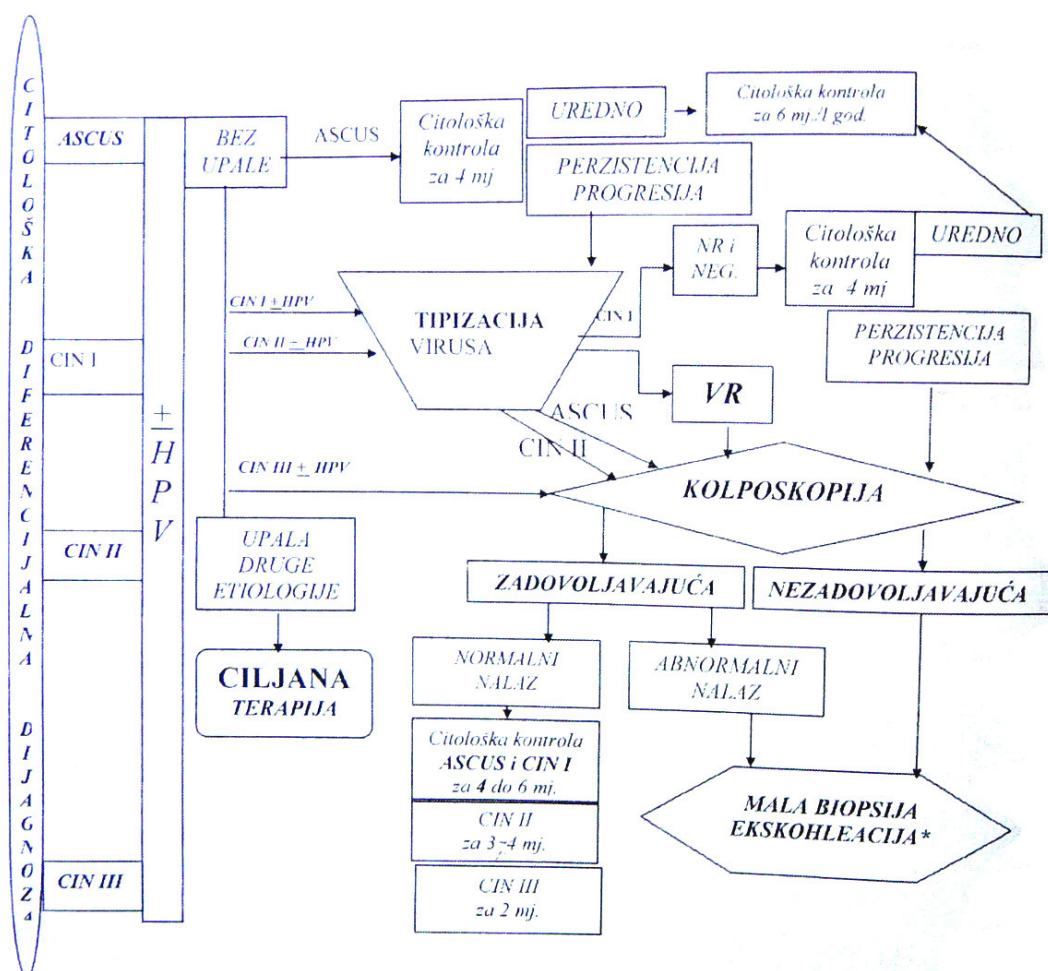
U Hrvatskoj je od 2001. godine u primjeni «Revidirani dijagnostičko-terapijski postupnik za premaligne bolesti vrata maternice» (125). Dijagnostički postupnik prikazan je na slici 6.

Slika 5. Dijagnostički postupnik koji kombinira citologiju i HPV testiranje za primarni screening.

Prema Wright i sur. (122)



Slika 6. Revidirani dijagnostički postupnik za premaligne bolesti vrata maternice, 2001.
Prema Ljubojević i sur. (125)



1.5.4. Kolposkopija

Kolposkopija je dijagnostička metoda za otkrivanje premalignih bolesti vrata maternice. U praksu je uvedena još dvadesetih godina prošlog stoljeća (126). Od tada je važeća kolposkopska klasifikacija nekoliko puta mijenjana i dopunjavana u skladu s novim znanstvenim spoznajama (127, 128). Trenutno je u upotrebi klasifikacija usvojena na Jedanaestom svjetskom kongresu iz cervikalne patologije i kolposkopije održanom u Barceloni 2002. godine (129).

Kolposkopski aparat sastoji se od stereoskopskog binokularnog mikroskopa s različitim povećanjima od 3.5 do 50 puta. Pri standardnom kolposkopskom pregledu preporučljivo je promatrati površinu vrata maternice i svodove rodnice najprije nakon ispiranja sluzi i sekreta fiziološkom otopinom, a zatim nakon premazivanja 3-5% -tnom otopinom octene kiseline pod normalnim osvjetljenjem, nakon toga kroz zeleni filter po Kraatzu i na kraju premazivanjem Lugolovom otopinom (Schillerov test) (130).

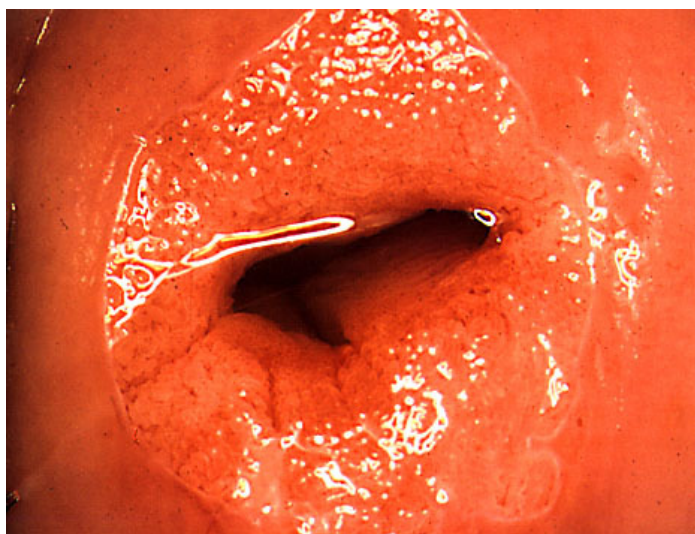
Kod urednog kolposkopskog nalaza mnogoslojni pločasti epitel je gladak i ružičast; nakon primjene kiseline ne promijeni boju, a nakon primjene Lugolove otopine oboji se smeđe zbog toga što sadrži glikogen. Izvorno se nalazi na vratu maternice i rodnici (130).

Cilindrični epitel se nalazi u endocerviksu, a može se naći na ektocerviksu (ektopija). Pri kolposkopiranju nakon primjene octene kiseline ima tipičnu "strukturu grozda" (130).

Transformacijska zona je područje između izvornog pločastog i izvornog cilindričnog epitela, unutar kojeg se mogu otkriti različiti stupnjevi zrelosti. U različitim stupnjevima zrelosti metaplastički se epitel nakon primjene octene kiseline može vrlo

blago obojiti u bijelo, ili djelomično smeđe nakon premazivanja Lugolovom otopinom (slika 7) (130).

U najnovijoj kolposkopskoj klasifikaciji transformacijska zona podijeljena je u tri grupe što omogućuje precizniji probir u cilju što ispravnijeg liječenja žena s abnormalnom zonom transformacije (129). Tip 1 zone transformacije je kompletno ectocervikalan i u potpunosti vidljiv, tip 2 ima i endocervikalnu komponentu, koja je potpuno vidljiva, za razliku od tipa 3 čija endocervikalna komponenta nije u potpunosti vidljiva.



Preuzeto iz Peronijeva atlasa
o kolposkopiji, 1991, Edizione
POLI, Milano

Slika 7. Kolposkopska slika normalne porcije s vidljivom skvamokolumnarnom granicom, višeslojno pločasti epitel gladak, cilindrični poput grozdova

Područja cervikalnih intraepitelnih lezija kolposkopski su vidljiva kao manja ili veća područja acetobijelog i jod negativnog epitela udruženog s karakterističnim krvožilnim slikama punktacija, mozaika i prisutnosti atipičnih krvnih žila (130).

Nakon premazivanja vrata maternice razrijeđenom otopinom octene kiseline područja visoke gustoće jezgara oboje se bijelo. Što je acetobijela promjena "gušća", i što se duže zadržava, to je za očekivati jaču intraepitelnu leziju.

Slika punktacija potječe od dilatiranih vrhova kapilara koje se sežu sve do površine epitela, a vide se kao sitnije ili krupnije crvene točkice na bijeloj podlozi. Što je punktacija jače izražena, možemo očekivati leziju jačeg stupnja.

Kolposkopsku sliku mozaika čine novostvorene krvne žile koje se javljaju kao pravokutna mrežica ili mozaik. Što je mozaik grublji, površinom širi i rasporedom krvnih žila nepravilniji, vjerojatnije se radi o leziji visokog stupnja (slika 8).

Kao što je već spomenuto, zreli pločasti epitel nakon premazivanja vrata maternice Lugolovom otopinom obojit će se snažno smeđe. Jod negativna polja mogu predstavljati nezrelu metaplaziju, cervikalnu intraepitelnu neoplaziju ili stanja hipoestrinemije.

Kod nalaza atipičnih krvnih žila kolposkopska slika krvožilnog crteža ne podsjeća ni na punktacije ni na mozaik, nema pravilnog grananja krvnih žila, nego uz nepravilan izgled imaju potpuno ili višekратно prekidan tijek.

Kolposkopski pregled bi nam trebao pružiti slijedeće podatke: da li je citološki utvrđena atipija epitela uopće kolposkopski vidljiva; ako je, gdje se nalazi, koliku površinu zahvaća, širi li se u cilindrični epitel cervikalnog kanala, da li je multicentrična i multilokularna, te da li je promjena u cjelosti vidljiva i postoji li sumnja na invazivni proces.



Fotodokumentacija
prof.dr.sc. G.Grubišić

Slika 8. Abnormalna kolposkopska slika, na prednjoj usni na 11 i 2, a na stražnjoj na 4 sata jače izražen mozaik

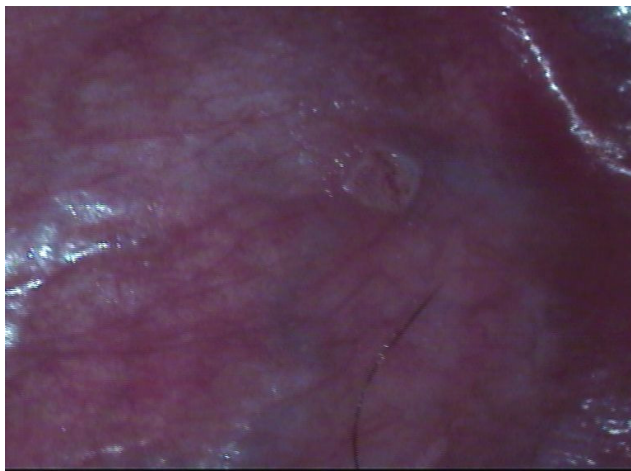
1.5.5. Dijagnostika HPV infekcija u muškaraca

Infekcija HPV-om u muškaraca je često asimptomatska, što predstavlja veliki dijagnostički problem. Uporaba kolposkopa, uvjetovala je bolje poznavanje, opisivanje i liječenje lezija povezanih s HPV-om, naročito onih subkliničkih.

HPV infekcije u muškaraca dijele se na kliničke, subkliničke i latentne infekcije. Klinički pregled je osnova za postavljanje dijagnoze vidljivih HPV lezija vanjskog spolovila. Treba pregledati cijelu anogenitalnu regiju uz pomoć jakog svjetla i povećala. Kod klinički asimptomatske bolesti anamneza je od posebne važnosti: dragocjen je podatak o citološkom nalazu partnerice (postojanje preinvazivnih promjena vrata maternice) (131, 132).

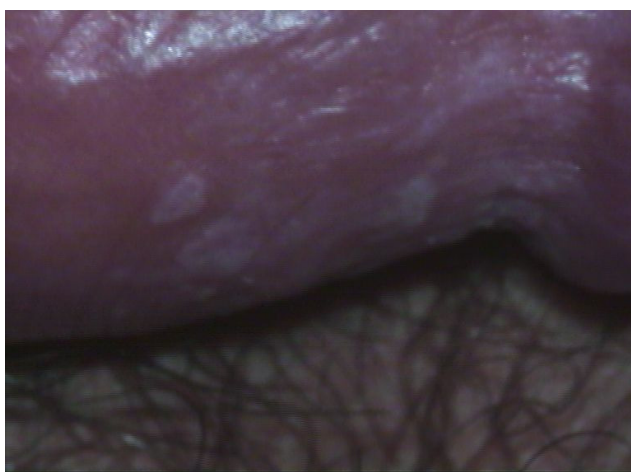
Subkliničke HPV infekcije dijagnosticiraju se upotrebom kolposkopa, a predhodno je potrebno aplicirati 3-5%-tnu octenu kiselinu. Ukoliko se kolposkopom gleda penis, pretraga se naziva peniskopija. Pacijenta je potrebno postaviti u ležeći položaj, te s vaticom natopljenom octenom kiselinom ili sprejem koji sadrži octenu kiselinu, aplicira na kožu i sluznicu penisa. Ukoliko postoji HPV infekcija, promjene se oboje bjelkasto zbog tzv. acido bijelog fenomena (engl. „acetowhitening phenomenon“). Subkliničke lezije, vidljive peniskopom, mogu se klasificirati kao: ravne (makularne), papularne, papilarne, klasični kondilom i PIN lezije (slike 9, 10, 11) (133).

Kod asimptomatskih muškaraca, uzorci tkiva uzimaju se s predilekcijskih mjesta na penisu (glans penis, sulcus coronarius, frenulom, prepucij) te orificiju uretre (134).



Fotodokumentacija
mr.sc.dr. S. Ljubojević

Slika 9. Peniskopska slika PIN lezije



Fotodokumentacija
mr.sc.dr. S. Ljubojević

Slika 10. Peniskopska slika papularnih kondiloma



Fotodokumentacija
mr.sc.dr. S. Ljubojević

Slika 11. Peniskopska slika makularnih kondiloma

1.6. EPIDEMIOLOGIJA

1.6.1. Epidemiologija HPV genitalnih infekcija

HPV je možda najčešća spolno prenosiva infekcija (engl. sexually transmitted infection – STI) u SAD-u. Svake godine javlja se 5.5 milijuna novih slučajeva; procjenjuje se da je 20 milijuna Amerikanaca inficirano ovim virusom (135). Epidemiološka istraživanja pokazuju da 50% žena postane inficirano HPV unutar 2 godine od početka seksualnog života (7, 135, 136).

Šiljasti kondilomi, jedna od manifestacija HPV infekcije, su česta pojava. U Engleskoj se postotak odlaska liječniku zbog kondiloma u posljednjih 25 godina povećao za 500% (137). Međutim, točnu prevalenciju je teško utvrditi zbog velikog broja asimptomatskih i subkliničkih infekcija (138, 139).

U Hrvatskoj ove infekcije također pripadaju među najčešće spolno prenosive infekcije (140, 141, 142). U jednom epidemiološkom istraživanju DNA HPV je nađena u obrisku vrata maternice u 60% seksualno aktivnih žena (143).

Kao i ostale STI, HPV genitalne infekcije se također najčešće javljaju u mladih spolno aktivnih ljudi; incidencija je najveća u dobi od 20. do 24. godine, i naglo opada nakon 40. godine (9, 32, 50, 138).

Subkliničke ili latentne infekcije su među mladim seksualno aktivnim ljudima češće nego kondilomi; prevalencija se općenito kreće od 20% – 50% (144).

Iako su ove infekcije, vjerojatno, važne u širenju infekcija među mladim seksualno aktivnim ljudima, mišljenja su različita (144, 145, 146). Naime, infektivnost

subkliničkih i latentnih HPV genitalnih infekcija u muškaraca nije poznata jer je teško dokazati prijenos. Neki autori smatraju da uopće ne treba testirati niti liječiti klinički asimptomatske muškarce; naime, većina ovih infekcija je prolazna, efikasno liječenje ne postoji, a prirodni tijek infekcije i posljedice nisu sasvim poznati (144). Međutim, postoje istraživanja koja podupiru stajalište da muškarci s asimptomatskim infekcijama predstavljaju rezervoar HPV virusa. Prema nekim autorima u oko 40% - 50% muških partnera žena koje imaju HPV infekciju, peniskopskim pregledom su nađene promjene povezane s HPV (147). Wikström i sur. našli su HPV barem jedamput u 26% klinički asimptomatskih muškaraca koji su zbog drugih razloga u više navrata dolazili u STD kliniku (144). Postotak inficiranih muških partnera žena koje imaju patološki citološki nalaz, značajno je veći, i prema nekim autorima doseže do 65% (148, 149).

1.6.2. Epidemiologija karcinoma vrata maternice

Najvažnija posljedica HPV genitalne infekcije je karcinom vrata maternice. Po učestalosti u svijetu je na drugom mjestu (procjenjuje se da se u svijetu godišnje javlja 500 000 novih slučajeva), a među vodećim uzrocima smrti na petom; 2001. godine od ove je bolesti u svijetu umrlo oko 258 000 žena, od toga 30 000 u Europi (7, 110, 150, 151). Međutim, ovo je rijetka onkološka bolest kod koje se dobro organiziranim screening programima može spriječiti invazivni rak vrata maternice (152).

DNA HPV je otkrivena u gotovo svim karcinomima vrata maternice (7, 8), a osim toga nađeno je da prevalencija visokorizičnih genotipova HPV značajno raste sa stupnjem cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) (153, 154). Zahvaljujući ovoj

značajnoj povezanosti, predloženo je da se detekcija genotipova HPV visokog rizika koristi u identifikaciji žena s visokim rizikom za razvoj karcinoma vrata maternice (155). Rozendaal i sur. pokazali su da žene s HPV visokog rizika i urednim citološkim nalazom vrata maternice imaju 116 puta veći rizik za razvoj cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) trećeg stupnja (III) u usporedbi sa ženama s urednim citološkim nalazom kod kojih nije pronađen HPV visokog rizika (156). Slične rezultate objavili su još neki autori (8, 9, 157).

Prevalencija visokorizičnih genotipova HPV dokazana u različitim populacijama žena u svijetu, kreće se između 25-45% u žena s CIN I, između 60-80% kod žena s CIN II i između 90-95% kod žena s CIN III (8, 158).

Poznato je da većina HPV infekcija spontano regredira u periodu od 2 godine. Samo se u malog postotka žena razviju citološke promjene visokog stupnja (CIN III, HSIL) ili invazivni karcinom (121). Šestogodišnja prospektivna studija, u kojoj je u Amsterdamu bilo pregledano 405 žena, pokazala je da je za nastanak CIN III isključivo odgovorna perzistentna infekcija s visokorizičnim genotipovima HPV (159). Perzistentne infekcije povezane su s genotipom i količinom virusa, mogućim multiplim infekcijama, kao i dobi žene (9, 26, 27, 121). Međutim, većina lezija, bez obzira na genotip, spontano regredira bez ikakvih dugotrajnih posljedica (26, 27, 121). Kao što je već spomenuto, brojna epidemiološka istraživanja pokazala su da za nastanak karcinoma nije dovoljna samo infekcija s HPV visokog rizika. Osim različitih ekstrinzičkih rizičnih čimbenika (pušenje, veći broj spolnih partnera, itd.), razmatraju se i različite intrinzičke karakteristike domaćina, npr. mutacije unutar tumor supresorskih gena i genetske karakteristike koje onemogućuju imunom sistemu da suprimira ili eliminira HPV infekciju (39, 40, 41, 42, 43, 44).

1.6.3. Raspored genotipova HPV

Prevalencija visokorizičnih genotipova HPV značajno je viša u žena s patološkim citološkim nalazom (8, 9, 158). U brojnim epidemiološkim studijama istraživani su raspored genotipova među raznim skupinama žena u svijetu (159, 160, 161, 162, 163, 164).

U nedavno objavljenu meta-analizu o povezanosti genotipova HPV i karcinoma vrata maternice uključeno je 85 istraživanja (165). HPV 16 nađen je u oko 50% karcinoma, a HPV 18 u 10 do 14% tumora. To je samo potvrdilo dosadašnja saznanja da je HPV 16 najčešći genotip nađen u karcinomu vrata maternice. Ostali izolirani genotipovi bili su slijedeći (poredani po učestalosti): HPV 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 i 70.

Bosch i sur. su 1995. godine objavili rezultate velikog multicentričnog istraživanja među ženama s karcinomom vrata maternice koje je obuhvatilo 22 zemlje (7). Nađeno je više od 20 različitih genotipova; HPV 16 bio je najčešće izoliran genotip u svim zemljama, osim u Alžiru i Indoneziji gdje je HPV 18 bio najčešće izoliran genotip. U svim ostalim zemljama HPV 18 bio je po učestalosti na drugom mjestu. I u drugim istraživanjima, u žena s karcinomom vrata maternice HPV 16 i 18 su najčešće izolirani genotipovi (160, 161), osim na Tajvanu i u Kini gdje je na drugom mjestu po učestalosti bio genotip 58 (166, 167, 168).

Prevalencija visokorizičnih genotipova HPV raste sa rastućim stupnjem premalignih promjena. HPV 16 je najčešći u svim skupinama (8, 9).

Zanimljiva su istraživanja o raspodjeli genotipova u populaciji žena s urednim citološkim nalazom. Spomenut ćemo rezultate velikog istraživanja na populaciji žena u

Nizozemskoj, koje su 2000. godine objavili Jacobs i sur. (169). Oni su na populaciji od 3305 žena s urednim citološkim nalazom našli čak 26 različitih genotipova. Ukupna prevalencija HPV bila je 4.6%, a genotipova visokog rizika 3.3%. Najčešće izolirani genotipovi bili su 16, 31 i 18. U drugim istraživanjima u ovoj skupini žena uz visok postotak infekcije s HPV 16 i 31, nađeni su genotipovi koji u Nizozemskoj nisu nađeni; npr. HPV 53, 73 i MM4 u Češkoj (161).

Multiple infekcije s visokorizičnim genotipovima često su nađene u mladih žena; u žena s urednim citološkim nalazom nađene su u niskom postotku; između žena s LSIL i HSIL nema razlike u učestalosti (170, 171).

1.6.4. Epidemiološke studije u Hrvatskoj

U Hrvatskoj se s HPV infekcijama već desetak godina bavi skupina autora koji su do sada objavili određene rezultate u vezi s raspodjelom najčešćih genotipova (6/11, 16, 18, 31, 33) na velikom broju žena s različitim citološkim promjenama (140, 141, 142, 143). Također su rađene epidemiološke studije najčešćih genotipova kod muškaraca s kondilomima (172, 173) kao i kod muškaraca bez klinički vidljivih promjena (174), iako treba napomenuti da su konzistentne studije vezane za mušku populaciju relativno rijetke kod nas, kao i u svijetu.

Spomenut ćemo rezultate nekoliko novijih istraživanja:

2001.godine Grce i sur. objavili su rezultate istraživanja na uzorku od 1874 žene s različitim stupnjem citoloških promjena. Pozitivno je bilo 1207 uzoraka (64%). Od toga je 51% uzoraka bilo tipizirano. HPV 16 je također bio najčešće izoliran genotip;

slijedeći po učestalosti bio je 6/11, dok su genotipovi 18, 31 i 33 znatno rjeđe izolirani. Neidentificirani genotipovi distribuirani su podjednako između citoloških promjena visokog i niskog stupnja (HSIL i LSIL). Ostala istraživanja na ženskoj populaciji pokazala su slične rezultate (140).

Zanimljivi su rezultati istraživanja kod muškaraca s klinički vidljivim promjenama u smislu genitalne HPV infekcije koje su objavili Skerlev i sur (175). Genotipovi HPV visokog rizika (16, 18, 31, 33) statistički su značajnije lokalizirani na promjenama distalnog dijela kože i sluznice vanjskog muškog genitala u usporedbi s genotipovima HPV niskog rizika. Stoga se može zaključiti da šiljasti kondilom, kao klinički entitet, može predstavljati stalan izvor infekcije genotipovima visokog rizika bez obzira na prividno «benigni» klinički izgled.

Međutim, u svim dosadašnjim istraživanjima određivani su samo najčešći genotipovi visokog i niskog rizika (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33).

Potpunija genotipizacija mogla bi pružiti dodatnu informaciju za procjenu individualnog rizika, kao i pri donošenju odluka o liječenju. Osim toga, informacija o rasporedu genotipova u određenoj populaciji bitna je za izbor odgovarajućeg probirnog testa. Odgovarajući probirni test bitan je preduvjet za uspostavu dijagnostičkog protokola u određenom geografskom prostoru. Informacija o raspodjeli određenih genotipova HPV važna je i za razvoj učinkovitog cjepiva. Naime, VLP vakcina najvjerojatnije pruža tipno-specifičnu zaštitu (176); za uspješnu prevenciju karcinoma vrata maternice, vakcina bi trebala biti multivalentna i sadržavati što veći broj genotipova visokog rizika koji se nalaze u određenom području.

1.7. LIJEČENJE GENITALNIH INFEKCIJA UZROKOVANIH HPV

Za sada ne postoji jedinstveno liječenje koje je podjednako uspješno i praktično za liječenje svih manifestacija genitalnih infekcija. Nedostatak svih oblika terapije je relativno visok postotak rekurencije. Način primjene, kao i nuspojeve, ograničavaju primjenu pojedinih vrlo efikasnih lijekova. Često se koristi kombinirano liječenje.

Liječenje možemo podijeliti u slijedeće kategorije (16, 27):

1. Lokalnodestruktivne metode

U ove metode ubrajaju se :

- kirurške metode (ekskohleacija, elektrokauterizacija, ekscizija)
- krioterapija (tekućim dušikom)
- terapija laserom (CO₂, yttrium aluminium garnet)
- primjena bikloroctene ili trikloroctene kiseline
- primjena podophyllina i podophyllotoxina

2. Antimetaboličko liječenje

- 5-fluorouracil (5-FU)

3. Antivirusno liječenje

- cidofovir
- interferoni

4. Liječenje imunomodulatorima

- imiquimod

Izbor liječenja prvenstveno ovisi o vrsti i lokalizaciji promjena, iako i neki drugi činitelji također igraju ulogu (veličina lezije, dob, spol) (177).

Liječenje se najčešće bazira na uklanjanju klinički vidljivih promjena na koži i sluznicama (kondilomi, obične bradavice) koje su znak «aktivne» infekcije. Terapija je najčešće dugotrajan i višekratan postupak. Krioterapija je još uvijek najčešći način liječenja negenitalnih bradavica. Kondilomi se mogu ukloniti krioterapijom, premazivanjem podophyllinom, kirurški (ekskohleacija, elektroauterizacija, ekscizija) (177). U obzir dolazi i liječenje imunomodulatorskim i interferonskim kremama (177).

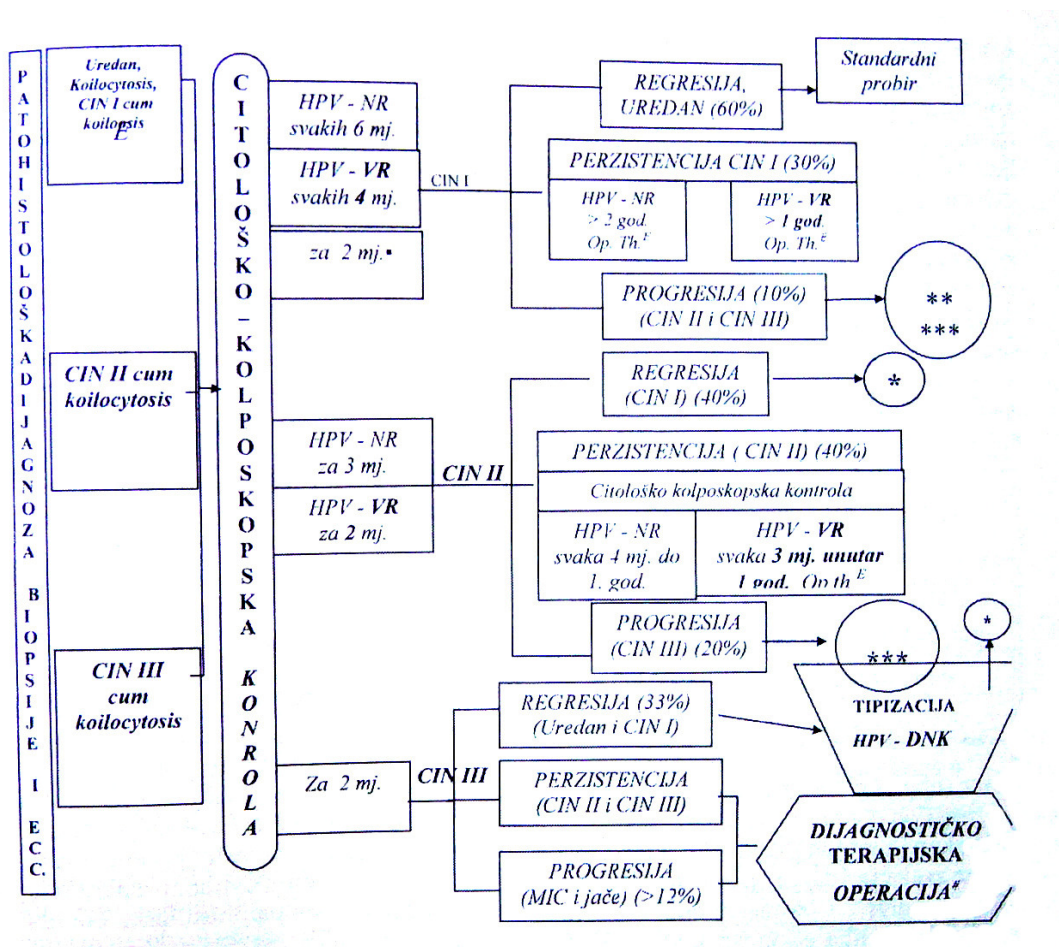
Kod intraepitelnih promjena vrata maternice odluka o načinu liječenja donosi se na temelju više parametara kao što su dob, peristencija ili progresija, te stupanj citološke promjene, kolposkopski i histopatološki nalaz (126, 178). S obzirom da se uglavnom radi o mladim ženama u generativnoj dobi, prevladava stav o što poštenijem liječenju koje će omogućiti eradikaciju neoplastične promjene, ali neće ostaviti trajne posljedice na reproduktivnim organima žene. Na slici 12 prikazan je terapijski postupnik kod intraepitelnih promjena vrata maternice (125).

Danas se najčešće koristi loop elektrokirurška ekscizija - LETZ (engl.loop excision of the transformation zone) koja ima prednost pred drugim lokalnodestruktivnim metodama (krioterapija, laser) jer omogućuje uzimanje tkiva za histopatološki pregled. Ovisno o opsežnosti zahvata, ova se metoda može koristiti i u dijagnostičke i u terapijske svrhe (178).

Liječenje laserom uglavnom se koristi za anatomske teško dostupne lokacije. Ova terapija je skupa i zahtijeva posebno educirano osoblje (178).

Slika 12. Terapijski postupnik kod intraepitelnih promjena vrata maternice.

Prema Ljubojević i sur. (125)



1.8. RAZVOJ VAKCINE

Zbog povezanosti HPV s nastankom karcinoma vrata maternice, zadnjih godina ubrzano se radi na razvoju vakcine. U slučaju HPV, stvaranje tradicionalne vakcine bazirane na mrtvom ili atenuiranom virusu nije moguće, dijelom zbog nemogućnosti da se virus uzgoji u velikim količinama (176). Zbog toga se većina profilaktičkih vakcina bazira na kasnoj bjelančevini L1, samoj ili u kombinaciji s bjelančevinom L2. Takve strukture koje nalikuju na pravi virion, ali ne sadrže virusnu DNA, nazivaju se VLS (engl. virus like particles) (176, 179). Ova vakcina dovodi do stvaranja neutralizirajućih protutijela u vakciniranih osoba i pokazala se efikasnom, sigurnom i vrlo imunogenom; u kliničkom pokusu HPV 16 L1 VLP pokazala je odličnu zaštitu kod perzistentnih infekcija i različitih citoloških promjena uzrokovanih genotipom 16 (179). U postojeće vakcine uključen je samo HPV 16 i 18 L1 VLP (sa ili bez HPV 6 i 11) (179, 180, 181). U tijeku je 3. faza ispitivanja kvadrivalentne profilaktičke vakcine (HPV 6-11-16-18 VLP) u različitim populacijama (179, 182). Za sada je vakcinirano oko 13 000 žena; dosadašnji rezultati pokazuju da se vrlo dobro podnosi. Kompletni rezultati ovih ispitivanja, koji se očekuju za nekoliko godina, pružit će podatke o efikasnosti, trajanju zaštite, unakrsnom imunitetu, kao i druge podatke koji su potrebni da bi vakcina dobila licencu u različitim zemljama. VLP vakcina najvjerojatnije pruža samo tipno-specifičnu zaštitu; za uspješnu prevenciju karcinoma cerviksa, vakcina bi trebala biti multivalentna i sadržavati najčešće genotipove visokog rizika (179). Vakcina koja sadrži samo HPV 16 L1 VLP potencijalno može spriječiti samo 53.5% karcinoma cerviksa; pentavalentna vakcina koja bi uključivala VLPs genotipova 16, 18, 45, 31 i 33, mogla bi spriječiti ovaj karcinom u 83% slučajeva (179).

Paralelno se radi i na razvoju terapijske vakcine (183). Od nje se očekuje da eliminira postojeću HPV infekciju, kao i djelovanje na tumore povezane s HPV. U pripremi terapijske vakcine najčešće se koriste onkogene bjelancevine E6 i E7 (183). Efikasni imuni odgovor u ovom tipu vakcine bazira se uglavnom na staničnoj imunosti (183). U ovom trenutku i različite terapijske vakcine su u fazi kliničkih ispitivanja; preliminarni rezultati su ohrabrujući (183).

CILJ I SVRHA RADA

Cilj i svrha ovoga rada bila je utvrditi:

- 1.** Kombinacijom metode cijepanja dobivenih amplifikata restrikcijskim enzimima (restriction fragment length polymorphism – RFLP) na različitim dijelovima genoma odrediti tipove u miješanim infekcijama i dokazati neke genotipove koje do sada nije bilo moguće tipizirati, te eventualno odrediti podtipove unutar nekih genotipova HPV.
- 2.** Odrediti povezanost dobivenih rezultata HPV tipizacije s citološkim nalazom obrisaka vrata maternice.
- 3.** Usporediti dobivene rezultate HPV tipizacije muških ispitanika i različitih skupina žena.
- 4.** Provjeriti da li je rutinska probirna metoda (Hybrid Capture 2) dovoljno osjetljiva za detekciju genotipova koje smo prethodno verificirali u našim uzorcima metodom PCR.
- 5.** Na temelju rezultata istraživanja pokušati odabrati optimalnu RFLP metodu kojom ćemo moći identificirati velik broj anogenitalnih genotipova.
- 6.** Na temelju rezultata istraživanja pokušati stvoriti polazne pretpostavke za uspostavu optimalnog algoritma za tipizaciju genotipova HPV u Hrvatskoj.

ISPITANICI I UZORCI U ISTRAŽIVANJU

3.1. ISPITANICI I KONTROLNA SKUPINA

Ispitivanje je provedeno u Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i u Venerološkoj (STD) ambulanti Klinike za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U studiju je uključeno 120 ispitanika podijeljenih u 4 skupine:

1. Skupina od 25 žena s CIN I
2. Skupina od 25 žena s CIN II i/ili III
3. Skupina od 50 muškaraca kod kojih nema klinički vidljivih promjena u smislu HPV genitalne infekcije i koji su bili upućeni na testiranje jer njihova partnerica ima dokazanu infekciju s HPV visokog rizika
4. Kontrolnu skupinu čini 20 žena s urednim citološkim nalazom

3.2. UZORCI

Uzorci za ispitivanje ženskih ispitanika su obrisci vrata maternice. Uzimani su prema indikacijama pri rutinskom ginekološkom pregledu i pohranjeni u komercijalni transportni medij HC 2 (Digene Specimen Collection Kit, Silver Spring, Maryland, SAD). Iz istog uzorka rađena je i genotipizacija. Uzorci su do obrade bili pohranjeni na -20 °C. Uzorci su bili izabrani metodom slučajnih brojeva između pozitivnih uzoraka koji su stigli u laboratorij u periodu 01.09.2003.g. do 01.10.2004.g.

Uzorci za ispitivanje muških ispitanika su bioptat kože i/ili sluznice genitalne regije. Uzeti su ekskohleacijski uz prethodnu primjenu anestetičke kreme EMLA^R (Astra-Zeneca) u Ambulanti za spolno prenosive bolesti (STD, Venerološka ambulanta) Klinike za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su također biti pohranjeni u transportni medij HC 2 i čuvani do obrade na -20 °C.

Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb u kolovozu 2002. godine. Svi ispitanici su prije uključivanja u studiju potpisali informirani pristanak.

METODE ISTRAŽIVANJA

U ispitivanju smo koristili sljedeće metode:

4.1. KLINIČKE METODE

Osobna anamneza, epidemiološka anamneza, klinički pregled.

4.2. METODE MOLEKULARNE MIKROBIOLOGIJE

4.2.1. HPV DNA test (Digene Hybrid Capture 2)

Princip testa je sljedeći: 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 sastoji od sljedećih faza:

1. 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 $\frac{1}{2}$ količine reagensa za denaturaciju (na 1 mL uzorka dodaje se $\frac{1}{2}$ 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°.

2. 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 treba ukapati 25 μ L probe A ili probe B (mješavina genotipova niskog, odnosno, visokog rizika) i 75 μ L 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.

3. 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.

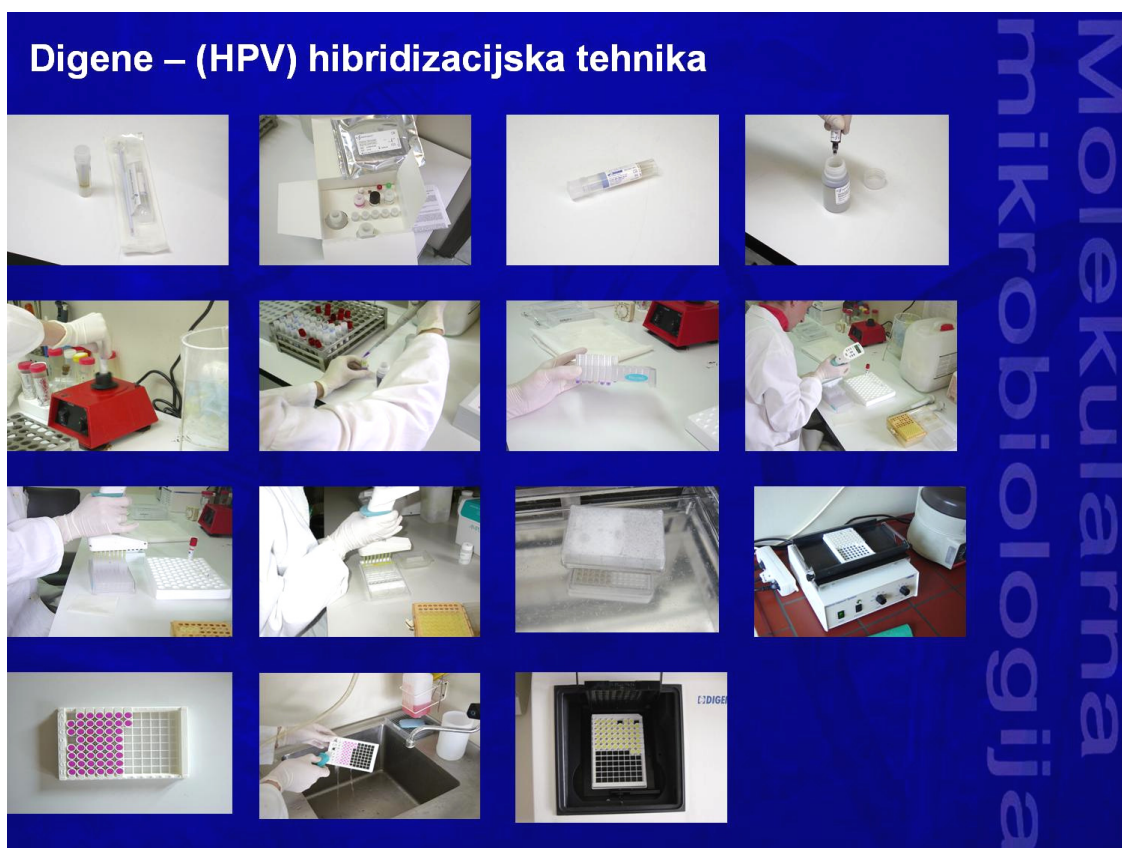
4. Detekcija nastalog hibrida

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) pripremaju 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 emerald 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.



Slika 13. Postupak izvođenja Digene Hybrid Capture 2 testa

4.2.2. GENOTIPIZACIJA HPV

Genotipizaciju smo radili metodom enzimske razgradnje produkata PCR-a.

4.2.2.1. Izolacija DNA HPV

(za umnožavanje primerima MY09/ MY11 i p1/ p2)

Izolacija se vrši iz originalnog transportnog medija. U sterilnu epruvetu za mikrocentrifugiranje od 1.5 mL stavi se 200 μ L uzorka, 20 μ L proteinaze K (800 μ L/mL) i 2 μ L 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.

4.2.2.2. Umnožavanje DNA HPV lančanom reakcijom polimeraze

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

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

2. p1 i p2, koji umnožavaju dio gena E1 veličine 526-595 bp (ovisno o genotipu).

Upotreba ovih primera omogućuje umnožavanje velikog broja mukozotropnih genotipova, među ostalim i nekih rjeđih, kao HPV 39 i 58.

3. GH20 i PC04; to je dio gena za β -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 otpipetira oko 49.75 μ L PCR mješavine (master mix) i 0.25 μ L 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 MgCl₂, 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 do digestije s restrikcijskim endonukleazama držali na +4°C.

Termalni ciklusi za oligonukleotide p1/p2 bili su:

inicijalna denaturacija	95°C	5 minuta	1 ciklus
denaturacija	94°C	1 minuta	
sljepljivanje	42°C	1.5 minuta	
ekstenzija	72°C	1.5 minuta	35 ciklusa

Nakon zadnjeg ciklusa PCR slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C. Reakcijsku mješavinu smo do digestije s restrikcijskim endonukleazama smrzovali na -20°C.

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 neposredno prije stvrdnjavanja dodamo 5 µL etidijeva bromida (interkalarna boja koja se veže na dvolančanu DNA; pri izlaganju UV svjetlu etidijev bromid vezan za dvolančanu DNA se aktivira i na taj način 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
- specifičnost produkata određujemo uspoređivanjem veličine produkta PCR i dijelova DNA koji sadrži molekularni marker.

4.2.2.3. Metoda cijepanja dobivenih amplifikata restrikcijskim enzimima (engl. restriction fragment length polymorphism – RFLP)

Metoda se izvodi tako da dio genoma HPV umnožen PCR-om izložimo djelovanju restrikcijskih endonukleaza koje ga cijepaju na točno određenom mjestu ovisno o specifičnom nukleotidnom rasporedu. Nakon cijepanja produkti se elektroforetski razdvoje i DNA se oboji. Specifični raspored fragmenata odgovara određenim genotipovima.

Za određivanje genotipova upotrijebili smo dvije RFLP metode, odnosno enzimima smo cijepali 2 različita dijela genoma HPV:

1. Dio gena L1 veličine 450 bp koji obuhvaća više od 50 različitih genotipova, a koji omeđuju početni oligonukleotidi MY09 i MY11; to su jedini početni oligonukleotidi za koje je razvijena osjetljiva metoda genotipizacije koja ima visoku osjetljivost i specifičnost, a koja se ne temelji na određivanju redoslijeda nukleotida. Ovom metodom određena su 44 različita genotipa (tablica 3) (92).

2. Dio gena E1 veličine 526-595 bp (ovisno o genotipu) koji je omeđen početnim nukleotidima p1 i p2; upotreba ovih primera omogućuje umnožavanje velikog broja mukozotropnih genotipova, među ostalim i nekih rjeđih, kao HPV 39 i HPV 58.

Restrikcija

U sterilnu epruvetu za mikrocentrifugiranje otpipetiramo 7.5 µL vode, 5 µL umnoženog uzorka, 1.5 µL enzimskog pufera i 1 µL enzima (*BamH I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I* i *Rsa I*). Ovu otopinu digestiramo u termobloku 1 sat na 37°C. Reakciju prekidamo dodavanjem 2 µL loading otopine (smjesa boje, saharoze i glicerola). Uzorak zatim nanese na pripremljeni agarozni gel i pustimo da se fragmenti razdvoje u električnom polju. Gel osvjetlimo na transluminatoru, vizualiziramo odvojene fragmente i snimimo ih polaroidnom kamerom. Interpretiramo ih prema specifičnom rasporedu fragmenata (tablica 3).

Tablica 3. Specifični raspored fragmenata dobivenih RFLP metodom na dijelu gena L1 (prema referenci 92)

HPV Type	BamHI	DdeI	HaeIII	HinfI	PstI	RsaI	Sau3AI
HPV6b	449	382	217	234	449	161	366
uncut: 449 bp		67	124	215		149	63
			108			72	20
						67	
HPV11	336	447	217	234	242	216	366
	83	2	124	215	207	135	63
uncut: 449 bp			108			72	20
						26	
HPV13	372	326	204	240	213	175	372
	83	62	127	215	242	135	63
uncut: 455 bp			67	124		73	20
						72	
HPV16	452	452	444	452	216	310	369
			8		210	72	63
uncut: 452 bp					26	70	20
HPV18	372	432	455	455	242	135	372
	83	23			213	125	63
uncut: 455 bp						85	20
						72	
						38	
HPV26	455	455	455	455	102	365	372
					353	72	63
uncut: 455 bp						18	20
HPV31	452	283	328	237	216	380	369
		167	124	215	210	72	63
uncut: 452 bp			2		26		20
HPV31b	452	285	328	237	216	380	369
		90	124	215	210	72	63
uncut: 452 bp			77		26		20
HPV32	366	320	317	234	449	216	366
	83	21	124	215		161	63
uncut: 449 bp			108	8		72	20
HPV33	449	320	449	234	242	236	267
		77		215	207	102	162
uncut: 449 bp						72	20
						39	
HPV34	458	211	334	458	253	186	438
		151	124		179	161	20
uncut: 458 bp			88		26	96	
			8			15	
HPV35	452	294	261	452	426	177	369
		135	180		26	161	63
uncut: 452 bp			23	8		72	20
						42	
HPV39	455	324	455	355	330	260	249
		131		100	125	123	123
uncut: 455 bp						72	63
							20
HPV40	240	297	447	455	455	365	240
	132	158	8			90	132
uncut: 455 bp			83				63
							20
HPV42	366	341	449	234	449	242	366
	83	108		215		135	63
uncut: 449 bp						72	20
HPV44	455	297	223	455	455	222	405
		112	124			161	30
uncut: 455 bp			46	108		72	20
HPV45	372	324	447	455	242	338	372
	83	131	8		213	72	63
uncut: 455 bp						45	20
HPV51	237	362	379	452	452	380	237
	215	90	73			72	132
uncut: 452 bp							63
							20
HPV52	449	357	258	449	423	449	366
		92	183		26		63
uncut: 449 bp			8				20
HPV53	449	206	232	368	449	449	342
		158	217	81			87
uncut: 449 bp			85				20
HPV54	369	452	217	234	452	138	369
	83		127	218		125	63
uncut: 452 bp			108			117	20
						72	
HPV55	455	112	215	215	455	165	405
		111	124	207		161	30
uncut: 455 bp			101	108	33	72	20
			85	8		57	
			46				

HPV Type	BamHI	DdeI	HaeIII	HinfI	PstI	RsaI	Sau3AI
HPV56	449	307	275	449	242	310	429
uncut: 449 bp		142	166		207	72	20
			8			49	18
HPV57	449	211	449	449	296	449	328
		142			153		38
uncut: 449 bp							33
		50					26
		46					24
HPV58	449	348	449	235	216	306	366
		101		214	207	111	57
uncut: 449 bp					26	32	20
							6
HPV59	452	452	396	452	426	452	402
			56		26		24
uncut: 452 bp							20
							6
HPV61	455	455	212	455	455	185	372
			211			180	63
uncut: 455 bp			24			72	20
			8			18	
HPV62	449	449	232	449	341	359	399
			217		108	72	30
uncut: 449 bp						18	20
HPV64	375	211	334	367	253	186	375
	83	151	124	91	179	161	63
uncut: 458 bp			87		26	72	20
			9			39	
HPV66(PAP88)	366	291	449	449	207	449	366
	83	158			150		63
uncut: 449 bp					66		20
					26		
HPV67	449	307	266	234	423	310	366
		92	183	215	26	72	63
uncut: 449 bp			50			67	20
HPV68(ME180)	372	455	455	215	455	260	249
	83			140		85	123
uncut: 455 bp				100		72	63
						38	20
HPV69	372	455	223	455	455	365	372
	83		183			72	33
uncut: 455 bp			49			18	30
							20
MM4(W138)	455	288	455	241	455	383	435
		167		214		72	20
uncut: 455 bp							
MM7(PAP291)	369	452	383	452	317	380	369
	83		69		135	72	63
uncut: 452 bp							20
MM8(PAP155)	452	220	346	214	452	310	369
		142	106	106		142	63
uncut: 452 bp			90		95		20
					37		
MM9(PAP238A)	458	243	458	458	432	201	408
		215			26	161	30
uncut: 458 bp						96	20
LVX100	452	297	220	452	452	362	369
		155	208			72	63
uncut: 452 bp			24			18	20
IS39	455	243	455	241	455	383	435
uncut: 455 bp			212	214		72	20
CP141	372	455	232	240	242	231	372
	83		117	215	213	123	63
uncut: 455 bp			106			72	20
						29	
CP6108	369	246	325	452	452	380	369
	83	152	127			72	33
uncut: 452 bp			54				24
							6
CP8304	452	452	127	452	341	452	432
			121		111		20
uncut: 452 bp			108				
			96				
CP4173	455	300	220	455	455	365	372
		155	211			72	63
uncut: 455 bp			24			18	20
CP8061	452	320	217	346	360	380	381
		132	127	106	92	72	51
uncut: 452 bp			108				20

4.3. KEMIČALIJE

4.3.1. HPV DNA test

- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1. Komercijalni test Digene Hybrid Capture 2
(Digene Corporation, Silver Spring, SAD) | 96 testova/u tvorničkom pakiranju |
| 2. Digene Cervical Sampler | 50 kom./kutiji |

4.3.2. Izolacija DNA

Proteinaza K, Sigma

Otopili smo proteinazu K u vodi da dobijemo konačnu koncentraciju od 50 mg/mL. Tako razrijeđenu podijelili smo u alikvote po 40 µL. Čuva se na -20°C.

Tween 20, Sigma

Polyoxyethylene – sorbitan monolaureate

4.3.3. Lančana reakcija polimeraze

Začetnici, Biomol, Berlin

Svi začetnici isporučeni su liofilizirani. U sterilnom kabinetu otopi se količina sintetiziranog primera u 1 mL vode. Iz te otopine radi se razrijeđenje da se dobije željena koncentracija primera od 50 pmol-a.

Regija	Kratika začetnika	Slijed nukleotida	Veličina PCR produkta
L 1	MY09 MY11	5'CGTCC(A,C)A(A,G)(A,G)GGA(A,T)ACTGATC 5'-GC(A,C)CAGGG(A,T)CATAA(C,T)AATGG	450 bp
E 1	P1 P2	TATGGCTATTCTGAAGTGGAA TTGATATACCTGTTCTAAACCA	526-595 bp
β-globin	GH20 PC04	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 5'- CAACTTCATCCACG TTCACC	268 bp

PCR Master Mix, Roche

25 U Taq DNA polymerase

20 mM Tris-HCl

100 mM KCl

3 mM Mg Cl₂

0.01% (v/v) Brij 35

dNTP mix (0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dTTP)

4.3.4. Detekcija produkata

META

Metaphor Agarose, Cambrex BioScience Rockland Inc., SAD

1x TEA pufer

Tris-HCl	0.04 M
NaCl	0.02 M
EDTA	2 mM
Na-acetat	0.02M pH 8.3

Gel loading pufer

Bromfenol plavo	0.25%
Xilen cijanol	0.25%
Ficoll 400 u vodi	25%

Etidij bromid, Sigma

10 mg etidij-bromida na 1 mL destilirane vode. Dugo otapati na mješalici dok nije sav otopljen. Čuvati na tamnom.

DNA molekularni marker XIV, Roche

Digestijom dobiveni fragmenti DNA razlike 100 parova baza.

4.3.5. RFLP

Restriksijski enzimi, Invitrogen, life technologies:

Za cijepanje L1 (MY09 i MY11)

<i>BamH I</i>	2000 U
<i>Dde I</i>	500 U
<i>Hae III</i>	2500 U
<i>Hinf I</i>	1000 U
<i>Pst I</i>	3000 U
<i>Rsa I</i>	1000 U

Za cijepanje E1 (p1 i p2)

<i>BamH I</i>	2000 U
<i>Dde I</i>	500 U
<i>Hae II</i>	2500 U
<i>Hinf I</i>	1000 U
<i>Pst I</i>	3000 U
<i>Rsa I</i>	1000 U
<i>Alu I</i>	500 U
<i>Nsi I</i>	300 U
<i>Hpa II</i>	1000 U
<i>Bgl II</i>	2000 U
<i>Ecor I</i>	5000 U
<i>Kpn I</i>	2000 U

Mješavina za enzimsku razgradnju

7.5 µL sterilne deionizirane vode

1 µL restrikcijskog enzima (5-10 U)

1.5. µL enzimskog pufera

4.4. UREĐAJI

Digene system software

Luminometar DML 2000

Rotary shaker, Digene

Vaga Mettler Toledo PB 1502

Vortex Kartell

Automatske pipete Eppendorf Research

Centrifuga Beckman

Termoreaktor Perkin Elmer 9600

Oprema za elektroforezu Submarine Cosulich

Vodena kupelj TKS

Sterilni kabinet Hera safe

Spektrofotometar Metertech 960

4.5. STATISTIČKA I RAČUNALNA OBRADA

Statistička analiza podataka dobivenih ispitivanjem provedena je na računalu koristeći SPSS Version 10.0 za Windowse. Napravljena je deskriptivna analiza podataka te usporedba među grupama. Kontinuirane varijable su prikazane srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom, minimumom, maksimumom te rasponom. Kategorijske varijable su sumirane frekvencijama i postocima. Za usporedbu povezanosti varijabli od interesa koristili smo hi-kvadrat (χ^2) test (odnosno Fischerov egzaktni test kada nisu bili zadovoljeni uvjeti za korištenje chi kvadrata). Rezultati statističkih testova manji od 0.05 smatrani su statistički značajnima. Tablice i grafovi su pripremljeni u programu Microsoft Excel (verzija Microsoft Office XP Professional).

Statistička analiza je uključivala provedbu analize razlika u prevalenciji genotipova visokog rizika između žena s različitim citološkim nalazom, kao i skupine muškaraca bez klinički vidljivih promjena u smislu HPV genitalne infekcije, te za određivanje razlike u prevalenciji HPV 16. Također je statistički uspoređena osjetljivost pojedinih testova (HC 2, RFLP/MY09MY11, RFLP/p1p2).

REZULTATI

5.1. Ukupna skupina ispitanika

U istraživanje smo uključili 120 ispitanika koji su podijeljeni u 4 skupine:

1. Skupina od 25 žena s CIN 1
2. Skupina od 25 žena s CIN 2 i/ili 3
3. Skupina od 50 muškaraca kod kojih nema klinički vidljivih promjena u smislu HPV genitalne infekcije i koji su bili upućeni na testiranje jer njihova partnerica ima dokazanu infekciju s HPV visokog rizika
4. Kontrolnu skupinu čini 20 žena s urednim citološkim nalazom

5.2. Ispitanici i kontrolna skupina prema dobi

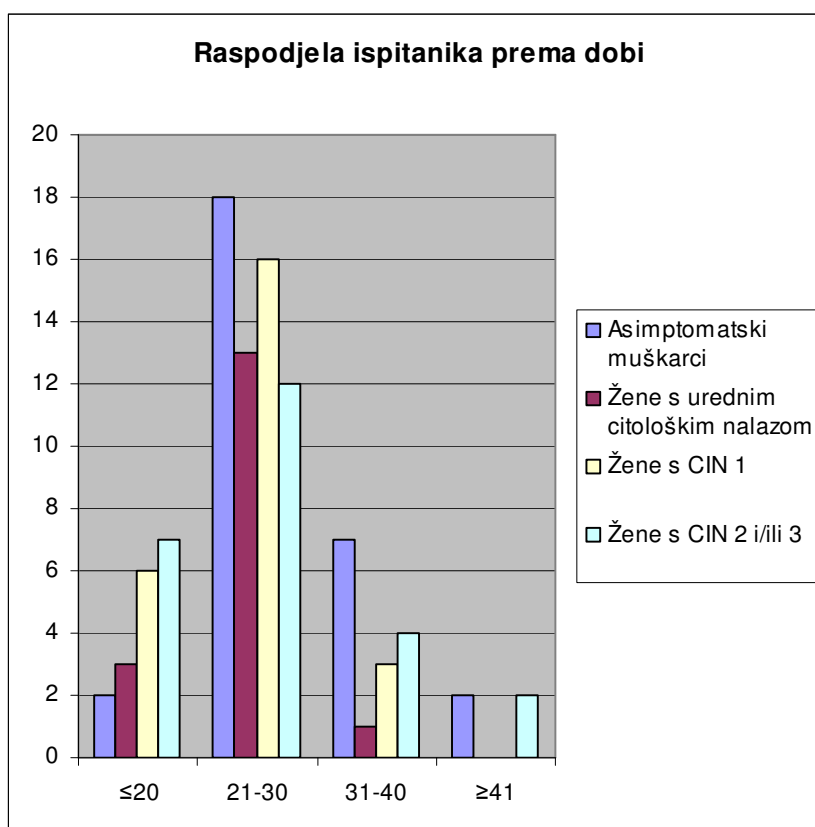
U odnosu na dob 18 muškaraca (62.1%) bilo je u dobnoj skupini između 20 i 30 godina starosti. U obje skupine žena, kao i u kontrolnoj skupini, također je najzastupljenija bila dobna skupina između 20 i 30 godina života (16 žena s CIN 1 (64%), 12 žena s CIN 2 i/ili 3 (48%) i 13 žena iz kontrolne skupine (76.5%). Po učestalosti, slijedeća dobna skupina muškaraca bila je ona između 30 i 40 godina starosti (24.1%), međutim, kod svih skupina žena slijedeća po učestalosti bila je dobna skupina koju čine žene mlađe od 20 godina (6 žena s CIN 1 (24%), 7 žena s CIN 2 i/ili 3 (28%) i 3 žene iz kontrolne skupine (17.6%). Svega 2 muškarca (6.9%) bila su mlađa od 20 godina i starija od 41 godine, dok su samo 2 žene s CIN 2 i/ili 3 (8%) bile starije od 41 godinu. Najmlađi muškarac uključen u ispitivanje imao je 19 godina, a najstariji 42 godine; najmlađa

ispitanica imala je 17 godina, a najstarija 48 godina. (tablica 4 i grafikon 1).

Prosječna starost ispitanika po grupama bila je slijedeća: asimptomatskih muškaraca 27.10 godina, žena s CIN 1 24.44 godine, žena s CIN 2 i/ili 3 25.92 godine, te kontrolne skupina žena 23.47 godina.

Tablica 4. Raspodjela ispitanika prema dobi

Dob	Muškarci		Žene s različitim citološkim nalazom					
	N	%	Uredan		CIN 1		CIN 2 i/ili 3	
			N	%	N	%	N	%
≤ 20	2	6.9	3	17.6	6	24	7	28
21 – 30	18	62.1	13	76.5	16	64	12	48
31 – 40	7	24.1	1	5.9	3	12	4	16
≥ 40	2	6.9	0	0	0	0	2	8
Ukupno	29	100.0	17	100.0	25	100.0	25	100.0

Grafikon 1. Raspodjela ispitanika prema dobi

5.3. Raspodjela genotipova kod muškaraca bez klinički vidljivih promjena u smislu HPV genitalne infekcije

U istraživanje smo uključili uzorke od 50 asimptomatskih muškaraca kod kojih smo PCR reakcijom uz korištenje začetnika MY09/MY11 i/ili p1/p2 dokazali prisutnost DNA HPV. Međutim, u 21 uzorku nismo uspjeli umnožiti dovoljnu količinu DNA HPV koja je potrebna za genotipizaciju metodom polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP). Paralelno smo uzorke testirali Digene Hybrid Capture 2 metodom (HC 2) koristeći obje probe (A i B), koje sadrže mješavinu začetnika za 5 genotipova niskog, odnosno 13 genotipova visokog rizika. U 5 od 50 uzoraka, koji su PCR metodom bili pozitivni, HC 2 metodom bili su negativni. To su bili uzorci u kojima količina DNA HPV nije bila dovoljna da se odredi genotip. U 29 uzoraka odredili smo 9 različitih genotipova. Najčešće zastupljeni bili su HPV 16 (31%) i HPV 6 (31%). Slijedeći po učestalosti bio je genotip 31 (10.3%). U dva uzorka (6.9%) nismo uspjeli odrediti genotip, a u jednom uzorku našli smo miješanu infekciju s HPV 66 i HPV kojem nismo uspjeli odrediti genotip te smo ga označili HPV X (3.4%).

U 24 od 29 genotipiziranih uzoraka HC 2 metodom dobili smo očekivani rezultat: kod genotipova visokog rizika bila je pozitivna proba B, kod niskog rizika proba A. U 4 uzorka su bile pozitivne obje probe: u 2 uzorka smo genotipizacijom dobili HPV 6, u trećem nismo uspjeli odrediti genotip, a u četvrtom smo našli HPV 66 u miješanoj infekciji s genotipom koji nismo uspjeli odrediti (HPV X). U 1 uzorku koji je davao pozitivan signal s probom za detekciju genotipova visokog rizika dobili smo HPV73. Genotipovi 66 i 73 nisu uključeni u HC 2 test.

Od 29 pozitivnih uzoraka u 16 (55.2%) smo dobili genotipove visokog rizika (16,

18, 31, 33, 58 i 73), u 10 (34.5%) genotipove niskog rizika (6 i 11), u jednom uzorku (3.4%) genotip vjerojatno visokog rizika (HPV 66), a u 2 uzorka (6.9%) nismo uspjeli odrediti genotip. Ukupno smo dobili 9 različitih genotipova.

Dobivene rezultate korelirali smo s citološkim nalazom partnerice. Raspored genotipova u asimptomatskih muškaraca u odnosu na citološki nalaz partnerice prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Raspodjela genotipova u muških ispitanika u odnosu na citološki nalaz partnerice

Genotip	Citološki nalaz partnerice		Ukupno	
	CIN 1	CIN 2 i/ili 3	N	%
6	5	4	9	31.1
11		1	1	3.4
16	4	5	9	31.1
18		1	1	3.4
31	1	2	3	10.4
33	1		1	3.4
58	1		1	3.4
73 (MM9)		1	1	3.4
66+X		1	1	3.4
X	1	1	2	7
Ukupno	13 44.8%	16 55.2%	29	100.0

Od 13 asimptomatskih muškaraca čije partnerice su uz infekciju HPV genotipovima visokog rizika imale citološku dijagnozu CIN 1, u 7 (53.8%) smo našli genotipove visokog rizika, a od 16 asimptomatskih muškaraca čije partnerice su imale citološku dijagnozu CIN 2 i/ili 3 genotipove visokog rizika smo našli u 9 (56.25%), odnosno u 10 (62.5%), ako ubrojimo i genotip vjerojatno visokog rizika (HPV 66).

5.4. Raspodjela genotipova u žena s različitim citološkim nalazom

U istraživanje smo uključili i uzorke od 70 žena s različitim citološkim nalazom kod kojih smo PCR reakcijom uz korištenje začetnika MY09/MY11 i/ili p1/p2 dokazali prisutnost DNA HPV. U 3 uzorka iz kontrolne skupine žena (s urednim citološkim nalazom) nismo uspjeli umnožiti dovoljnu količinu DNA HPV koja je potrebna za genotipizaciju metodom RFLP. Paralelno smo uzorke testirali Digene Hybrid Capture 2 metodom (HC 2) koristeći obje probe (A i B), za određivanje genotipova i niskog i visokog rizika. Samo jedan uzorak u kojima nismo uspjeli umnožiti dovoljnu količinu DNA HPV koja je potrebna za genotipizaciju bio je HC 2 metodom negativan. Ukupno smo genotipizirali 67 uzoraka i dobili smo 17 različitih genotipova. Najčešće zastupljeni bili su HPV 16 (39.6%) i HPV 31 (10.4%). Slijedeći po učestalosti bio je HPV 6 (7.5%). U dva uzorka (3.0%) nismo uspjeli odrediti genotip (označeni su kao genotipovi X), a u četiri uzorka našli smo miješanu infekciju (6.0%). Raspodjela genotipova u žena s različitim citološkim nalazom prikazana je u tablici 6.

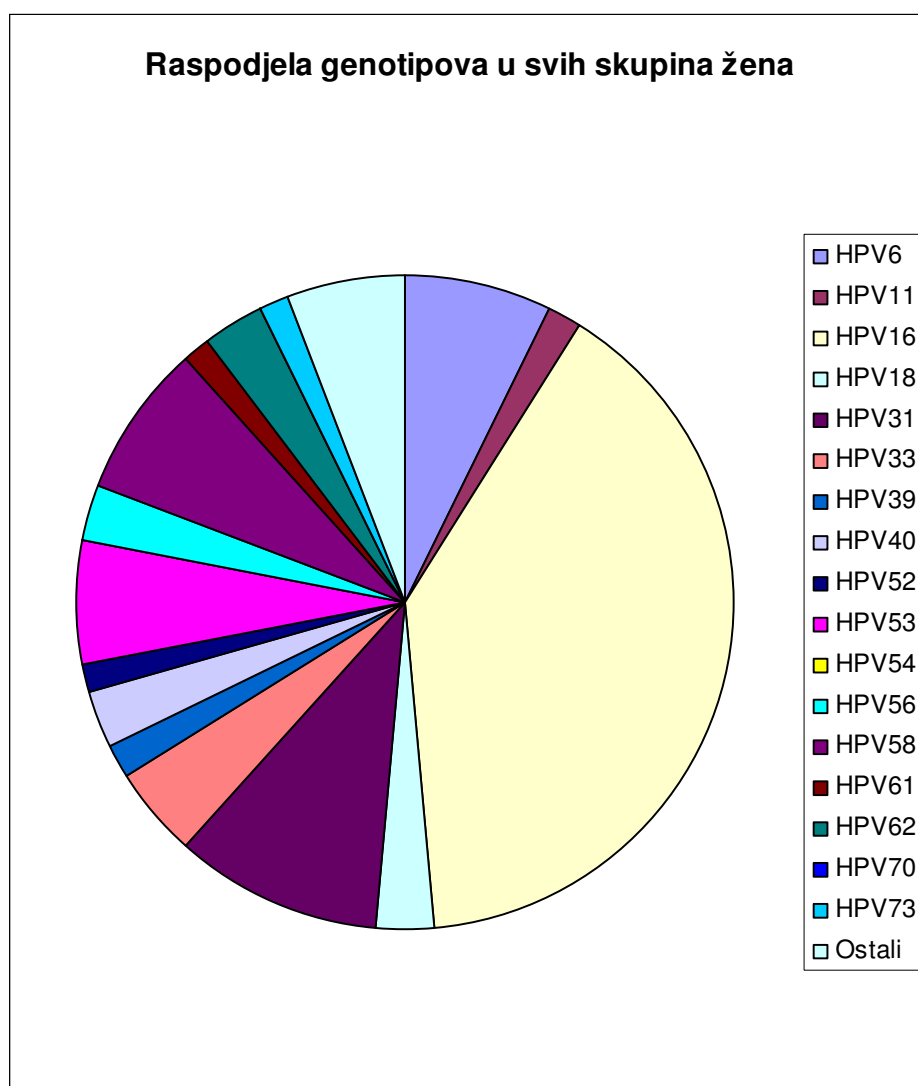
Tablica 6. Raspodjela genotipova u žena s različitim citološkim nalazom

Genotip	Žene s različitim citološkim nalazom			Ukupno	
	uredan	CIN 1	CIN 2 i/ili 3	N	%
6	4	1		5	7.5
11	1			1	1.5
16	4	7 p=1.0000	15 p=0.0198	26	38.8
18		1	1	2	3.0
31	2	2	3	7	10.4
33	1		1	2	3.0
39			1	1	1.5
40	1	1		2	3.0
52			1	1	1.5
53	1	2	1	4	5.9
56		2		2	3.0
58	1	3		4	5.9
61	1			1	1.5
62		2		2	3.0
73			1	1	1.5
X	1	1		2	3.0
16 + 70		1		1	1.5
33 + X			1	1	1.5
54 + X		1		1	1.5
58 + X		1		1	1.5
Ukupno	17	25	25	67	100.0
Broj različitih genotipova	9	11	8	17	

Od 17 različitih genotipova, 10 genotipova je uključeno u HC 2 test; dva genotipa uključena su u probu za detekciju genotipova niskog rizika: HPV 6 i HPV 11, a osam u probu za detekciju genotipova visokog rizika: 16, 18, 31, 33, 39, 52, 56 i 58. U dvanaest uzoraka dobili smo sedam genotipova koji nisu uključeni u HC 2 test. To su HPV 40, HPV 53, HPV 54, HPV 61, HPV 62, HPV 70 i HPV 73. U šest uzoraka ove genotipove dobili smo iz probe za detekciju genotipova visokog rizika. HPV 62 (2 uzorka) i HPV 61 dobili smo iz probe za detekciju genotipova niskog rizika, a u 2 uzorka iz kojih smo genotipizacijom dobili HPV 40, i jednog uzorka u kojem smo genotipizacijom dobili HPV 53, bile su pozitivne obje probe. Obje probe bile su pozitivne u još dva uzorka: u jednom je genotip 33, a u drugom genotip 58 bio miješan s nepoznatim genotipom. Broj različitih genotipova podjednak je u svim skupinama žena (9 u žena s urednim citološkim nalazom, 11 u žena s CIN 1 i 8 u žena s CIN 2 i/ili 3).

U grafikonu 2 prikazana je učestalost pojedinih genotipova u svim skupinama žena.

Grafikon 2. Raspodjela genotipova u svih skupina žena



5.5. Raspodjela genotipova u asimptomatskih muškaraca i žena s različitim citološkim nalazom

Najčešći genotip u svim skupinama je HPV 16; učestalost mu raste s rastućim stupnjem citoloških promjena; nađen je u 23.5% žena s urednim citološkim nalazom, u 28% u žena s CIN 2, odnosno u 60% u žena s CIN 2 i/ili 3. To je ujedno najčešći genotip koji smo našli kod asimptomatskih muškaraca (31.1%). Od genotipova visokog rizika sličnu učestalost u svim skupinama ima HPV 31: Nađen je u 10.4% asimptomatskih muškaraca, 11.7% žena s urednim citološkim nalazom, 8% kod žena s CIN 1 i u 12% žena s CIN 2 i/ili 3. Od genotipova visokog rizika relativno često se javlja HPV 58 koji ne nalazimo jedino u žena s najvećim stupnjem citoloških promjena. Također relativno često nalazimo HPV 53, koji ne nalazimo u skupini asimptomatskih muškaraca. HPV 33 ne nalazimo jedino u skupini žena s CIN 1.

Najčešći genotip niskog rizika je HPV 6 koji ima visoku učestalost u skupini asimptomatskih muškaraca (31.1%) i u skupini žena s urednim citološkim nalazom (23.5%). U žena s CIN 1 nalazimo ga u 4%, dok ga prema očekivanjima ne nalazimo u skupini žena s CIN 2 i/ili 3. HPV 11 nalazimo samo u skupini asimptomatskih muškaraca i žena s urednim citološkim nalazom.

U tablici 7 prikazana je raspodjela svih genotipova koje smo dobili u asimptomatskih muškaraca i žena s različitim citološkim nalazom.

Tablica 7. Raspodjela genotipova u asimptomatskih muškaraca i žena s različitim citološkim nalazom.

Genotip	Asimptomatski muškarci		Žene s različitim citološkim nalazom				Ukupno			
			Uredan		CIN 1				CIN 2 i/ili 3	
	N	%	N	%	N	%	N	%		
6	9	31.1	4	23.5	1	4.0		14	14.6	
11	1	3.4	1	5.9				2	2.1	
16	9	31.1	4	23.5	7	28.0	15	60.0	35	36.5
	p=0.7390				p=1.0000		p=0.0198			
18	1	3.4			1	4.0	1	4.0	3	3.2
31	3	10.4	2	11.7	2	8.0	3	12.0	10	10.4
33	1	3.4	1	5.9			1	4.0	3	3.2
39							1	4.0	1	1.1
40			1	5.9	1	4.0			2	2.1
52							1	4.0	1	1.1
53			1	5.9	2	8.0	1	4.0	4	4.3
56					2	8.0			2	2.1
58	1	3.4	1	5.9	3	12.0			5	5.3
61			1	5.9					1	1.1
62					2	8.0			2	2.1
73	1	3.4					1	4.0	2	2.1
X	2	7.0	1	5.9	1	4.0			4	4.3
16 + 70					1	4.0			1	1.1
33 + X							1	4.0	1	1.1
54 + X					1	4.0			1	1.1
58 + X					1	4.0			1	1.1
66 + X	1	3.4							1	1.1
Ukupno	29	100.0	17	100.0	25	100.0	25	100.0	96	100.0
HPV koji nisu u HCII	66,73		40,53,61		40,2x53,2x62,54,70		53,73		14	

Ukupno smo u 96 uzoraka RFLP metodom odredili genotipove i dobili smo 18 različitih genotipova. Od toga je 10 genotipova uključeno u HC 2 test; dva genotipa uključena su u probu A (genotipovi niskog rizika): HPV 6 i HPV 11, a osam u probu B (genotipovi visokog rizika): 16, 18, 31, 33, 39, 52, 56 i 58. Osam genotipova koje smo dobili u uzorcima žena s različitim nalazom i u asimptomatskih muškaraca nisu uključeni u HC 2. To su HPV 40, HPV 53, HPV 54, HPV 61, HPV 62, HPV 66, HPV 70 i HPV 73.

Od genotipova koji nisu uključeni u HC 2, dva smo našli kod asimptomatskih muškaraca (HPV 66 i HPV 73), 3 kod žena s urednim citološkim nalazom (HPV 40, HPV 53 i HPV 6), 7 kod žena s CIN 1 (HPV 40, 2 x HPV 53, HPV 54, 2 x HPV 62 i HPV 70) i dva kod žena s CIN 2 i/ili 3 (HPV 53 i HPV 73).

Ovi podaci prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Raspodjela genotipova prema uvrštenosti u HC 2 i onkogenom potencijalu

	Genotipovi	Ukupno
HC II proba B (visoki rizik)	16,18,31,33,39,52,56,58	8
HC II proba A (niski rizik)	6,11	2
Visoki rizik *	73	1
Niski rizik *	40,54,61,62,70	5
Vjerojatno visoki rizik *	53,66	2
Ukupno	18	18

* genotipovi koji nisu uključeni u HC 2

Učestalost genotipova visokog rizika u žena proporcionalna je citološkom nalazu na vratu maternice; u žena s urednim citološkim nalazom nalazimo ih u 47%, u žena s CIN 1 u 64%, dok ga u žena s CIN 2 i/ili 3 nalazimo u 94%. U asimptomatskih muškaraca nalazimo ga češće nego u žena s urednim citološkim nalazom (55.2%). Ovi podaci prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Raspored genotipova prema onkogenom potencijalu

Onkogeni potencijal	Asimptomatski		Žene s različitim citološkim nalazom					
	Muškarci		Uredan		CIN 1		CIN 2 i/ili 3	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Visoki rizik + vjerojatno VR	17	58.6	9	52.9	18	72.0	25	100.0
	p=0.7076				p=0.2058		p=2.060E-04	
Niski rizik	10	34.5	7	41.2	5	20.0		
Ostali genotip.	2	6.9	1	5.9	2	8.0		
Ukupno	29	100.0	17	100.0	25	100.0	25	100.0

5.6. Raspodjela genotipova prema dobi u asimptomatskih muškaraca i žena s različitim citološkim nalazom

S obzirom da je u svim skupinama ispitanika, kao i u kontrolnoj skupini, bila najzastupljenija dobna skupina između 20 i 30 godina starosti, učestalost svih genotipova je u toj dobnoj skupini je najveća (tablica 10).

Tablica 10. Raspodjela genotipova prema dobnim skupinama

Genotip	Dobne skupine				
	≤20	21-30	31-40	≥41	Ukupno
HPV6	2	8	4		14
HPV11		1	1		2
HPV16	5	25	3	2	35
HPV18	1	1	1		3
HPV31	2	6	2		10
HPV33	2	1			3
HPV39				1	1
HPV40	1		1		2
HPV52	1				1
HPV53	1	3			4
HPV56	2				2
HPV58		5			5
HPV 61		1			1
HPV73		1	1		2
HPV62	1		1		2
16+70		1			1
58+X		1			1
54+X		1			1
66+x		1			1
33+x			1		1
Ostali	1	1	1	1	4
Ukupno	19	57	16	4	96

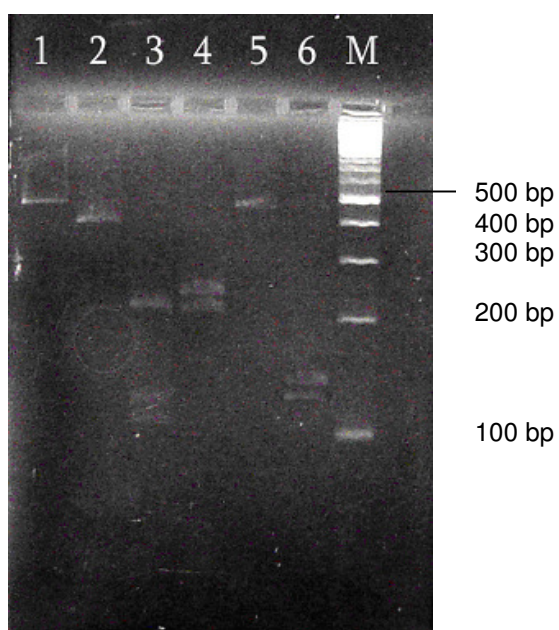
Tablica 11. Dobne skupine u odnosu na onkogeni potencijal HPV

Genotip	Dobne skupine							
	≤20		21-30		31-40		≥41	Ukupno
	N	%	N	%	N	%	N	%
Visoki rizik	13	68.3	41	71.9	8	50.0	3	67.7
Niski rizik	4	21.1	11	19.3	7	43.8		22
Vjeroj. Visoki rizik	1	5.3	4	7.0				5
Ostali	1	5.3	1	1.8	1	6.2	1	4
Ukupno	19	100.0	57	100.0	16	100.0	4	96

Na slikama 14-30 prikazani su svi genotipovi HPV koje smo odredili RFLP metodom nakon umnožavanja dijela genoma L1 parom začetnika MY09/MY11.

Slika 14. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

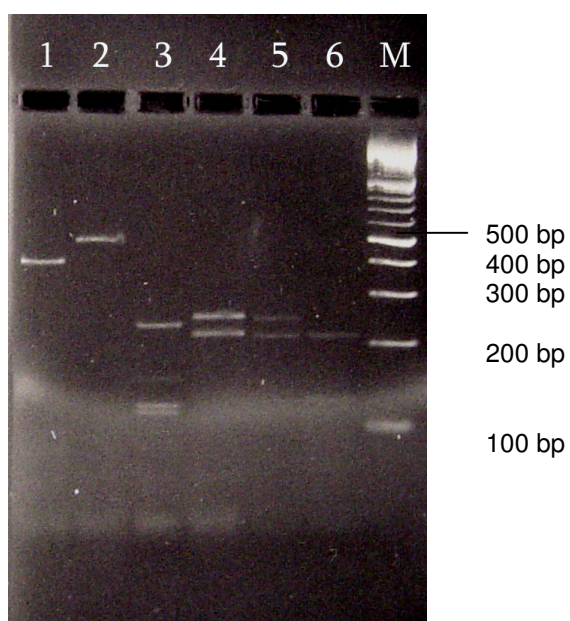
HPV 6



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 449 bp), *Dd eI* (kolona 2: 382 bp, 67 bp), *Hae III* (kolona 3: 217 bp, 124 bp, 108 bp), *Hinf I* (kolona 4: 234 bp, 215 bp), *Pst I* (kolona 5: 449 bp), *Rsa I* (kolona 6: 161 bp, 149 bp, 72 bp, 67 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 15. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

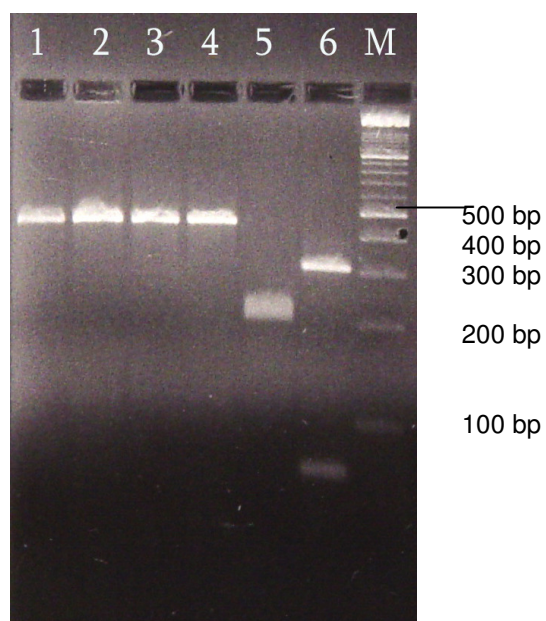
HPV 11



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 336 bp, 83 bp), *Dde I* (kolona 2: 447 bp, 2 bp), *Hae III* (kolona 3: 217 bp, 124 bp, 108 bp), *Hinf I* (kolona 4: 234 bp, 215 bp), *Pst I* (kolona 5: 242 bp, 207 bp), *Rsa I* (kolona 6: 216 bp, 135 bp, 72 bp, 26 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 16. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

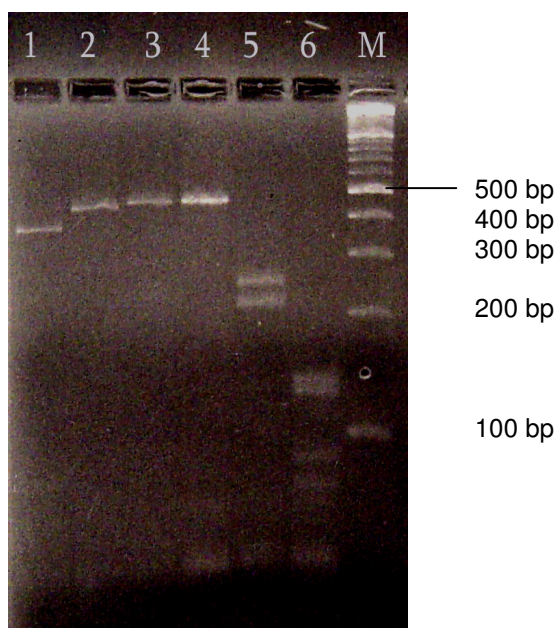
HPV 16



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 452 bp), *Dde I* (kolona 2: 442 bp), *Hae III* (kolona 3: 452 bp), *Hinf I* (kolona 4: 452 bp), *Pst I* (kolona 5: 216 bp, 210 bp, 26 bp), *Rsa I* (kolona 6: 310 bp, 72 bp, 70 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 17. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

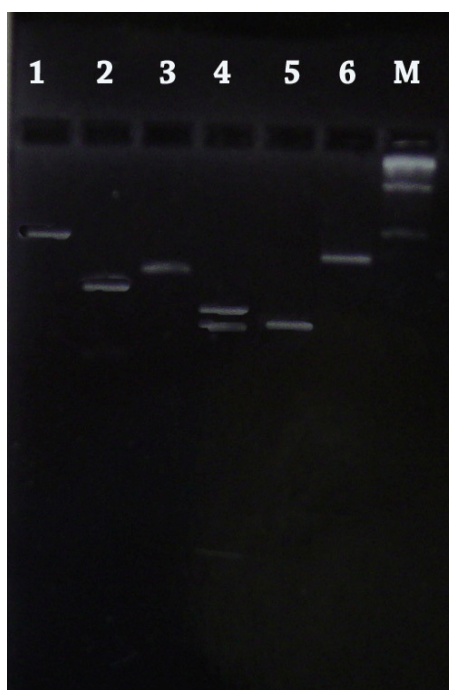
HPV 18



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 372 bp, 83 bp), *Dde I* (kolona 2: 432 bp, 23 bp), *Hae III* (kolona 3: 455 bp), *Hinf I* (kolona 4: 455 bp), *Pst I* (kolona 5: 242 bp, 213 bp), *Rsa I* (kolona 6: 135 bp, 125 bp, 85 bp, 72 bp, 38 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 18. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

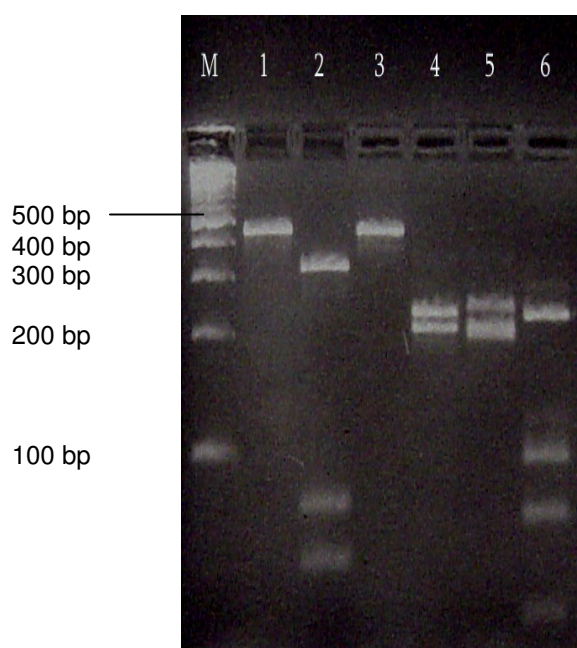
HPV 31



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 452 bp), *Dde I* (kolona 2: 283 bp, 167 bp, 2 bp), *Hae III* (kolona 3: 328 bp, 124 bp), *Hinf I* (kolona 4: 237 bp, 215 bp), *Pst I* (kolona 5: 216 bp, 210 bp, 26 bp), *Rsa I* (kolona 6: 380 bp, 72 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 19. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

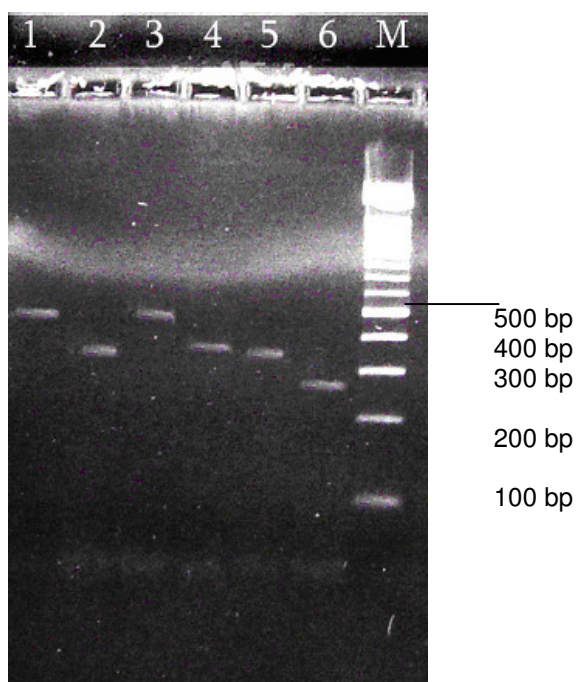
HPV 33



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 449 bp), *Dde I* (kolona 2: 320 bp, 77 bp, 52 bp), *Hae III* (kolona 3: 449 bp), *Hinf I* (kolona 4: 234 bp, 215 bp), *Pst I* (kolona 5: 242 bp, 207 bp), *Rsa I* (kolona 6: 236 bp, 102 bp, 72 bp, 39 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 20. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

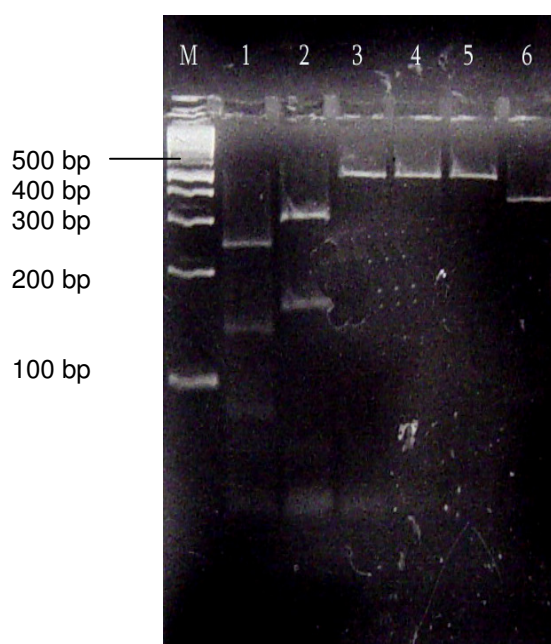
HPV 39



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 455 bp), *Dde I* (kolona 2: 324 bp, 131 bp), *Hae III* (kolona 3: 455 bp), *Hinf I* (kolona 4: 355 bp, 100 bp), *Pst I* (kolona 5: 330 bp, 125 bp), *Rsa I* (kolona 6: 260 bp, 123 bp, 72 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 21. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

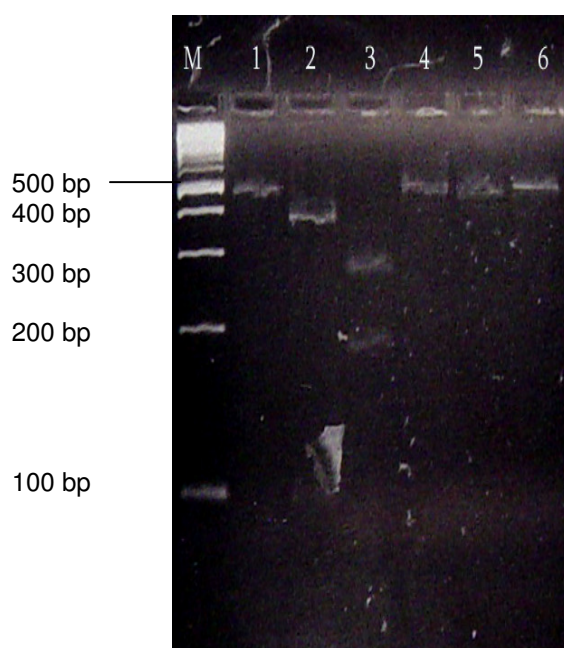
HPV 40



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 240 bp, 132 bp, 83 bp), *Dde I* (kolona 2: 297 bp, 158 bp), *Hae III* (kolona 3: 447 bp, 8 bp), *Hinf I* (kolona 4: 455 bp), *Pst I* (kolona 5: 455 bp), *Rsa I* (kolona 6: 365 bp, 90 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 22. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

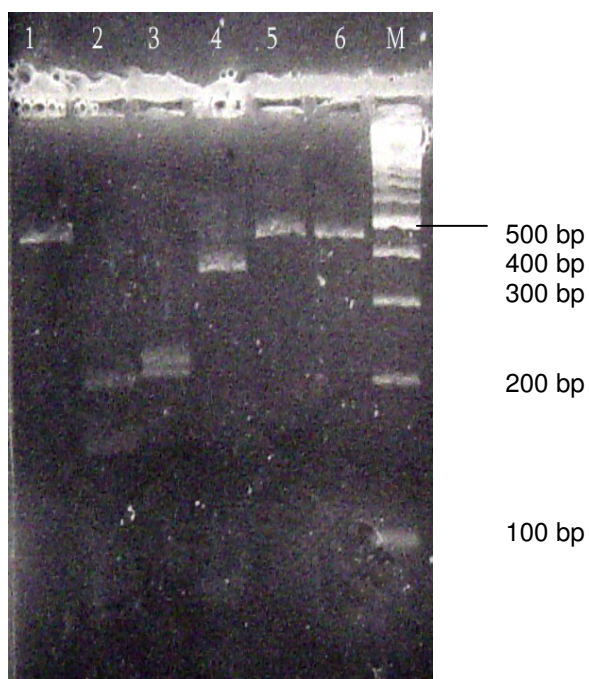
HPV 52



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 449 bp), *Dde I* (kolona 2: 357 bp, 92 bp), *Hae III* (kolona 3: 258 bp, 183 bp, 8 bp), *Hinf I* (kolona 4: 449 bp), *Pst I* (kolona 5: 423 bp, 26 bp), *Rsa I* (kolona 6: 449 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 23. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

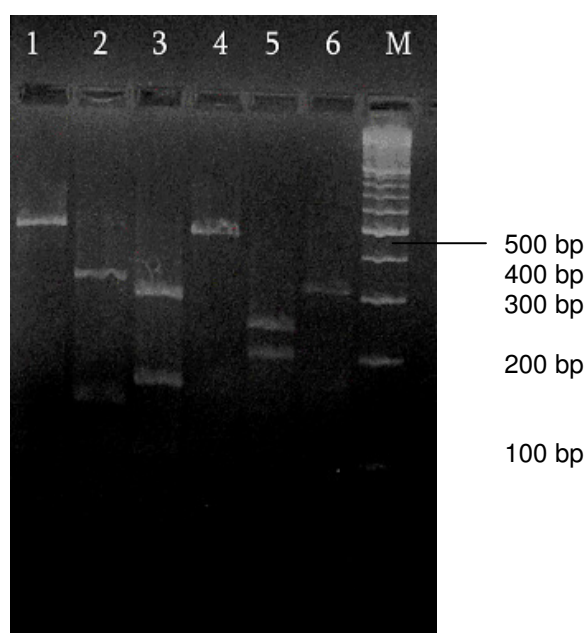
HPV 53



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *Bam*H I (kolona 1: 449 bp), *Dde* I (kolona 2: 206 bp, 158 bp, 85 bp), *Hae* III (kolona 3: 232 bp, 217 bp), *Hinf* I (kolona 4: 368 bp, 81 bp), *Pst* I (kolona 5: 449 bp), *Rsa* I (kolona 6: 449 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 24. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

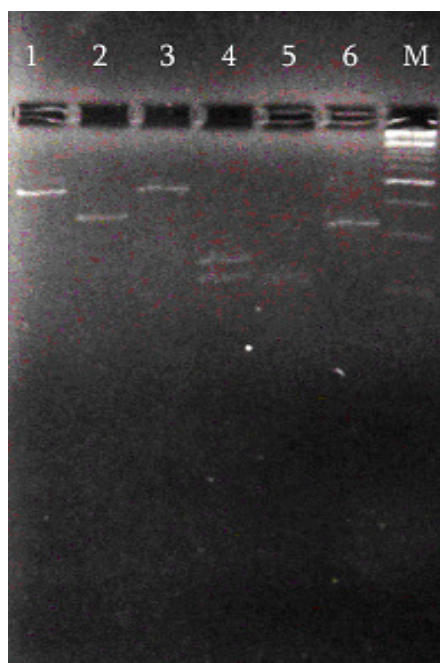
HPV 56



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *Bam*H I (kolona 1: 449 bp), *Dde* I (kolona 2: 307 bp, 142 bp), *Hae* III (kolona 3: 275 bp, 166 bp, 8 bp), *Hinf* I (kolona 4: 449 bp), *Pst* I (kolona 5: 242 bp, 207 bp), *Rsa* I (kolona 6: 310 bp, 72 bp, 49 bp, 18 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 25. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

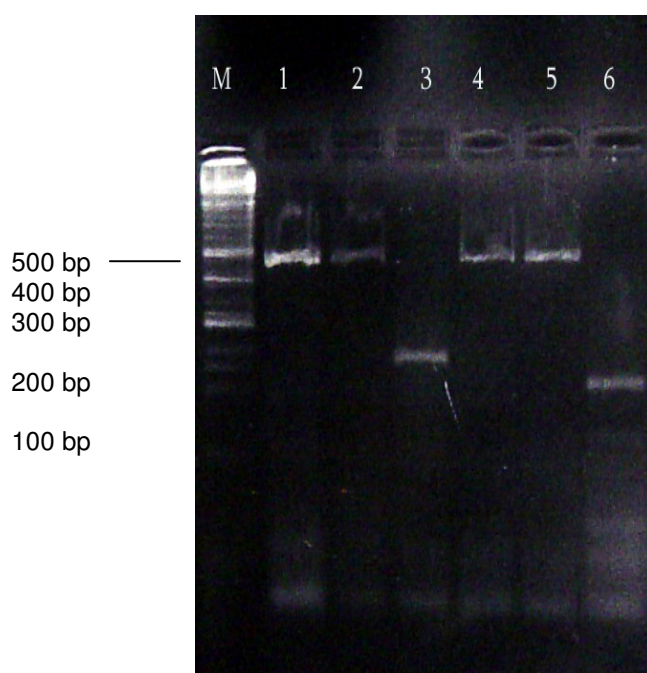
HPV 58



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 449 bp), *Dde I* (kolona 2: 348 bp, 101 bp), *Hae III* (kolona 3: 449 bp), *Hinf I* (kolona 4: 235 bp, 214 bp), *Pst I* (kolona 5: 216 bp, 207 bp, 26 bp), *Rsa I* (kolona 6: 306 bp, 111 bp, 32 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 26. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

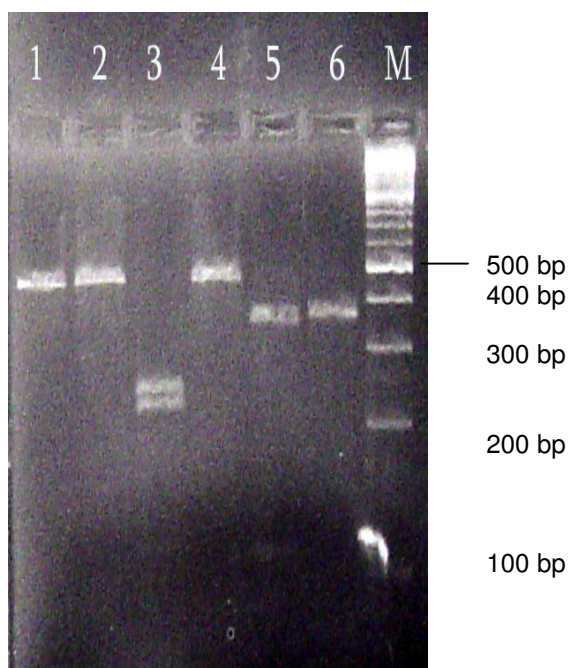
HPV 61



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 455 bp), *Dde I* (kolona 2: 455 bp), *Hae III* (kolona 3: 212 bp, 211 bp, 24 bp, 8 bp), *Hinf I* (kolona 4: 455 bp), *Pst I* (kolona 5: 455 bp), *Rsa I* (kolona 6: 185 bp, 180 bp, 72 bp, 18 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 27. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

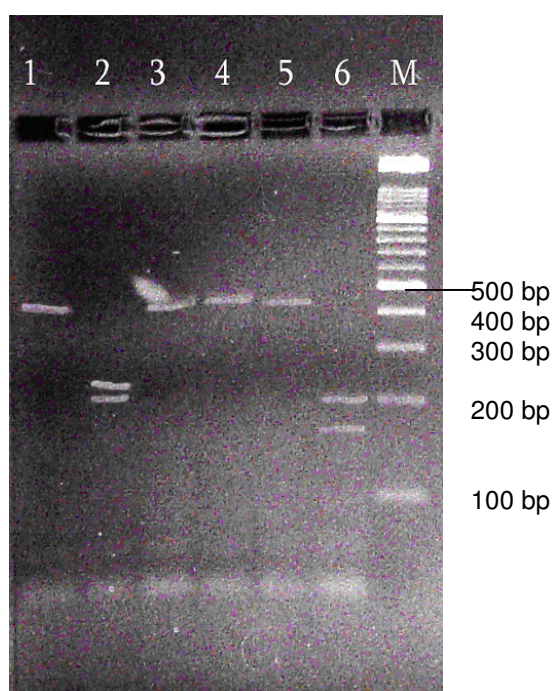
HPV 62



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 449 bp), *Dde I* (kolona 2: 449 bp), *Hae III* (kolona 3: 232 bp, 217 bp), *Hinf I* (kolona 4: 449 bp), *Pst I* (kolona 5: 341 bp, 108 bp), *Rsa I* (kolona 6: 359 bp, 72 bp, 18 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 28. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

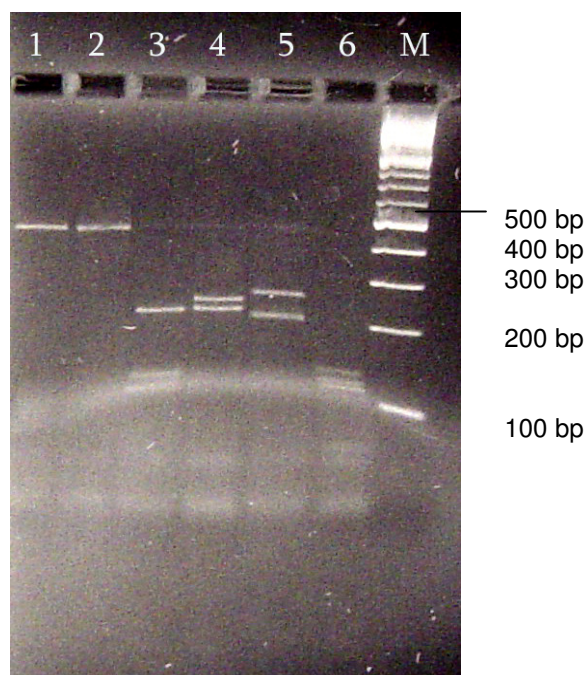
HPV 73



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: 458 bp), *Dde I* (kolona 2: 243 bp, 215 bp), *Hae III* (kolona 3: 458 bp), *Hinf I* (kolona 4: 458 bp), *Pst I* (kolona 5: 432 bp, 26 bp), *Rsa I* (kolona 6: 201 bp, 161 bp, 96 bp). M – standardna DNA, 100 bp

Slika 29. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

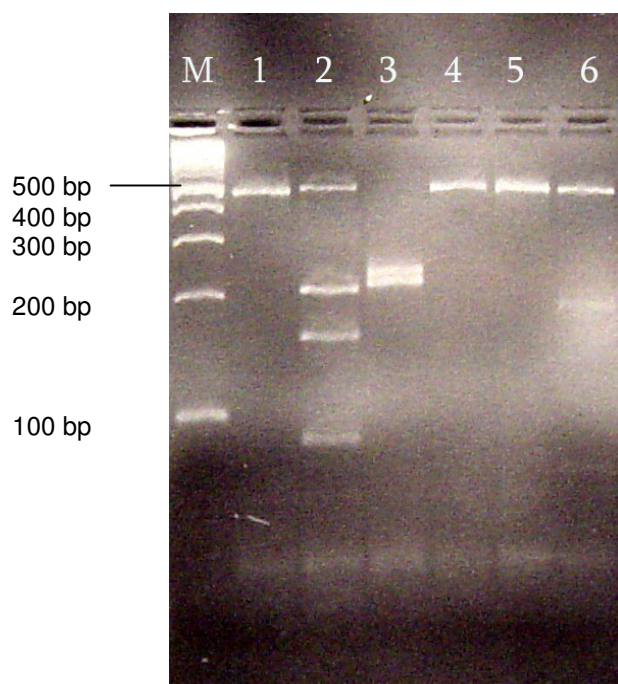
HPV X



Raspored fragmenata na osnovu kojeg nismo uspjeli odrediti genotip

Slika 30. RFLP tipizacija PCR produkta umnoženog s parom začetnika MY09/MY11

Primjer miješane infekcije : HPV 61 + HPV X

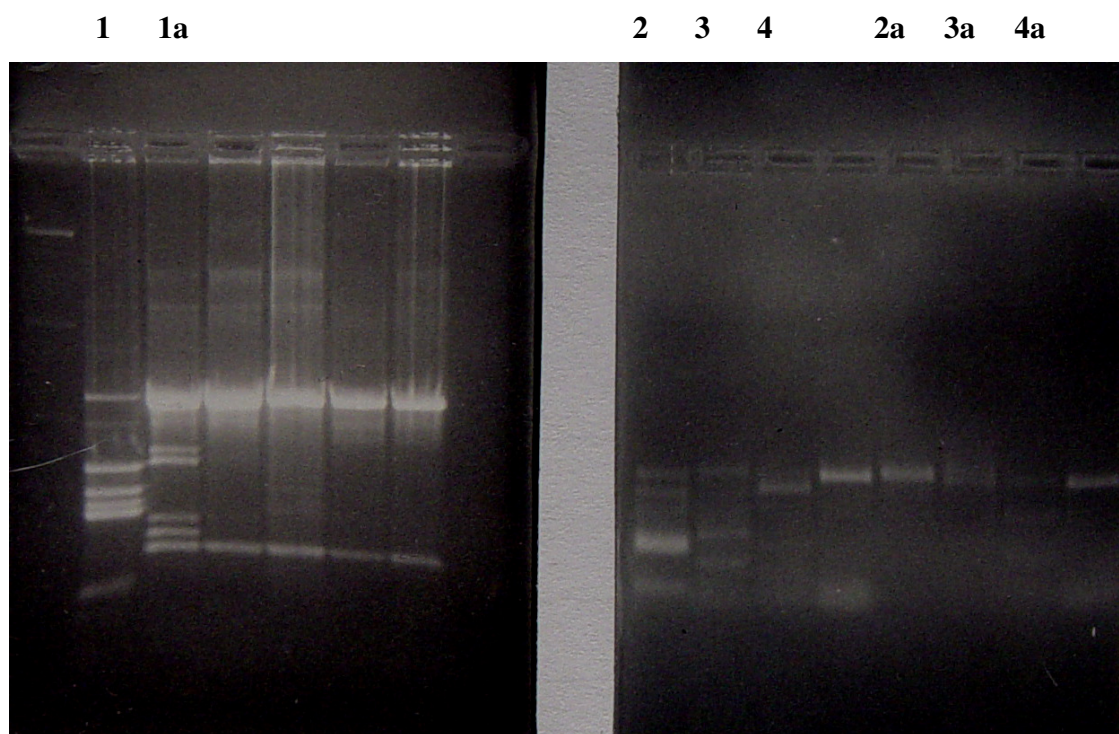


Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta. HPV 61: *BamH I* (kolona 1: 455 bp), *Dde I* (kolona 2: 455 bp), *Hae III* (kolona 3: 212 bp, 211 bp, 24 bp, 8 bp), *Hinf I* (kolona 4: 455 bp), *Pst I* (kolona 5: 455 bp), *Rsa I* (kolona 6: 185 bp, 180 bp, 72 bp, 18 bp). HPV X: raspored fragmenata na osnovu kojeg nismo uspjeli odrediti genotip: *BamH I* (kolona 1: 455 bp), *Dde I* (kolona 2: oko 200 bp, 170 bp, 70 bp), *Hae III* (kolona 3: 212 bp, 211 bp), *Hinf I* (kolona 4: 455 bp), *Pst I* (kolona 5: 455 bp), *Rsa I* (kolona 6: oko 452 bp). M – standardna DNA, 100 bp

5.7. RFLP metoda na dijelu genoma E1 umnoženog parom začetnika p1/p2

Parom začetnika p1/p2 umnožili smo dio genoma E1 veličine 526-595 bp. Ovaj PCR produkt cijepali smo restriksijskim enzimima *Alu I* i *Nsi I*. *Alu I* je cijepao ovaj fragment kod genotipova visokog rizika, a kod genotipova niskog rizika je ostao nepocijepan, i obrnuto: *Nsi I* je cijepao genotipove niskog rizika, a genotipovi visokog rizika ostali su nepocijepani. Međutim, prema rasporedu fragmenata koje smo dobili elektroforezom, niti kod jednog genotipa nismo mogli zaključiti o kojem se genotipu radi.(slika 31).

Slika 31. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

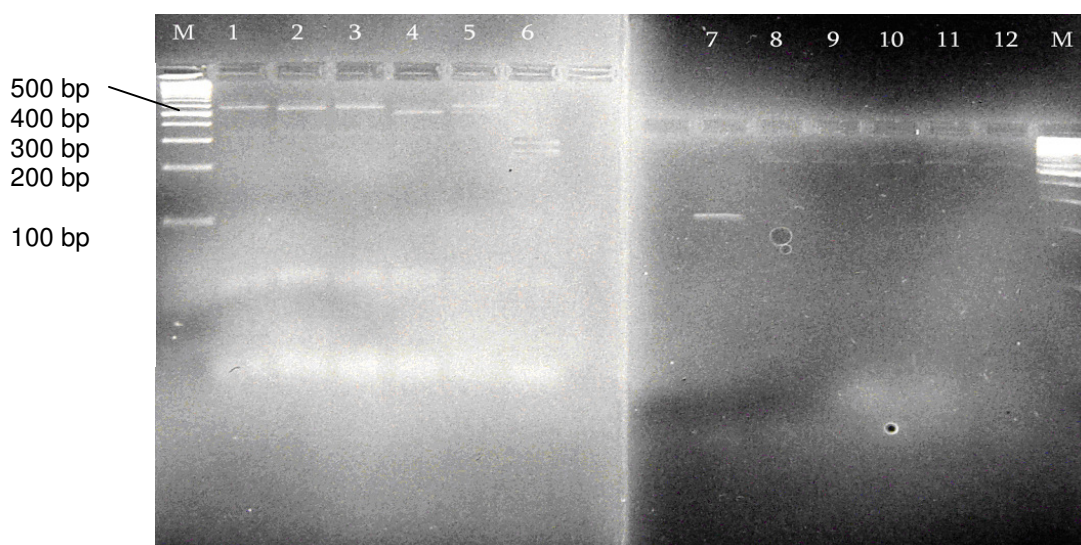


Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *Alu I* i *Nsi I*. Miješana infekcija HPV 6 + HPV 33 (kolona 1 *Alu I*: cijepa; kolona 1a *Nsi I*: cijepa), HPV 58 + HPV X (kolona 2 *Alu I*: cijepa; kolona 2a *Nsi I*: ne cijepa), HPV 31 (kolona 3 *Alu I*: cijepa; kolona 3a *Nsi I*: ne cijepa), HPV 6 (kolona 4 *Alu I*: ne cijepa; kolona 4a *Nsi I*: cijepa)

Isti amplifikat (dio genoma E1 umnožen parom začetnika p1/p2) cijepali smo s 12 restrikcijskih enzima: *BamH I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I*, *Rsa I*, *Alu I*, *Nsi I*, *Bgl I*, *Hpa I*, *EcoR I* i *Kpn I*. Dobili smo vrlo sličan raspored fragmenata kod većine genotipova (slike 32 i 33).

Slika 32. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

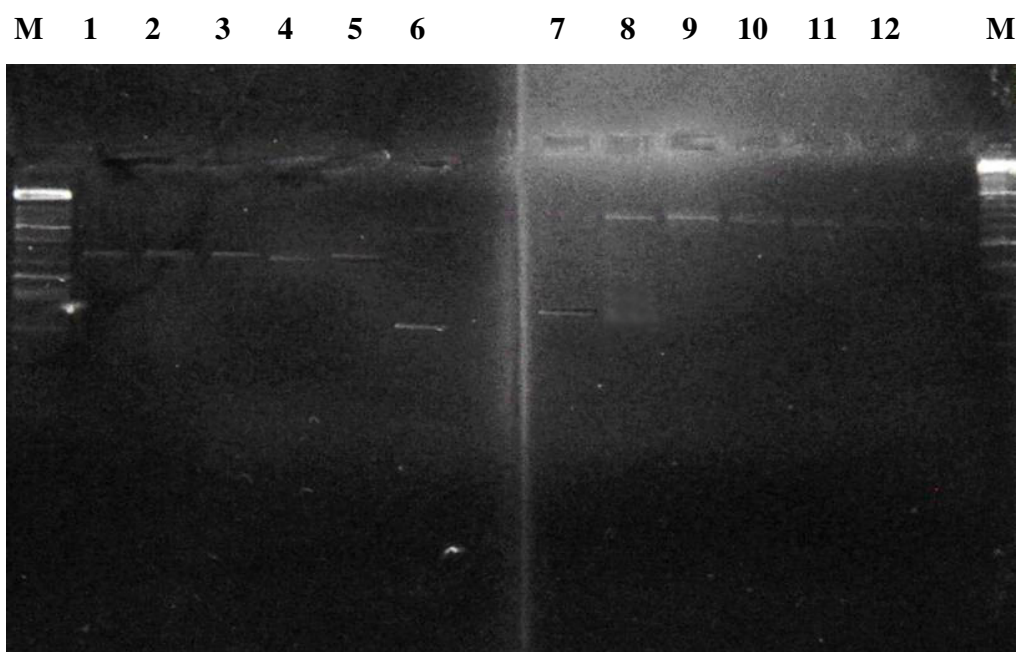
HPV 58



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: ne cijepa), *Dde I* (kolona 2: ne cijepa), *Hae III* (kolona 3: ne cijepa), *Hinf I* (kolona 4: ne cijepa), *Pst I* (kolona 5: ne cijepa), *Rsa I* (kolona 6: **cijepa**), *Alu I* (kolona 7: **cijepa**), *Nsi I* (kolona 8: ne cijepa), *Bgl I* (kolona 9: ne cijepa), *Hpa II* (kolona 10: ne cijepa), *EcoR I* (kolona 11: ne cijepa), *Kp I* (kolona 12: ne cijepa)

Slika 33. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

HPV 52



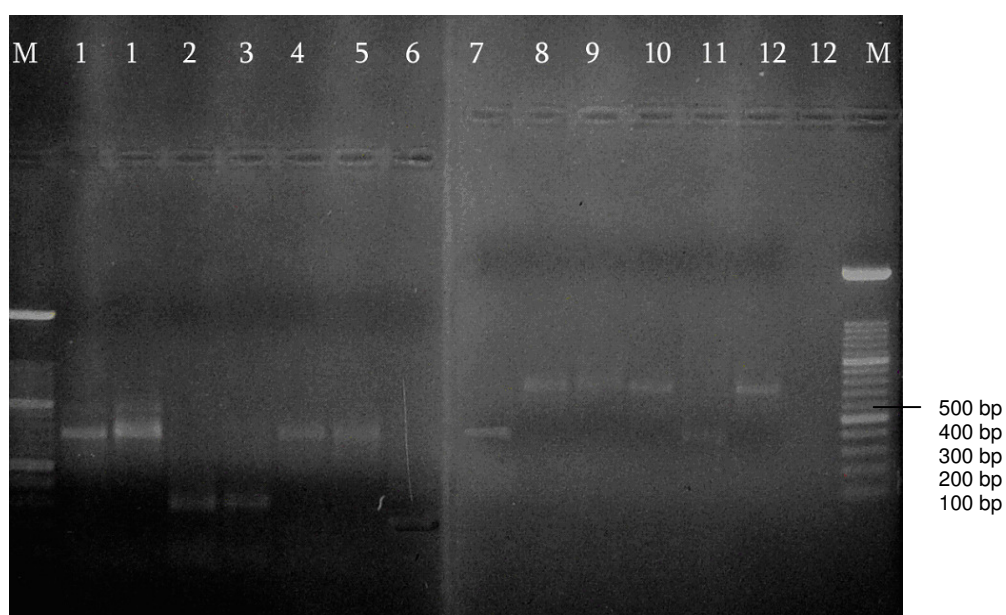
Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *Bam*HI (olona 1: ne cijepa), *Dde*I (kolona 2: ne cijepa), *Hae*III (kolona 3: ne cijepa), *Hinf*I (kolona 4: ne cijepa), *Pst*I (kolona 5: ne cijepa), *Rsa*I (kolona 6: **cijepa**), *Alu*I (kolona 7: **cijepa**), *Nsi*I (kolona 8: ne cijepa), *Bgl*I (kolona 9: ne cijepa), *Hpa*II (kolona 10: ne cijepa), *Eco*R I (kolona 11: ne cijepa), *Kpn*I (kolona 12: ne cijepa)

Usporedbom genotipova koje smo odredili standardnom metodom (RFLP metoda na dijelu genoma L1 umnoženog parom začetnika MY09/MY11) i tih istih genotipova dobivenih novom RFLP metodom, dobili smo novom metodom 2 različita rasporeda fragmenata samo za HPV 16 i HPV 6. Ukupno smo u svim skupinama HPV 16 dobili u 35 uzoraka. Nova metoda nam je uspjela u 29 uzoraka. Od toga smo varijantu 1 (slika 34) dobili u 19 uzoraka 16, a varijantu 2 (slika 35) u 10. Raspored tih varijanti u odnosu na pojedine skupine bio je slijedeći: varijantu 1 HPV 16 dobili smo kod 4 asimptomatska muškarca, 3 žene s urednim citološkim nalazom, 4 žene s CIN 1 i 8 žena s CIN 2 i/ili 3. Varijantu 2 smo dobili smo kod 3 asimptomatska muškarca, 1 žene s urednim citološkim nalazom, 1 žene s CIN 1 i 5 žena s CIN 2 i/ili 3.

Također smo dobili 2 varijante HPV 6. Od ukupno 9 uzoraka u kojima smo našli HPV 6, nova metoda je uspjela u 7 uzoraka. Varijantu 1 (slika 36) dobili smo kod 3 asimptomatska muškarca i 1 žene s urednim citološkim nalazom, a varijantu 2 (slika 37) kod 1 asimptomatskog muškarca i 2 žene s urednim citološkim nalazom. Ovi podaci prikazani su u tablici 12.

Slika 34. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

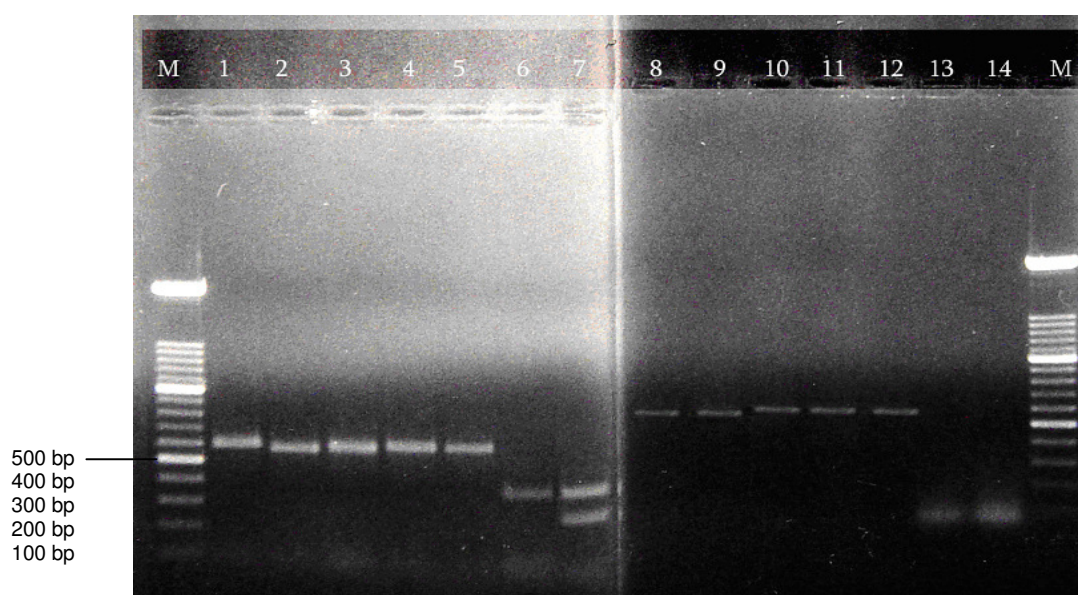
HPV 16 (varijanta 1)



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: ne cijepa), *Dde I* (kolona 2: **cijepa**), *Hae III* (kolona 3: **cijepa**), *Hinf I* (kolona 4: ne cijepa), *Pst I* (kolona 5: ne cijepa), *Rsa I* (kolona 6: **cijepa**), *Alu I* (kolona 7: **cijepa**), *Nsi I* (kolona 8: ne cijepa), *Bgl I* (kolona 9: ne cijepa), *Hpa II* (kolona 10: ne cijepa), *EcoR I* (kolona 11: **cijepa**), *Kpn I* (kolona 12: ne cijepa)

Slika 35. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

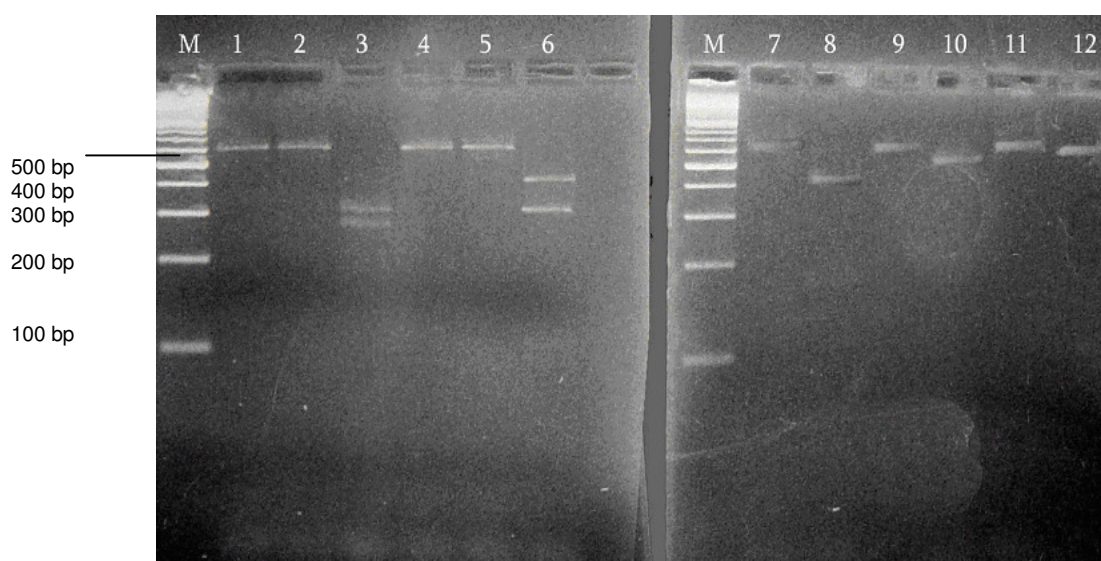
HPV 16 (varijanta 2)



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: ne cijepa), *Dde I* (kolona 2: ne cijepa), *Hae III* (kolona 3: ne cijepa), *Hinf I* (kolona 4: ne cijepa), *Pst I* (kolona 5: ne cijepa), *Rsa I* (kolona 6: **cijepa**), *Alu I* (kolona 7: **cijepa**), *Nsi I* (kolona 8: ne cijepa), *Bgl I* (kolona 9: ne cijepa), *Hpa II* (kolona 10: ne cijepa), *EcoR I* (kolona 11: ne cijepa), *Kpn I* (kolona 12: ne cijepa)

Slika 36. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

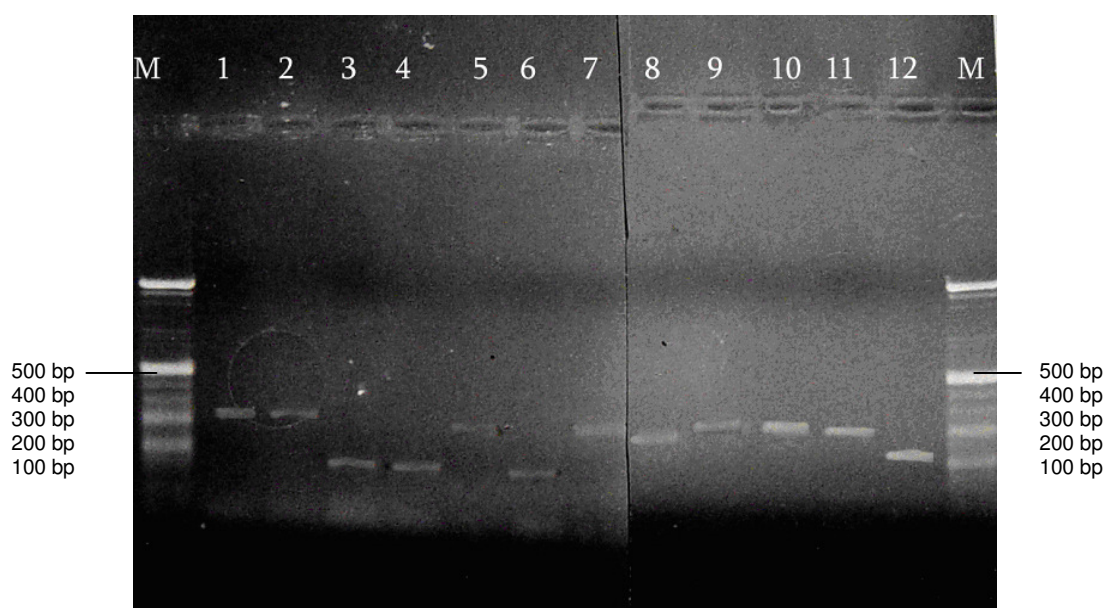
HPV 6 (varijanta 1)



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: ne cijepa), *Dde I* (kolona 2: ne cijepa), *Hae III* (kolona 3: **cijepa**), *Hinf I* (kolona 4: ne cijepa), *Pst I* (kolona 5: ne cijepa), *Rsa I* (kolona 6: **cijepa**), *Alu I* (kolona 7: ne cijepa), *Nsi I* (kolona 8: **cijepa**), *Bgl I* (kolona 9: ne cijepa), *Hpa II* (kolona 10: ne cijepa), *EcoR I* (kolona 11: ne cijepa), *Kpn I* (kolona 12: ne cijepa)

Slika 37. RFLP tipizacija PCR produkata umnoženog s parom začetnika p1/p2

HPV 6 (varijanta 2)



Legenda. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Enzimska razgradnja PCR produkta s *BamH I* (kolona 1: ne cijepa), *Dde I* (kolona 2: ne cijepa), *Hae III* (kolona 3: **cijepa**), *Hinf I* (kolona 4: **cijepa**), *Pst I* (kolona 5: ne cijepa), *Rsa I* (kolona 6: **cijepa**), *Alu I* (kolona 7: ne cijepa), *Nsi I* (kolona 8: **cijepa**), *Bgl I* (kolona 9: ne cijepa), *Hpa II* (kolona 10: ne cijepa), *EcoR I* (kolona 11: ne cijepa), *Kpn I* (kolona 12: **cijepa**)

Tablica 12. Varijante HPV 6 i HPV 16 u odnosu na različite skupine ispitanika

Varijante genotipova	Asimptomatski muškarci	Žene s različitim citološkim nalazom			Ukupno
		uredan	CIN 1	CIN 2 i/ili 3	
HPV 16-1	4	3	4	8	19
HPV 16-2	3	1	1	5	10
HPV 6 -1	3	1			4
HPV 6-2	1	2			3

RASPRAVA

Infekcija HPV je jedna od najčešćih spolno prenosivih bolesti (136); dokazano je da je dugotrajna infekcija pojedinim genotipovima ovog virusa neophodan čimbenik u razvoju karcinoma vrata maternice (184, 185).

Procjenjuje se da se prevalencija žena diljem svijeta koje su zaražene ovim virusom kreće od 2% do 44% (186). Općenito je prevalencija viša u mladim spolno aktivnih žena ispod 30 godina (7, 8, 187). U svim skupinama naših ispitanika najzastupljenija je bila dobna skupina između 20 i 30 godina starosti.

Informacija o rasporedu genotipova u određenoj populaciji bitna je za izbor odgovarajućeg probnog testa. Odgovarajući probni test bitan je preduvjet za uspostavu dijagnostičkog protokola u određenom geografskom prostoru. Osim toga, što preciznija informacija o raspodjeli određenih genotipova HPV važna je i za razvoj učinkovitog cjepiva (176).

Muškarci bez klinički vidljivih promjena u smislu HPV genitalne infekcije

Subkliničke ili latentne infekcije su među mladim seksualno aktivnim muškarcima češće nego kondilomi; prevalencija se općenito kreće od 20% do 50% (144).

Još osamdesetih godina prošlog stoljeća neki su istraživači smatrali da su muškarci važan rezervoar HPV i da je upravo asimptomatska priroda HPV infekcija u muškaraca važna u prijenosu infekcija na žene, te da se na taj način održavaju u

populaciji bolesti vezane za HPV (188). Nasuprot tome, Hippelainen i suradnici su početkom devedesetih godina prošlog stoljeća utvrdili relativno nisku podudarnost genotipova HPV između žena s patološkim citološkim nalazom na cerviksu i njihovih muških seksualnih partnera u finskoj populaciji (189). Međutim, relativno je malo istraživanja, u usporedbi s istraživanjima u žena, koja se sustavno bave ovom skupinom muškaraca (144, 146, 188, 189, 190, 191). Potrebno je više informacija o prevalenciji HPV infekcija u muškaraca, prirodnom tijeku infekcije, kao i dinamici prijenosa između seksualnih partnera.

Zbog toga smo mi u istraživanje uključili uzorke od 50 asimptomatskih muškaraca čije partnerice su imale infekciju s HPV visokog rizika i citološki nalaz CIN 1, 2 ili 3, a kod kojih smo PCR reakcijom uz korištenje začetnika MY09/MY11 i/ili p1/p2 dokazali prisutnost DNA HPV. Osjetljivost PCR metode s parom začetnika My09/11 bila je 94% (47/50), a s parom začetnika p1/p2 86% (43/50). Razlika između testova nije se pokazala statistički značajnom (χ -kvadrat test $p=0.1824$).

Paralelno smo uzorke testirali Digene Hybrid Capture 2 metodom (HC 2) koristeći probe za detekciju genotipova i visokog i niskog rizika. Osjetljivost ove metode bila je 90% (45/50). Razlika u osjetljivosti također nije bila statistički značajna (Fisherov egzaktni test $p=0.7150$).

HC 2 metoda ima odobrenje američke FDA (Food and Drug Administration) samo za dijagnostiku cervikalnih uzoraka. Rijetki su istraživači koji su koristili ovu metodu za detekciju HPV infekcija u muškaraca (146, 192). Rosenblatt i suradnici HC 2 metodom uspoređivali su incidenciju HPV infekcija u 30 žena s patološkim nalazom na cerviksu i 60 žena s urednim cervikalnim nalazom, te njihovih seksualnih partnera (192). Prema očekivanju, DNA HPV nađena je značajno češće u žena s patološkim citološkim nalazom nego u žena s urednim citološkim nalazom na cerviksu. Međutim,

nije nađena statistički značajna razlika u incidenciji DNA HPV u seksualnih partnera obje skupine žena. Kad je DNA HPV nađena u oba partnera, rijetko je nađena ista grupa virusa (visokog ili niskog rizika); nađena je nešto češće u skupini žena s CIN-om. Slično istraživanje proveli su Nicolau i suradnici. HC 2 metodom detektirali su HPV infekcije u asimptomatskih muškaraca čije partnerice su istom metodom imale dokazanu infekciju HPV. (146). U istraživanje je bilo uključeno 50 muškaraca; DNA HPV je nađena u 35 od 50 muškaraca (70%). Međutim, ista grupa virusa (visokog, odnosno niskog rizika) nađena je samo u 18 od 49 parova (36.7%). Dobiveni podaci nisu pokazivali konzistentni prijenos HPV, niti su omogućili da se utvrdi način na koji se HPV širi među stalnim seksualnim partnerima. Slične rezultate dobili su i drugi autori (189, 193). Vjerojatno su oba partnera u jednom trenutku bila izložena infektivnoj dozi HPV, koji je u vrijeme istraživanja detektiran samo kod jednog partnera. Razlike u već spomenutim vanjskim čimbenicima, kao i genetskim karakteristikama koje utječu na imunitet dovele su do različite kontrole i tijeka infekcije, što se manifestiralo slabim podudaranjem u detekciji HPV infekcije među partnerima.

Većina istraživanja HPV infekcija u asimptomatskih muškaraca i njihovih partnerica uključuje nekoliko desetaka do stotinjak ispitanika, ograničenih uglavnom na mlađe dobne skupine. U velikom multicentričnom istraživanju objavljenom 2002. godine obrađeno je 1143 partnera žena koje su bile uključene u 7 studija (194). Međutim, također je dobivena relativno slaba korelacija u HPV pozitivitetu između žena i njihovih partnera.

Mi smo u istraživanje uključili 50 asimptomatskih muškaraca čije partnerice su imale infekciju s HPV visokog rizika (uz citološki nalaz na cerviksu CIN 1, 2 ili 3), a kod kojih smo PCR reakcijom uz korištenje začetnika MY09/MY11 i/ili p1/p2 dokazali prisutnost DNA HPV. Međutim, u 21 uzorku nismo uspjeli umnožiti dovoljnu količinu

DNA HPV koja je potrebna za genotipizaciju metodom polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP). Razlozi za to mogu biti slijedeći: broj kopija virusa kod asimptomatskih muškaraca je mali, a osim toga, na količinu virusa u uzorku utječe i metoda uzimanja uzorka. Kay P. i suradnici (195) koristili su nested PCR i RFLP metodu za detekciju i genotipizaciju mukoznih genotipova HPV upravo za uzorke koji su sadržavali mali broj kopija virusne DNA (uzorci bukalne sluznice žena čiji je nalaz na cerviksu bio CIN 1, 2 ili 3). PCR reakcijom s jednim parom začetnika (PGMY09/11) bilo je pozitivno 19% uzoraka, a nested PCR reakcijom (s vanjskim i unutarnjim parom začetnika) bilo je pozitivno 74%. U prvoj reakciji DNA HPV detektirana je u svega 29% uzoraka bukalne sluznice koji su bili pozitivni nested PCR metodom. Slične rezultate dobili su i drugi autori (196).

Drugi razlog, koji je spomenut, a koji može utjecati na količinu DNA HPV u uzorku, odnosi se na sam uzorak, odnosno na mjesto i način uzimanja uzoraka. Općenito ne postoji slaganje o anatomskom mjestu sa kojega bi trebalo uzeti uzorak kod asimptomatskih muškaraca; preporučuje se uzeti uzorak s nekoliko različitih anatomskih mjesta. U nekoliko istraživanja u kojima se koristio urin kao uzorak za dokazivanje HPV infekcije u muškaraca, dobiveni su kontradiktorni rezultati (197, 198, 199). Wilkström i suradnici uzimali su uzorak četkicom iz unutrašnjeg dijela prepucija, glansa i sulcusa coronarius (144). Nisku prevalenciju HPV infekcija u asimptomatskih muškaraca, nađenu u tom istraživanju: 19/147 (13%), autori objašnjavaju time što nije uziman uzorak iz uretre. Nicolau i suradnici pokušali su utvrditi najbolje anatomsko mjesto za dokazivanje asimptomatske HPV infekcije; četkicom su uzeli uzorak sa šest različitih anogenitalnih mjesta: glansa, unutrašnjeg dijela prepucija (uključujući sulcus i coronu), distalnog dijele uretre, vanjske površine prepucija (na granici s kožom penisa), skrotuma i anusa (146). Dobili su slijedeće rezultate: kombiniranim uzimanjem uzoraka s vanjske i

unutrašnje površine prepucija i glansa postotak detekcije je bio 58%; ako se uz to uzme uzorak iz uretre, postotak detekcije raste na 70%. U našem istraživanju uzorci su uzimani ekskohleacijom sa predilekcijskih mjesta: distalnog dijela uretre, unutrašnjeg dijela prepucija i glansa uz prethodnu primjenu anestetičke kreme EMLA^R (Astra-Zeneca).

Zbog male količine virusa uspjeli smo genotipizirati uzorke od 29 asimptomatskih muškaraca. Takve rezultate dobili su i drugi autori koji su se bavili istraživanjem HPV infekcija u skupini asimptomatskih muškaraca (144, 194). Međutim, u uzorcima u kojima smo umnožili dovoljno DNA odrediti smo čak 9 različitih genotipova. Najčešće zastupljeni bili su HPV 16 (31%), HPV 6 (31%) i HPV 31 (10.3%). Veliki broj genotipova dobili su i drugi autori koji su ispitivali učestalost genotipova u asimptomatskih muškaraca, a HPV 16 je također bio najučestalije izoliran genotip. Wilkström i suradnici su u 235 asimptomatskih muškaraca našli 22 različita genotipa. Koristili su PCR reakciju s genotip specifičnim probama za 7 najčešćih genotipova. Za one genotipove koje nisu uspjeli tipizirati, koristili su reverznu hibridizaciju ili sekvencioniranje. Najčešće je izoliran HPV 16 (6.4%), a učestalo su izolirani i slijedeći genotipovi: 6, 18, 42, 56 i 73. HPV 56 i HPV 73 tada su prvi put nađeni u asimptomatskih muškaraca. HPV 73 također je nađen u našem istraživanju. U istraživanju Castellsague i sur. HPV 16 nađen je u 24.7% asimptomatskih muškaraca; po učestalosti slijede HPV 18 (4.9%), HPV 6/11 (3.3%), HPV 53 (3.3%), HP 31(2.7%), HPV 33 (2.2%) (199). HPV 18 slabo je zastupljen u našem istraživanju, kako u skupini asimptomatskih muškaraca: 1/29 (3.4%), tako i u ostalim skupinama ispitanika.

Usporedbom rezultata HPV genotipizacije asimptomatskih muškaraca i citološkog nalaza njihovih partnerica, našli smo sličan postotak genotipova visokog rizika u muškaraca čije partnerice su imale citološku dijagnozu CIN 1: 7/13 (53.8%) i onih čije partnerice su imale citološku dijagnozu CIN 2 i/ili3: 9/16 (56.25%). Osim toga, HPV

infekcija s genotipovima visokog rizika u asimptomatskih muškaraca (55.2%), nije se značajno razlikovala od infekcija u žena s urednim citološkim nalazom (47.0%) (χ^2 test = 0.7076). Ovi rezultati odgovaraju ranije spomenutim rezultatima Rosenblatta i suradnika (192).

Usprkos svih dosadašnjih istraživanja, prirodni tijek infekcije i dinamika prijenosa između seksualnih partnera još uvijek su nepoznanica. Prema rezultatima Wikströma i suradnika, infekcija s HPV u asimptomatskih muškaraca je najčešće tranzitorna (144). Kao i kod žena, perzistencija (trajanje infekcije duže od 6 mjeseci) je češće nađena kod muškaraca starijih dobnih skupina, kod infekcija s genotipovima visokog rizika ili kod infekcija s više različitih genotipova. Međutim, zbog određenih bioloških i imunoloških razlika između spolova, onkogeni potencijal HPV je veći za ženski genitalni trakt nego za muški (144).

Većina autora podupire testiranje HPV u asimptomatskih muškaraca, iako prisutnost DNA HPV u muškog partnera ne znači nužno istovremenu infekciju s HPV, ili čak promjene na cerviksu (CIN), u žene.

Prema rezultatima nekih autora testiranje HPV bolje korelira sa histološkim nalazom HPV infekcije nego peniskopija (146). Reakcija s octenom kiselinom može davati lažno pozitivne rezultate u nisko rizičnoj populaciji (192). Naime, u radu Rosenblatta i sur. u 57% slučajeva pozitivne peniskopije DNA HPV nije nađena (192). U tom istraživanju upotrijebljena je HC 2 metoda. Prema našim rezultatima osjetljivost HC 2 metode ne razlikuje se značajno od PCR metode. S druge strane, PCR metoda je možda preosjetljiva za rutinsko testiranje HPV infekcija u asimptomatskih muškaraca, kao što je slučaj i u žena.

Žene s različitim citološkim nalazom

Već spomenuta velika varijacija u prevalenciji HPV infekcija među ženama širom svijeta objašnjava se razlikama u dobnim skupinama koje su bile uključene u istraživanje, kao i razlikama u osjetljivosti primjenjenih metoda. To se posebno odnosi na spektar genotipova koji je nađen u određenom istraživanju, a koji je prije svega ovisan o izboru genotipizacijske metode, populaciji uključenoj u istraživanje, kao i o veličini uzorka.

Od 70 žena uključenih u istraživanje u 3 žene s urednim citološkim nalazom nismo uspjeli umnožiti dovoljnu količinu DNA HPV koja je potrebna za genotipizaciju. Ako uzorak sadrži mali broj DNA HPV kopija, rezultat može biti lažno negativan i kod vrlo osjetljivih metoda (185). To je najčešće slučaj kod žena s urednim citološkim nalazom na cerviksu, kao i kod asimptomatskih muškaraca. Prevladava mišljenje da je mala količina virusa najčešće tranzitorna i da nema kliničko značenje (118, 200).

Perzistencija je ključna značajka infekcija povezanih s visokim stupnjem bolesti. Može se izravno utvrditi samo ponavljanim testiranjem, ali postoje karakteristike koje mogu poboljšati prediktivnu vrijednost jednog testiranja. To su dob, genotip i količina virusa (200). Rezultat pretrage može ovisiti i o dijelu menstrualnog ciklusa (185, 201). Greške pri uzimanju mogu utjecati ne samo na prisutnost ili odsutnost DNA HPV, nego i na rezultat genotipizacije, posebno ako je prisutno više genotipova u različitim koncentracijama (185). Analiza cervikalnih briseva i cervikalne biopsije kod istog pacijenta dala je komparabilne, ali ne identične rezultate (201).

Ukupno smo genotipizirali 67 žena s različitim citološkim nalazom (17 žena s urednim citološkim nalazom, 25 žena s CIN 1 i 25 žena s CIN 2 i/ili 3. U 17 žena s urednim citološkim nalazom najčešće smo izolirali HPV 16 (23.5%) i HPV 6 (23.5%).

Prema rezultatima većine istraživanja HPV 16 je najčešće izoliran genotip i u žena s urednim citološkim nalazom (161, 169, 202, 203, 204, 205, 206). HPV 6, koji smo izolirali u istom postotku kao HPV 16, na prvom je mjestu po učestalosti u žena s urednim citološkim nalazom u Švedskoj i Sloveniji (162, 163). Ukupno smo u žena s urednim citološkim nalazom dobili 9 različitih genotipova. U različitim istraživanjima ovaj broj je varirao ovisno o broju žena uključenih u istraživanje i o metodi koja je korištena za genotipizaciju; u Sloveniji je kod 11 žena s urednim citološkim nalazom nađeno 6 različitih genotipova, a 26 kod 3305 žena u Nizozemskoj (162, 169).

U našem istraživanju HPV 16 je najčešći genotip i kod ostalih skupina žena; nađen je u 28% žena s CIN 1 i 60% žena s CIN 2 i/ili 3. Žene s CIN 1 i žene s urednim citološkim nalazom u našem istraživanju imaju sličnu učestalost HPV 16 (χ -kvadrat test $p=0.2058$), dok se žene s CIN 2 i/ili 3 statistički značajno razlikuju u učestalosti HPV 16 u odnosu na žene s urednim citološkim nalazom (χ -kvadrat test $p=0.0198$). Ovi podaci u skladu su s rezultatima većine istraživanja: učestalost HPV 16 raste s rastućim stupnjem citoloških promjena. HPV 16 je bio najčešće detektiran genotip i u žena s CIN 2 (u Njemačkoj 45.8%, Sloveniji 33.7%, Švedskoj 26.7%) i CIN 3 (Njemačka 78.8%, Slovenija 78.8%, Švedska 55%) (154, 162, 163). Međutim, u jednom ranijem istraživanju u Hrvatskoj najčešće izoliran genotip u žena s CIN 2 bio je HPV 6/11 (24.6%), dok je u žena s CIN 3 najčešće izoliran bio HPV 16 (50.0%) (141).

Slijedeći po učestalosti u našem istraživanju bio je HPV 31. Ukupno je izoliran u 10.4% žena. Podjednako je zastupljen u svih skupina žena (u 11.7% u žena s urednim citološkim nalazom, 8.0% žena s CIN 1, 12.0% žena s CIN 2). HPV 31 po učestalosti je također bio na drugom mjestu u već spomenutom istraživanju u Nizozemskoj kojim je obuhvaćeno 3305 žena s urednim nalazom na cerviksu (169). U Sloveniji je HPV 31 nađen u 16.6% žena s CIN 1, 22.1% žena s CIN 2 i 11.6% žena s CIN 3, dok kod žena s

urednim citološkim nalazom nije nađen (162). U ranijem istraživanju u Hrvatskoj ovaj genotip je nađen u 16.9% (11/65) žena s CIN 1, 22.9% (14/61) žena s CIN 2 i 11.5% (3/26) žena s CIN 3 (141). Od ostalih genotipova u našem istraživanju po učestalosti slijedi HPV 6, koji je nađen samo u 4 žene s urednim citološkim nalazom (23.3%) i u jedne žene s CIN 1 (4%). Ovi rezultati su u skladu s većinom drugih istraživanja (162, 163, 169); u spomenutom istraživanju u Hrvatskoj HPV 6/11 bili su najčešće izolirani genotipovi u žena s CIN 1: 33.% (22/65) i žena s CIN 2: 24.6% (15/61) (141).

Usporedbom genotipova prema onkogenom potencijalu u pojedinim skupinama ispitanika, dobili smo statistički značajnu razliku samo u skupini žena s CIN 2 i/ili 3 u odnosu na kontrolnu skupinu (Fisherov egzaktni test $p=2.060E-04$).

U 67 uzoraka dobili smo 17 različitih genotipova. U Sloveniji su kod 191 žene s različitim citološkim nalazom dokazali 21 različiti genotip; u dijelu istog istraživanja kod 76 žena s različitim stupnjem citoloških promjena, u koju nisu bile uključene žene s urednim citološkim nalazom, našli su 11 različitih genotipova (162). U Češkoj su kod 171 žene s različitim citološkim promjenama nađena 22 različita genotipa (161), u SAD-u kod 250 žena 23 različita genotipa (71). Spektar genotipova HPV u određenom istraživanju, prije svega, ovisi o izboru genotipizacijske metode. U spomenutoj studiji u Češkoj koristili su dot-blot metodu s određivanjem nukleotidnoga rasporeda, u SAD-u PCR metodu i hibridizaciju s genotip specifičnim začetnicima (71, 161). U Sloveniji su koristili RFLP metodu sa 7 restrikcijskih enzima (207).

Broj različitih genotipova po pojedinim skupinama žena u našem istraživanju bio je slijedeći: u žena s urednim citološkim nalazom našli smo devet različitih genotipova, u žena s CIN 1 jedanaest, u žena s CIN 2 i/ili 3 osam. Prema podacima iz literature heterogenost genotipova se smanjuje s rastućim stupnjem citoloških promjena. U istraživanju provedenom u Njemačkoj u 49 žena s CIN 1 našli su 9 različitih genotipova,

u 31 žene s CIN 2 šest, a u 34 žene s CIN 3 4 (158). U Sloveniji su u žena s urednim citološkim nalazom našli 19 različitih genotipova, u 18 žena s CIN 1 devet, u 18 žena s CIN 2 sedam, a u 26 žena s CIN 3 pet (162). U našem istraživanju broj različitih genotipova bio je podjednak u svim skupinama žena: 9 u 17 žena s urednim citološkim nalazom, 11 u 25 žena s CIN 1 i 8 u 25 žena s CIN 2 i/ili 3. Međutim, ukupni broj uzoraka u našem i drugim spomenutim istraživanjima bio je premalen da bi se mogli donositi zaključci.

U asimptomatskih muškaraca nađen je podjednak broj različitih genotipova (devet). Neki genotipovi nađeni su samo u jednoj od ispitivanih skupina: HPV 66 samo u skupini asimptomatskih muškaraca, HPV 61 u žena s urednim citološkim nalazom, HPV 62, HPV 54 i HPV 70 samo u skupini žena s CIN 1.

Iako je broj ispitanika u ovom istraživanju relativno malen, nađen je relativno velik broj različitih genotipova. Kao što je ranije spomenuto, do sada je u Hrvatskoj napravljeno više različitih istraživanja u različitim grupama ispitanika (muškarci s kondilomima, asimptomatski muškarci, žene s urednim citološkim nalazom na cerviksu, te žene s različitim stupnjevima citoloških promjena) koji su uključivali veći broj uzoraka (141, 142, 143, 172, 173, 174, 175). Međutim, u svim tim istraživanjima genotip specifičnim probama određivani su samo neki genotipovi: HPV 6/11, 16, 18, 31, 33. Ovo je prvo istraživanje u kojem su se pokušali odrediti genotipovi koji cirkuliraju na ovom prostoru. U 96 uzoraka uzetih od različitih skupina žena i asimptomatskih muškaraca dobili smo 18 različitih genotipova. Ovi rezultati ukazuju na potrebu provođenja velikog multicentričnog istraživanja koje će obuhvatiti različite segmente populacije. Uz velika istraživanja u različitim zemljama, napravljena su i velika internacionalna istraživanja (7, 8, 136, 165). Praktična vrijednost ovakvih istraživanja je u činjenici da su profilaktične vakcine, koje su trenutno u različitim fazama kliničkih ispitivanja, najvjerojatnije tipno

specifične, i potrebno je točno znati kolika je učestalost pojedinih genotipova u nekoj populaciji. Drugi, ne manji razlog, leži u činjenici da se na tržištu pojavljuju različiti komercijalni testovi za detekciju i/ili genotipizaciju HPV koji obuhvaćaju određen spektar genotipova. Da bi se između tih testova, kojih će s vremenom biti sve više, mogao izabrati onaj koji je najprimjereniji za neku populaciju, potrebno je poznavati «HPV status» te populacije.

Usporedba genotipizacije i rezultata HC 2 testa

Zadnjih nekoliko godina razvoj visoko osjetljivih testova baziranih na detekciji DNA revolucionalizirao je dijagnostiku HPV i omogućio istraživanje različitih bitnih aspekata HPV infekcija. Međutim, rezultati dijagnostičkih testova trebaju se pažljivo interpretirati i zahtijevaju pažljivu laboratorijsku provjeru. Zbog velikog broja različitih testova postoji jasna potreba za vanjskom kontrolom kvalitete što bi omogućilo usporedbu različitih dijagnostičkih metoda. Naime, molekularne tehnike za detekciju HPV razlikuju se u osjetljivosti i specifičnosti. Iskustvo laboratorija je presudan uvjet za vjerodostojne rezultate.

Postoje dva različita načina primjene molekularne dijagnostike HPV. Prvi nastoji identificirati žene koje imaju povećan rizik za razvoj karcinoma cerviksa (programima probira ili na kliničkim odjelima). Za tu svrhu efikasniji su manje osjetljivi ili kvantitativni testovi koji neće identificirati žene s minornim citološkim promjenama; na taj način poboljšana je i negativna i pozitivna prediktivna vrijednost testa (208, 209). Također je važno da ovi testovi detektiraju samo genotipove visokog rizika, koji su

značajno povezani s cervikalnim karcinomom.

Drugi način primjene dijagnostike HPV obuhvaća različita istraživanja: epidemiološka, ispitivanja efikasnosti vakcine, kao i istraživanja prirodnog tijeka infekcije. Upravo suprotno nego za kliničku primjenu, potrebni su visoko osjetljivi i reproducibilni testovi kojima se može odrediti širok spektar genotipova. Cilj takvih istraživanja je prikupiti maksimum informacija o statusu HPV u populaciji i detaljno pratiti tijek infekcije. Za obje svrhe bio bi idealan test kojem bi se za detekciju HPV mogao mijenjati cut-off, i kojim bi se po potrebi, mogla raditi i genotipizacija. Takav test, na žalost, danas ne postoji, a postupnik za testiranje sastavljen je od kombinacije različitih komplementarnih metoda.

U ovom istraživanju koristili smo obje skupine testova: one kojima se u programima probira nastoji identificirati žene koje imaju povećan rizik za razvoj karcinoma cerviksa (HC 2), kao i visoko osjetljive testove koji se koriste u istraživanjima (PCR umnožen parom začetnika MY09/11 i PCR umnožen parom začetnika p1/p2).

Upravo to su bili neki od ciljeva našeg istraživanja: na temelju rezultata istraživanja pokušati stvoriti polazne pretpostavke za uspostavu optimalnog algoritma za tipizaciju genotipova HPV u Hrvatskoj.

Kao što je već spomenuto, HC 2 je trenutno jedini komercijalni test za testiranje HPV koji ima odobrenje američke FDA za korištenje u humanoj medicini. Test je namijenjen rješavanju graničnih citoloških rezultata (ASCUS) i za primarni screening kao dodatak citologiji. Ima visoku osjetljivost koja je usporediva s PCR metodom. Dvije probe sadrže mješavinu 13 najčešćih genotipova visokog rizika, odnosno 5 najčešćih genotipova niskog rizika. Međutim, zbog sličnosti pojedinih sekvenci različitih genotipova, dolazi do preklapanja, odnosno cross-reakcije koja može utjecati na specifičnost i sigurnost testa. To je glavni nedostatak testa koji je prepoznat već kod prve

generacije testa (210), a do danas su ga opisali mnogi autori (211, 212, 213).

Proizvođač je potvrdio cross-hibridizaciju između probe za detekciju genotipova visokog rizika i samo 5 genotipova: HPV 6, HPV 40, HPV 42, HPV 53 i HPV 66, i to ako se nalaze u visokoj koncentraciji (214), međutim, ukupno su poznata najmanje 22 različita genotipa koja cross-hibridiziraju s HC 2 probom za detekciju genotipova visokog rizika (213)

Najviše genotipova koji nisu uključeni u HC 2 test našli su Poljak i suradnici, čak 15 (213). U istraživanje su uključili 312 cervikalnih uzoraka koji su bili pozitivni probom za detekciju genotipova visokog rizika. Za genotipizaciju su koristili gotovo identičnu metodu kao i mi (PCR sa začetnicima PGMY09/PGMY11 i RFLP sa sedam različitih restrikcijskih enzima).

Od osam genotipova iz našeg istraživanja koji nisu uključeni u HC 2 test, samo je jedan genotip visokog rizika (HPV 73), dva su vjerojatno visokog rizika (HPV 53, HPV 66), a pet je niskog rizika (HPV 40, HPV 54, HPV 70, HPV 61 i HPV 62).

Oba genotipa niskog rizika (HPV 61 i HPV 62) nađena su probom za detekciju genotipova niskog rizika, što povećava osjetljivost testa, a ne smanjuje specifičnost. Genotip visokog rizika (HPV 73) i genotipovi vjerojatno visokog rizika (HPV 53 i HPV 66) nađeni su probom za detekciju genotipova visokog rizika, što također povećava osjetljivost testa, a ne smanjuje specifičnost. Nađeni su u 7 uzoraka (7.3%). Ova prednost HC 2 testa, da otkriva više genotipova visokog i potencijalno visokog rizika, prepoznata je i od drugih autora (211, 212, 213). Danas je poznato najmanje 6 takvih genotipova (213).

Problem je u genotipovima niskog rizika (HPV 6, HPV 40, HPV 54, HPV 70) koji su nađeni probom za detekciju genotipova visokog rizika, ili su davali pozitivni signal s obje probe. Ovi lažno pozitivni rezultati mogu dovesti do posljedica kao što je

nepotrebni stres, ponavljanje pretraga, uključivanje dodatnih pretraga i nepotrebno liječenje. HPV 6 je široko rasprostranjen genotip, međutim, ostala 3 genotipa nađena u našem istraživanju su relativno rijetka. Osim HPV 6, HPV 11 i HPV 42 su također široko rasprostranjeni genotipovi niskog rizika koji mogu davati pozitivni signal probom za detekciju genotipova visokog rizika. Od devet uzoraka u kojima smo našli HPV 6, u dva smo imali pozitivne obje probe (iako je signal bio jači za probu niskog rizika). U ovom slučaju može se raditi o cross-hibridizaciji, ali i o miješanoj infekciji, kod koje je drugi genotip u vrlo maloj koncentraciji. Lažno pozitivan rezultat dobili smo u 6 uzoraka (6.3%). Sličan rezultat dobili su Poljak i suradnici (4.8%) (213).

Usprkos ovim nedostacima HC 2 je dobar test: osjetljivost u našem istraživanju bila je 95%. Proizvođač je potvrdio cross-hibridizaciju između probe za detekciju genotipova visokog rizika i samo 5 genotipova (214), što su potvrdili i naši rezultati. Osim toga, negativna prediktivna vrijednost ovog testa je oko 99%.

RFLP metoda na dijelu genoma E1

Korištenjem začetnika p1/p2 umnožili smo dio genoma E1 veličine 526 – 594 bp. Taj dio genoma izabrali smo zato što je E1 uz L1 najočuvaniji dio genoma, a začetnici p1/p2 ne umnožavaju genotipove koji uzrokuju kožne lezije (100). Nakon umnožavanja dobivene amplifikate potvrdili smo elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu bojenom etidijevim bromidom. Od 120 pozitivnih uzoraka, ovom metodom je bilo pozitivno 111; osjetljivost metode je 92.5%. S p1/p2 PCR dobili smo 3 pozitivna uzorka

koja su bila negativna PCR metodom umnoženom parom začetnika MY09/MY11; tek kombinacijom metoda dobili smo 120 pozitivnih uzoraka. Razlika između ove dvije metode nije se pokazala statistički značajnom (χ -kvadrat $p=0.0756$). I drugi autori su kombiniranjem različitih RFLP metoda dobili veći broj pozitivnih uzoraka (142, 215). Kado i suradnici iste uzorke genotipizirali su RFLP analizom dobivenom umnožavanjem s pet različitih parova začetnika. DNA HPV bila je umnožena sa svih 5 parova začetnika samo u 44% uzoraka. Kombinacijom metoda dobili su 99% pozitivnih uzoraka; s parom začetnika MY09/11 nađeno je samo 69% pozitivnih uzoraka (215).

Međutim, kao i nakon amplifikacije sa začetnicima MY09/MY11, u nekim uzorcima nismo uspjeli umnožiti dovoljnu količinu DNA HPV koja je potrebna za genotipizaciju metodom polimorfizma restrikcijskih fragmenata (RFLP).

Contorni i suradnici su ovaj dio genoma cijepali samo s dva enzima: *Alu I* i *Nsi I* (100). Restrikcijski enzim *Alu I* cijepa samo genotipove visokog rizika, dok genotipovi niskog rizika ostaju nepocijepani, i obrnuto: *Nsi I* cijepa samo genotipove niskog rizika, dok genotipovi visokog rizika ostaju nepocijepani. Ove rezultate potvrdili smo i mi u našem istraživanju.

Dobivene amplifikate cijepali smo s 12 restrikcijskih enzima: *BamH I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I*, *Rsa I*, *Alu I*, *Nsi I*, *Bgl I*, *Hpa I*, *EcoR I* i *Kpn I*. Prema preporukama M.J.Struelensa, kod dobivenih rezultata vrednovali smo slijedeće karakteristike: tipabilnost, diskriminacijsku moć metode, reproducibilnost i jednostavnost (216).

Tipabilnost RFLP metode je specifični raspored fragmenata za različite genotipove, koji dobijemo kad HPV umnožen PCR izložimo djelovanju restrikcijskih endonukleaza koje ga cijepaju na točno određenom mjestu ovisno o specifičnom nukleotidnom rasporedu.

Diskriminacijska moć je prosječna vjerojatnost kojom će tipizacijska metoda dva različita genotipa prepoznati kao različite.

Tipabilnost i diskriminacijska moć metode su proporcionalne s brojem upotrijebljenih restrikcijskih enzima. Iako smo mi upotrijebili 12 restrikcijskih enzima, PCR- RFLP metoda s parom začetnika p1/p2 pokazala se slabo tipabilnom i slabo diskriminatornom u usporedbi s najčešće korištenom RFLP metodom koju su uveli Bernard i sur. (92), a koju smo koristili kao standardnu metodu. Naime, kod većine genotipova dobili smo vrlo sličan raspored i vrlo mali broj fragmenata na osnovu kojeg ih nismo mogli međusobno razlikovati. Ukupno smo ovom metodom uspjeli tipizirati 7 genotipova (od 18 koliko smo ih dobili metodom RFLP/MY09/11).

Reproducibilnost metode je karakteristika da ponavljanjem tipizacije uvijek dobijemo isti rezultat. Testirana je uključivanjem 6 identičnih izolata višestruko u isti PCR test. Tada je reproducibilnost bila odlična, bez ikakvih razlika u odnosu na intenzitet i distribuciju fragmenata.

Jednostavnost izvođenja

Sama tehnika ne razlikuje se od RFLP/MY09/11. Ne zahtijeva posebne vještine i specifičnu opremu. Sve se izvodi uobičajenim tehnikama i aparatima za standardni molekularni laboratorij. Međutim, RFLP metoda ipak nije tehnika kojom bi se rutinski obrađivao velik broj uzoraka.

Subtipizacija

Perzistentna infekcija smatra se jednim od najvažnijih prediktora za razvoj karcinoma cerviksa, a definira se kao prisutnost istog genotipa visokog rizika u dva cervikalna uzorka uzeta u razmaku od najmanje 6 mjeseci (159, 213). Kako su

HPV infekcije česte, dokazivanje prisutnosti istog genotipa moglo bi značiti i reinfekciju, pa bi uz genotipizaciju i analiziranjem molekularnih varijanti trebalo potvrditi prisutnost istog virusa (213).

Poznato je da genotipovi HPV imaju varijacije unutar genoma koje pokazuju različitu geografsku i etničku distribuciju, a neke varijante su češće nađene kod karcinoma (217, 218). Ove varijante otkrivaju se sekvencioniranjem, najčešće unutar regija E6 i E7 (218). HPV16, koji je najviše istražen, ima brojne varijante od kojih su neke značajno povezane s invazivnim karcinomom cerviksa (219, 220). Međutim, nađene su varijante i u drugih visokorizičnih genotipova (HPV 18, HPV 31, HPV 35) (221, 222, 223). Mi smo kombinacijom dviju metoda pokušali bez sekvencioniranja otkriti varijacije unutar poznatih genotipova.

Usporedbom genotipova koje smo odredili standardnom metodom i tih istih genotipova dobivenih RFLP metodom na dijelu genoma E1, dobili smo novom metodom 2 različita rasporeda fragmenata samo za HPV 16 i HPV 6. U literaturi do sada nije opisan ovakav način subtipizacije. Ova dva genotipa nađena su u relativno velikom broju uzoraka (HPV 16 u 35 uzoraka, HPV 6 u 9); vjerojatno bi našli varijante i u drugih genotipova da su nađeni u većem broju.

Usporedbom ovih varijanti s različitim skupinama ispitanika, nismo primijetili razlike u učestalosti pojedine varijante. Međutim, za statističku obradu i definitivnu procjenu metode potrebno je testirati veći broj genotipova HPV 16 i HPV 6.

Iako se RFLP/p1/p2 metoda nije pokazala tipabilnom, u kombinaciji s RFLP/MY09/11 metodom mogla bi se koristiti «kao druga linija», odnosno kao subtipizacijska metoda. U praksi bi se to moglo koristiti za dokazivanje perzistentnih infekcija ili za epidemiološke potrebe.

ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata našeg istraživanja, može se zaključiti:

1. Usporedbom genotipova prema onkogenom potencijalu i pojedine skupine ispitanika, našli smo da je prevalencija visokorizičnih genotipova značajno veća u žena s CIN 2 i/ili 3 (94%), u odnosu na kontrolnu skupinu žena (47%).
2. Osjetljivost Hybrid Capture 2 metode u našem ispitivanju bila je 95%; statistički se značajno ne razlikuje od PCR metode.
3. Genotipovi visokog rizika, odnosno vjerojatno visokog rizika koji nisu uključeni u Hybrid Capture 2 test (HPV 73, HPV 53 i HPV 66) dokazani su probom za detekciju genotipova visokog rizika u 7.3% uzoraka. To povećava osjetljivost testa (pozitivna cross-hibridizacija).
4. U 6.3% uzoraka Hybrid Capture 2 testom dobili smo lažno pozitivan rezultat, odnosno genotipove niskog rizika (HPV 6, HPV 40, HPV 54, HPV 70) identificirali smo probom za detekciju visokog rizika, ili su davali «pozitivni signal» s obje probe (negativna cross-hibridizacija).
5. RFLP metoda na dijelu genoma E1 veličine 526 – 594 bp koji smo umnožili korištenjem začetnika p1/p2 pokazala je slabiju tipabilnost i diskriminacijsku moć u usporedbi s najčešće korištenom RFLP metodom.
6. Kombinacijom 2 RFLP metode dobili smo dvije varijante HPV 16 i HPV 6, što do sada nije bilo postignuto na ovaj način.
7. Mislimo da rezultati ovog ispitivanja mogu doprinijeti uspostavi optimalnog algoritma za genotipizaciju HPV u Hrvatskoj; za racionalan probir za ranu detekciju karcinoma cerviksa, te za dijagnostiku infekcija kod asimptomatskih muškaraca. Predlažemo da se HC 2 metoda koristi za probir, RFLP/MY09/11 kao tipizacijska metoda, a RFLP/p1/p2 kao subtipizacijska metoda.

SAŽETAK

Cilj ovog rada je istraživanje vrijednosti PCR-RFLP metode na dijelu genoma E1 za genotipizaciju HPV, određivanje osjetljivosti rutinske probirne metode HC 2 u našim uzorcima uzetih od žena s različitim citološkim nalazom i asimptomatskih muškaraca, te na temelju dobivenih rezultata pokušati stvoriti polazne pretpostavke za uspostavu optimalnog algoritma za tipizaciju genotipova HPV u Hrvatskoj.

U istraživanje je uključeno 120 ispitanika koji su podijeljeni u 4 skupine: skupina od 25 žena s CIN 1, skupina od 25 žena s CIN 2 i/ili 3, skupina od 50 asimptomatskih muškaraca koji su bili upućeni na testiranje jer njihova partnerica ima dokazanu infekciju s HPV visokog rizika, te kontrolna skupina od 20 žena s urednim citološkim nalazom. Uzorci za ispitivanje ženskih ispitanika su obrisci vrata maternice. Uzimani su prema indikacijama pri rutinskom ginekološkom pregledu. Uzorci za ispitivanje muških ispitanika su biopat kože i/ili sluznice genitalne regije. Uzeti su ekskohleacijski uz prethodnu primjenu anestetičke kreme EMLA^R (Astra-Zeneca).

U skupini od 50 asimptomatskih muškaraca osjetljivost PCR metode s parom začetnika My09/11 bila je 94% (47/50), a s parom začetnika p1/p2 86% (43/50). Paralelno su uzorci testirani HC 2 metodom koristeći probe za detekciju genotipova i visokog i niskog rizika. Osjetljivost ove metode bila je 90% (45/50). Razlika u osjetljivosti između pojedinih metoda nije se pokazala statistički značajnom (χ -kvadrat test $p=0.1824$; Fisherov egzaktni test $p=0.7150$). Genotipizacijom je u ovoj skupini nađeno čak 9 različitih genotipova. Najčešće zastupljeni bili su HPV16 (31%), HPV6 (31%) i HPV31 (10.3%). Infekcija s HPV visokog rizika nađena je u 55.2% asimptomatskih muškaraca, što se nije pokazalo statistički značajnim u odnosu na žene s urednim citološkim nalazom (47%) (χ -kvadrat test $p=0.7076$).

Ukupno je genotipizirano 67 žena s različitim citološkim nalazom. Žene s CIN 1 i žene s urednim citološkim nalazom imale su sličnu učestalost HPV 16 (23.5%, odnosno 28%), dok se žene s CIN 2 i/ili 3 statistički značajno razlikuju u učestalosti HPV 16 (60%) u odnosu na žene s urednim citološkim nalazom (χ -kvadrat test $p=0.0198$).

Usporedbom genotipova prema onkogenom potencijalu u pojedinim skupinama ispitanika, statistički značajno se razlikovala samo skupina žena s CIN 2 i/ili 3 u odnosu na kontrolnu skupinu (Fisherov egzaktni test $p=2.060E-04$).

U 96 uzoraka nađeno je 18 različitih genotipova. Od toga 8 genotipova nije uključeno u HC 2 test (HPV 73, HPV 53, HPV 66, HPV 40, HPV 54, HPV 70, HPV 61 i HPV 62). Genotipovi niskog rizika (HPV 61 i HPV 62) nađeni su probom za detekciju genotipova niskog rizika, a genotip visokog rizika (HPV 73) i genotipovi vjerojatno visokog rizika (HPV 53 i HPV 66) nađeni su probom za detekciju genotipova visokog rizika, što povećava osjetljivost testa, a ne smanjuje specifičnost (7.3% uzoraka). Problem je u uzorcima u kojima su genotipovi niskog rizika (HPV 6, HPV 40, HPV 54, HPV 70) nađeni probom za detekciju genotipova visokog rizika, ili su davali pozitivni signal s obje probe. Ovi lažno pozitivni rezultat dobiveni su u 6.3% uzoraka.

Korištenjem začetnika p1/p2 umnožen je dio genoma E1 veličine 526 – 594 bp. Od 120 pozitivnih uzoraka, ovom metodom je bilo pozitivno 111; osjetljivost metode je 92.5%. S p1/p2 PCR dobivena su 3 pozitivna uzorka koja su bila negativna PCR metodom umnoženom parom začetnika MY09/MY11; tek kombinacijom metoda dobiveno je 120 pozitivnih uzoraka.

Dobiveni amplifikati cijepani su s 12 restrikcijskih enzima. PCR- RFLP metoda s parom začetnika p1/p2 pokazala se slabo tipabilnom i slabo diskriminatornom u usporedbi s najčešće korištenom RFLP metodom koju su uveli Bernard i sur., a koja je korištena kao standardna metoda. Kod većine genotipova dobiven je vrlo sličan raspored i vrlo mali broj fragmenata na osnovu kojeg se nisu mogli međusobno razlikovati. Ukupno je ovom metodom tipizirano 7 genotipova (od 18 koliko je dobiveno RFLP/MY).

Kombinacijom ovih dviju metoda (RFLP/MY i RFLP/p1p2) nađene su varijacije unutar poznatih genotipova. Dobivena su 2 različita rasporeda fragmenata za HPV 16 i HPV 6. Usporedbom ovih varijanti s različitim skupinama ispitanika, nisu primijećene razlike u učestalosti pojedine varijante.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the value of the PCR-RFLP method performed on part of the gene E1 for genotyping of the HPVs; to determine the sensitivity of the HC 2 method in our samples and on the basis of our results to try to create optimal algorithm for HPV genotyping in Croatia..

In the study were included 120 men and women divided in 4 groups: a group consisted of 25 women with CIN I, a group consisted of 25 women with CIN II and/or III, a group consisted of 50 asymptomatic men; in control group there were 20 women with negative cytology. Brush swabs were used to obtain the endocervical samples from women; samples were taken according to indications during routine gynecologic examination. Bioptic samples of the skin and/or mucous membrane of the genital region were taken from men included in the study after the area was anesthetized with EMLA^R cream (Astra-Zeneca).

In the group of asymptomatic men the sensitivity of the PCR/MY09/11 method was 94% (47/50), of the PCR/p1p2 86% (43/50) and of HC 2 90% (45/50). The differences among these methods were not statistically significant (χ^2 - test $p=0.1824$; Fisher's test $p=0.7150$). In this group was found 9 different genotypes. The most frequent genotypes were: HPV 16 (31%), HPV 6 (31%) and HPV 31 (10.3%). The frequency of infection with high risk genotypes (55.2%) was not significantly different from control group of women (47%) (χ^2 - test $p=0.7076$).

Totally it was genotyped 67 samples taken from women with and without CIN (control group). It was found that the frequency of HPV 16 was similar in normal women (23.5%) and women with CIN 1 (28%), but it was found statistically significant difference in women with CIN 2 and/or 3 (60%) (χ^2 -test $p=0.0198$).

Comparing genotypes according to oncogenic potential, it was found statistically significant difference only in women with CIN 2 and/or 3 (Fisher test $p=2.060E-04$).

In 96 samples was found 18 different genotypes; 8 genotypes were not included in HC 2 test: (HPV 73, HPV 53, HPV 66, HPV 40, HPV 54, HPV 70, HPV 61 and HPV 62). Low risk genotypes (HPV 61 and HPV 62) were found with probe for detection low risk genotypes; high risk and probable high risk genotypes (HPV 73, HPV 53 and HPV 66) were found with probe for detection high risk genotypes; it increased the sensitivity of the test, but not reduced specificity (7.3%). The problem were samples in which low risk genotypes (HPV 6, HPV 40, HPV 54, HPV 70) were found with probe for detection high risk genotypes or the signal was positive with both probes. These false positive results were found in 6.3% of samples.

Using the set of general primers p1/p2 it was amplified a 526–594 bp fragment spanning the E1 open reading frame (ORF). Out of 120 samples, with this method it was positive 111; the sensitivity of the method was 92.5%. With p1/p2- PCR it was found 3 positive samples which were negative with MY09/MY11- PCR; only combining the methods were found all positive samples.

Amplified sequences were analysed by restriction endonuclease digestion. RFLP method performed on E1 was found weakly discriminatory comparing with the most used RFLP method. With this method it was totally genotyped 7 genotypes (out of 18 which were genotyped with RFLP/MY). Combining two RFLP methods we found two variants of HPV 16 and HPV 6. However, comparing these variants with different groups of women and with group of asymptomatic men, differences were not found in frequencies of the particular variants.

POPIS LITERATURE

1. Syrjanen K, Syrjanen S. Historical overview of papillomavirus research: papillomavirus infections in human pathology. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2000.
2. Omeljčenko-Pasini V. Condylomata acuminata. U: Kogoj F, ur. Spolne bolesti, II izdanje. JAZU Zagreb 1966:323-327.
3. Rous P, Kidd JG. The carcinogenic effect of a virus on tarred skin. Science 1936; 83: 468 - 9.
4. Rowson KEK, Mahy BWJ. Human papova (wart) virus infection. Bacteriol Rev 1967; 31: 110 – 31.
5. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. Virology 1977; 76: 569 – 80.
6. 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; 29: 143- 6.
7. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 796 – 801.
8. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 958 – 64.
9. Wieland U, Pfister H. Papillomaviruses in human pathology; epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross G, Barrasso, eds. Human papillomavirus infection. A Clinical Atlas. Berlin, Wiesbaden: Ullstein Mosby, 1997: 1 – 16.
10. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields virology, vol. 2, 4th edition Philadelphia: Lipincott, Williams, and Wilkins, 2001: 2197 – 2229.

11. Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, et al. Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. *Lab Invest* 2001; 81: 673 – 9.
12. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3 – 8.
13. Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 55- 81.
14. Beutner KR, Tying S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 1997; 102:9-15.
15. zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55 – F78.
16. Brentjens MH, Kimberly A, Yeung-Yue A, et al. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin* 2000; 20: 315 – 331.
17. Dixon EP, Pahel GL, Rocque WJ, et al. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 2000; 270: 345 – 57.
18. Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991; 10: 449 – 57.
19. Hedge RS. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annal Rev of Biophys & Biomol Struct* 2002; 31: 343 – 60.
20. Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* 1995; 69: 7791 -7799.
21. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, et al. Specific interaction between HPV-16 E1 –E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; 352: 824 - 827.

22. Petti L, DiMaio. Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the beta receptor for platelet – derived growthfactor in stably transformed and acutely transfected cells. *J Virol* 1994; 68 3582 - 92.
23. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821 – 8.
24. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, et al. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon – associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001; 75: 4283 - 96.
25. Severson J, Evans TY, Lee P, et al. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and therapy. *J Cutan Med Surg* 2001; 5: 43 – 60.
26. Pfister H and Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 1994; 37: 143 – 149.
27. Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: S18-S26.
28. Chan PKS, Li W-H, Chan MYM, et al. High prevalence of human papillomavirus type 58 in chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol* 1999; 59: 232 – 238.
29. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518 – 27.
30. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328 – 337.
31. Zehbe I, Wilander E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol* 1997; 181: 270 – 275.

32. Evander M, Frazer IH, Payne E, et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71: 2449 – 2456.
33. McMillan A, Ogilvie MM. Human papillomavirus infection. In: McMillan A, Young H (eds.) *Clinical Practice in Sexually Transmissible Infections*. Edinburgh: Saunders, 2002.
34. Kumar, Gupta S. The acetowhite test in genital human papillomavirus infection in men: what does it add? *JEADV* 2001; 15: 27 – 29.
35. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971; 47: 1 – 13.
36. Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus: epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 2000; 20: 235 – 55.
37. Arends MJ, Buckley CH, Wells. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96 – 103.
38. Stoler MH. Human Papillomaviruses and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 16 – 28.
39. Lazo PA. The Molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 80: 2008 – 2018.
40. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, et al. Papillomavirus detection: Demografic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am j Obstet Gynecol* 2000; 182: 257 – 264.
41. Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer – current status: A review. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 945 – 957.
42. Simmons AM, Phillips DH, Coleman DV. Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. *Br Med J* 1993; 306: 1444 – 8.
43. Barton SE, Maddox PH, Jenkins D. Effects of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet* 1988; i: 652 - 4.

44. Moscicki A-B, Ellenberg JH, Vermund SH, et al. Prevalence of and risk for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 127 – 134.
45. Weissenbacher ER, Schneider A, Gissmann L, et al. Approach to diagnostic and therapy of HPV genital infections in women. *ESIDOG* 2001; 4+5 (Suppl 1): 5 – 10.
46. Bonnez W, Reichman RC. Papillomaviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, Douglas R, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease*, 5.edition. New York: Churchill Livingstone, 2000: 1630 – 1644.
47. Majewski S, Malejczyk J, Jablonska S, et al. Natural cell-mediated cytotoxicity against various target cells in patients with epidermodysplasia verruciformis. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 423 – 7.
48. Majewski S, Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus – induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1312 – 18.
49. Lutzner MA, Blanchet-Bardon C, Orth G. Clinical observations, virologic studies, and treatment trials in patients with epidermodysplasia verruciformis, a disease induced by specific human papillomaviruses. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 18S – 25S.
50. Archard HO, Heck JW, Stanley HR, et al. Focal epithelial hyperplasia: an unusual oral mucosal lesion found in Indian children. *Oral Surg* 1976; 20: 201.
51. Rosenberg SK, Reid R. Sexually transmitted papillomaviral infections in the male: I. Anatomic distribution and clinical features. *Urology* 1987; 24: 488 – 494.
52. Scher HI. High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Urol* 1994; 152: 568 -569.

53. Hisada M, Rabkin CS, Strickler HD, et al. Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000; 283: 340 – 341.
54. Frasier LD. Human papillomavirus infections in children (Review). *Pediatrics Annals* 1994; 23: 354 – 360.
55. Obalek S. Condylomata acuminata in children: frequent association with human papillomaviruses responsible for cutaneous warts. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 205 – 209.
56. Obalek S, Jablonska S, Orth G. Warts and HPV-related squamous cell tumors of the anogenital region in children. In: Gross G, von Krogh G, eds. *Human papillomavirus infections in dermatovenerology*. Boca Raton, FI (USA): CRC-Press, 1997: 305 – 14.
57. Myhre AK, Dalen A, Berntzen K, Bratlid D. Anogenital human papillomavirus in non-abused prechool children. *Acta Paediatrica* 2003; 92: 1445 – 52.
58. Johnson RA. Diseases and disorders of anogenitalia of males. U: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, et al, eds. *Dermatology in General Practice*. 4th ed. McGraw-Hill 1993: 1417 – 1462.
59. Wikstrom A. Clinical and serological manifestations of genital human papillomavirus infection. *Acta Dermatol Venereol (Stockh)* 1995; 92: 81 – 85.
60. von Krogh G. HPV-associated genital lesions in the male – clinical evaluation. 12th Meeting of ISSTD and 14th Regional Meeting of the IUSTI. Seville, 1997:67.
61. Skerlev M, Labar B, Bogdanić V, et al. A giant condyloma of Buschke-Löwenstein after allogenic BMT. 21st Annual Meeting of the EBMT and 11th Meeting of the Nurses Group. Davos 1995.
62. Rubben A, Beaudenon S, Favre M, et al. Rearrangements of the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6 can be found in both Buschke-Löwenstein tumor and in condylomata acuminata. *J Gen Virol* 1992; 73: 3147 – 3153.

63. Bergeron C, Nagashfar Z, Canoan C. Human papillomavirus type 16 in intraepithelial neoplasia (bowenoid papulosis) and coexistent invasive carcinoma of the vulva. *J Gynaecol Pathol* 1987; 6: 1 – 8.
64. Obalek S, Jablonska S, Beaudenon S, et al. Bowenoid papulosis of the male and female genitalia: risk of cervical neoplasia. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14: 433-444.
65. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, et al. Epidemiological and clinical aspect of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004; 14: 95 – 105.
66. Huang LW, Chao SL, Chen PH, et al. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *Jour Clin Virol* 2004; 29: 271 – 276.
67. Ljubojević N, Babić S. Preinvazivne promjene donjih dijelova anogenitalnog sustava u žena. U: Lipozenčić J, ur. *Spolno prenosive bolesti i infekcije*. Zagreb: Medicinska naklada, 2003: 62 – 76.
68. Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med Microb & Immunol* 2004; 193: 35 – 44.
69. Wiener JS, Lin ET, Walther PJ. Oncogenic human papillomavirus type 16 associated with squamous cell cancer of the male urethra. *Cancer Res* 1992; 52: 5018 – 5023.
70. Champion MJ. Natural history and clinical manifestations of HPV infection. *Obstet Gynecol* 1988, 14: 363.
71. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytological normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 954 – 960.

72. Svoboda DJ, Kirchner FR, Provd GO. Electron microscopic study of human laryngealpapillomatosis. *Cancer Res* 1963; 23: 1084 – 1089.
73. Kiviat NB, Koutsky LA. Human papillomavirus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington: AMS Press, 1995: 1082 -1089.
74. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 64. Human papillomaviruses. Lyons, France: International Agency for Research on Cancer, 1995.
75. Poljak M, Seme K, Gale N. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Adv Anatomic Pathol* 1998; 5: 216 – 234.
76. Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, et al. Interlaboratory reliability of Hybrid capture . *Am J Clin Pathol* 2004; 22: 238 – 45.
77. Manos MM, Gravitt PE. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Lab Anim Sci* 1993;43:5-10.
78. Reid R, Lorincz AT. Human papillomavirus tests. *Bail Clin Obstet Gyn* 1995; 9: 65 – 103.
79. Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. In: Crum CP, Lorincz AT, eds. *Human Papillomavirus*. New York: Saunders, 1996: 707 – 731.
80. Brandsma JL, Burk RD, Lancaster WD, et al. Inter-laboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 1989; 43: 260 -262.
81. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, et al. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974; 13: 650 – 656.

82. Lorincz AT. Detection of human papillomavirus infection by nucleic acid hybridization. *Obstet Gynecol Clin North Amer* 1987; 14: 451 – 49.
83. McNicol PJ, Guijon FB, Paraskevas M, et al. Comparison in filter in situ deoxyribonucleic acid hybridization with cytologic, colposcopic, and histopathologic examination for detection of human papillomavirus infection in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 265 – 270.
84. Poljak M, Brenčić A, Seme K, et al. Comparative evaluation of first- and second-generation Digene Hybrid Capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 796 – 797.
85. Clavel C, Masure M, Levert M, et al. Human papillomavirus detection by Hybrid Capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9:145-150.
86. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo-nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994;33:379-400.
87. Troffater KF. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* 1997;102:21-27.
88. Williamson AL, Rybicki EP. Detection of genital human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification with degenerate nested primers. *J Med Biol* 1991;33:165-171.
89. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1477-1484.
90. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989;7:209-214.

91. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265: 472 – 477.
92. Bernard H-U, Chan S-Y, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170:1077-1085.
93. Forslund O, Hansson BG, Bjerre B. Typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and non-radioactive reverse dot blot hybridization. *J Virol Methods* 1994; 49: 129 – 140.
94. Venuti A, Badaracco G, Marcante ML. Detection and typing of human papillomavirus by single hybridization. *J Virol Methods* 1995; 51: 115 – 124.
95. Coutlée F, Gravitt P, Richardson H, et al. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1852 -1857.
96. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, et al. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998; 39: 3020 – 3027.
97. Kleter B, van Dorn L-J, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2508 – 2517.
98. Coutlée F, Provencher D, Voyer H. Detection of human papillomavirus DNA in cervical lavage specimens by a nonisotopic consensus PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1973 - 1978.

99. Poljak M, Seme K. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 1996; 56: 231 – 238.
100. Contorni M, Leoncini P. Typing of human papillomavirus DNAs by restriction endonuclease mapping of the PCR products. *J Virol Methods* 1993; 41: 23 – 26.
101. Lungu O, Wright TC Jr, Silverstein S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 145 – 152.
102. Forbes KJ, Bruce KD, Jordens JZ, et al. Rapid methods in bacterial DNA fingerprinting. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 2051 - 2058.
103. Rady PL, Chin R, Arany I, et al. Direct sequencing of consensus primer generated PCR fragments of human papillomavirus. *J Virol Methods* 1993;43:335 - 350.
104. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105: 386 – 93.
105. Gingrich PM. Management and follow-up of abnormal Papanicolaou tests. *Jour Am Med Associat* 2004;59; 54 – 60.
106. Agnantis NJ, Sotiriadis A, Paraskevaïdis E. The current status of HPV DNA testing. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 351 – 6.
107. Franco L. Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *J Nat Canc Inst. Monographs* 2003; 31: 89 – 96.
108. Cuzick J, Beverley E, Ho L, et al. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999; 81: 554 – 558.
109. Snijders P, van den Brule A, Meijer C. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* 2003; 201: 1 – 6.

110. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiologic and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004; 14: 95 – 105.
111. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003; 362: 1871 – 1876.
112. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1941; 42: 192 – 206.
113. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132: 810 – 819.
114. Richart RM. The patient with an abnormal smear: screening techniques and management. *N Engl J Med* 1980; 302: 332 – 334.
115. National Cancer Institute workshop. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *JAMA* 1989; 262: 931 – 934.
116. Gingrich PM. Management and follow-up of abnormal Papanicolaou tests. *J Am Med Wom Associat* 2004; 59: 54 – 60.
117. Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T, et al. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice «Zagreb 2002». Modifikacija klasifikacija «Zagreb 1990» i NCI Bethesda System 2001». *Gynaecol Perinatol* 2003; 12: 148 - 153.
118. Cuzick J. HPV testing in cervical screening. *Sex Transm Inf* 1998; 74: 300 – 1.
119. Jenkins D. Diagnosing human papillomaviruses: recent advances. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 53 – 62.
120. Kyung- Ju L, Jae –Kwan L, Ho-Suk S. Can human papillomavirus DNA testing substitute for cytology in the detection of high-grade cervical lesions? *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 298 – 302.

121. Goodman A. Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12: 11 – 14.
122. Wright TC, Schiffman M, Solomon D, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 304 – 9.
123. Lorincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Path & Lab Med* 2003; 127: 959 – 68.
124. Dalstein V, Riethmuller D, Sautiere JL, et al. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population: benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1225 – 1232.
125. Ljubojević N, Babić S, Audy-Jurković S, et al. Improved National Croatian Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Premalignant Lesions of the Uterine Cervix with Some Cost-Benefit Aspects. *Coll Antropol* 2001; 2: 467.
126. Hinselmann H. Verbesserung der Inspektionmöglichkeiten von Vulva, Vagina und Portio. *Münch Med Wochenschr* 1925; 41: 1733.
127. Stafl A. New nomenclature for colposcopy, report of the Committee on terminology. *Obstet Gynecol* 1976; 48: 123 – 124.
128. Stafl A and Wilbanks GD. An international terminology of colposcopy: Report of the Nomenclature Committee of the International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 313 – 314.
129. Walker P, Dexeus S, De Palo G, et al. International terminology of colposcopy: An updated report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 175 – 177.
130. Colposcopy of the normal cervix. U: Singer A, Monaghan JM. Lower genital tract precancer, colposcopy, pathology and treatment. 2. ed. Oxford: Blackwell Science ltd, 2000; 43 – 70.

131. Skerlev M. Infekcije uzrokovane humanim papiloma i herpes simpleks virusom. *Medicus* 2003; 12: 223 – 229.
132. Ljubojević S, Ljubojević N, Lipozenčić J. Asimptomatske anogenitalne lezije – dijagnoza, klinička slika i liječenje. U: Lipozenčić J, ur. *Spolno prenosive bolesti i infekcije*. Zagreb: Medicinska naklada, 2003: 62 – 76.
133. Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology, and histology. *Obstetrics and Gynecology* 1987;70:299-304.
134. Nicolau SM, Martins NV, Ferraz PE, et al. Importance of peniscopy, oncologic cytology and histopathology in the diagnosis of penile infection by human papillomavirus. *Sao Paulo Med Jour/RPM* 1997; 115: 1330 – 1335.
135. Cates W. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex Transm Dis* 1999; 26: S2 – S7.
136. Baseman JG and Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Jour Clin Virol* 2005; 32S: S16 – S24.
137. Simms I, Fairley CK. Epidemiology of genital warts in England and Wales: 1971 to 1994. *Genitourin Med* 1997; 73: 365 - 367.
138. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women : a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171: 1026 – 1030.
139. van Doornum GJJ, Prins M, Juffermans LHJ, 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; 70: 240 – 6.
140. Grce M, Husnjak K, Božikov J, et al. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* 2001; 21: 579 – 584.

141. Grce M, Husnjak K, Magdić L, et al. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 645 – 651.
142. Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozenčić J, Pavelić K. Detection and typing of human papillomavirus by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res* 2000; 20: 2097 – 2102.
143. Vince A, Ivanišević M, Harni V, Skalko D, Jeren T. *J Clin Virol* 2001; 20: 91 – 94.
144. Wikström A, Popescu C, Forslund O. Asymptomatic penile HPV infection: a prospective study. *Int Jour of STD & AIDS* 2000; 11: 80 – 84.
145. Bollen LJM, Tjong-A-Hung SP, Van der Velden J, et al. Clearance of cervical human papillomavirus infection by treatment for cervical dysplasia. *Sex Transm Dis* 1997; 24: 456 – 460.
146. Nicolau SM, Camarago CGC, Stavale JN, et al. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. *Urology* 2005; 65: 251 – 255.
147. 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; 67: 291 – 296.
148. Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology and histology. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 299 – 304.
149. Levine RU, Crum CP, Herman E, et al. Cervical papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a study of male sexul partners. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 19 – 20.
150. Petry K-U, Menton S, Menton M, et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cncer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer* 2003; 88: 1570 – 1577.

151. Hsing-Pei L, Yang-Yan H, Hsueh-Yin W, Jau-Tsuen K. Method for testing for human papillomavirus infection in patients with cervical intraepithelial disease. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 366 – 368.
152. Stoler MH. Testing for human papillomavirus: data driven implications for cervical neoplasia management. *Clin Lab Med* 2003; 23: 569 – 583.
153. Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, et al. Human papillomavirus- the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1996; 65: 601 - 606.
154. Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, et al. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction is age-dependent. *Int J Cancer* 1993; 53: 919 – 23.
155. Meijer CJLM, Van De Brule AJC, Snijders PJF, et al. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. *In: The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus*, pp. 271-281, International Agency for Research on Cancer, Lyon (1992).
156. Rozendaal L, Walboomers JMM, Van Der Linden JC, et al. PCR- based high risk HPV test in cervical-cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer* 1996;68: 766 - 769.
157. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 1272 – 1278.
158. Nidl I, Lotz B, Kühne-Heid R, et al. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1999; 52: 17 – 22.

159. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20 – 25.
160. Torroella-Louri M, Morsberger S, Carrillo A, et al. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncil* 1997; 70: 115 – 120.
161. Tachezy R, Hamšíkova E, Hajek T, et al. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV 16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol* 1999; 58: 378 – 386.
162. Marin I. Rasproeditve genotipov humanih virusov pailoma pri ženskah v Sloveniji (magistarski rad). Ljubljana, Slovenija: Univerza v Ljubljani; 2001, str. 69 - 84.
163. Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, et al. Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade: a study on 476 Stockholm women, using PCR for detection and typing of HPV. *Hum Pathol* 1997; 28: 899 - 904
164. De Francesko MA, Gargiulo F, Schreiber C, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples for Italian patients. *J Med Virol* 2005; 75: 588 – 592.
165. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63 – 73.
166. Gonzales-Losa Mdel R, Rosado-Lopez I, Valdez-Gonzales N, Puerto-Solis M. High prevalence of papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *Clin Virol* 2004; 29; 202 – 205.
167. Chan PKS, Wai-Hon L, Chan MYM, et al. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol* 1999; 59: 232 – 238.

168. Lia HC, Sun CA, Yu MH, et al. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papillomavirus type 58 and related types. *Int J Cancer* 1999; 84: 553 – 557.
169. Jacobs MV, Walboomers JMM, Snijders PJF, et al. Distribution of 37 musosotropic HPV types in women with cytologically nomal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000; 87: 221 – 227.
170. Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, et al. Occurence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 581 - 587.
171. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004; 57: 67 – 72.
172. Skerlev M. Genotipovi humanog papiloma virusa u klinički promijenjenoj koži i sluznici genitalne regije muškaraca. (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1998.
173. Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozenčić J and Pavelić K. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Research* 2000; 20: 2097 - 2102.
174. Grce M, Magdić L, Kocijan I and Pavelić K. Increase of genital human papillomavirus infection among men and women in Croatia. *Anticancer Research* 1996; 16: 1039-1042.
175. 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; 20: 173 – 178.

176. Lehtinen M, Paavonen J. Effectiveness of preventive human papillomavirus vaccination. *Int J STD & AIDS* 2003; 14: 787 – 792.
177. Beutner KR, Wiley DJ, Douglas JM, et al. Genital warts and their treatment. *Clin Infect Dis* 1999; 28: S37 – S56.
178. Jung WW, Chun T, Sul D, et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol* 2004; 42: 255 – 266.
179. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005; 23: 2388 – 2394.
180. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347: 1645 – 1651.
181. Harper DM, Franco, Wheeler CM, et al. 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; 364: 1757 – 1765.
182. Pagliusi SR, Aguado MT. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23: 569 – 578.
183. Stern PL. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol* 2005; 32S: S72 – S81.
184. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12 – 19.
185. Molijn A, Kleter B, Quint W, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Jour Clin Virol* 2005; 32S: S43 – S51.
186. Bosch FX and de Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003 (31): 3 – 13.
187. Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84 (6): 394 – 398.

188. Barrasso R, de Brux J, Croissant O, Orth G. High prevalence of human papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 1987; 317: 916 – 923.
189. Hippelainen MI, Yliskoski M, Syrjanen S, et al. Low concordance of genital human papillomavirus (HPV) lesions and viral types in HPV – infected women and their male sexual partners. *Sex Transm Dis* 1994; 21: 76 -82.
190. Weaver BA, Feng Q, Holmes KK, et al. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis* 2004; 189: 677 – 685.
191. Fife KH, Coplan PM, Jansen KU, et al. Poor sensitivity of polymerase chain reaction assays of genital skin swabs and urine to detect HPV6 and 1 DNA in men. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 246 – 248.
192. Rosenblatt C, Lucon AM, Pereyra EA, Pinotti JA, Arap S, Ruiz CA. HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 84: 156 – 161.
193. Rotola A, Costa S, Monini P, et al. Impact of sexual habits on the clinical evaluation of male HPV infection. *Eur J Epidemiol* 1994; 10: 373 -380.
194. Franceschi S, Castellsague X, Dal Maso L, et al. Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. *Br J Cancer* 2002; 705 – 711.
195. Kay P, Meehan K and Williamson A-L. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomavirus in samples containing low number of viral DNA. *Jour Virol Methods* 2002; 105: 159 – 170.
196. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *Jour Virol Methods* 2000; 88: 125 – 134.

197. Melchers WJ, Schiff R, Stolz E, et al. Human papillomavirus detection in urine samples from male patients by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1711 – 1714.
198. Golijow CD, Perez LO, Smith JS, et al. Human papillomavirus DNA detection and typing in male urine samples from a high-risk population from Argentina. *J Virol Methods* 2005; 124: 217 – 220.
199. Castellsague X, Bosch X, Munoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 2002; 346: 1105 – 1112.
200. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess* 1999; 3: 1 – 201.
201. van Ham MA, Melchers WJ, Hanselaar AG, et al. Fluctuations in prevalence of cervical human papillomavirus in women frequently sampled during a single menstrual cycle. *Br J Cancer* 2002; 87: 373 -6.
202. Harper DM, Longacre MR, Noll WW, et al. Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. *Ann Fam Med* 2003; 1: 221 -7.
203. Quint WGV, Scholte G, van Doorn LJ, et al. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF10 PCR and HPV genotyping. *J Pathol* 2001; 194: 154 – 8.
204. Jacob MV, Snijders PJ, van de Brule AJ, et al. A general primer GP5+/GP6+ - mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk humanpapillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 791 -795.
205. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 485 – 90.

206. Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357: 1831 – 6.
207. Marin I. Rasporeditev genotipov humanih virusov pailoma pri ženskah v Sloveniji (magistarski rad). Ljubljana, Slovenija: Univerza v Ljubljani; 2001, str.44.
208. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess* 1999; 3: 1 – 201.
209. Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ, et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001; 84: 79 – 801.
210. Konya J, Veress G, Juhasz A, et al. Additional human papillomavirus types detected by the Hybrid Capture Tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *Jour Clin Microbiol* 2000; 38: 408 – 411.
211. Peyton CL, Schiffman M, Lörincz AT, et al. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detections systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3248 – 54.
212. Yamazaki H, Sasagawa T, Basha W, et al. Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Papanicolaou smears. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 962 – 6.
213. Poljak M, Marin I, Seme K, et al. Hybrid Capture II HPV test detect at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *Jour Clin Virol* 2002; 25: S89 – S97.
214. HC2 (product insert). Hybrid Capture 2 DNA Test, L0838 vol. Gaithersburg, Md; Digene Corp; 2002:49.
215. Kado S, Kawamata Y, Shino Y, et al. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic Polymerase chain reaction primers 2001; 81: 47 – 52.

216. Struelens MJ et al. Consensus guidelines for microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2: 2 – 11.
217. Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of Human Papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3388 – 93.
218. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, et al. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 1999; 82: 203 - 207.
219. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al. Asian – American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case – control study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1325 – 30.
220. del Refugio Gonzales-Losa M, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solis M, et al. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *Jour Clin Virol* 2004; 29: 95 - 98.
221. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, et al. Genomic diversity of human papillomavirus- 16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* 2004; 319: 315 – 23.
222. Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, et al. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infected the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med Virol* 2005; 75: 213 – 21.
223. Chang CH, Chen TH, Hsu RC, et al. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. *J Clin Virol* 2005; 32: 33 – 7.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1958. godine u Karlovcu gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u srpnju 1982. godine. Specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije s parazitologijom započela sam 1987. godine za Klinički bolnički centar Zagreb. Specijalistički ispit položila sam 1992. godine. Nakon specijalizacije ostala sam raditi u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb kao specijalist mikrobiolog. Sada sam voditelj Laboratorija za kliničku mikrobiologiju, klamidije i mikoplazme.

Na Medicinskom fakultetu završila sam poslijediplomski studij iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom. Magistrirala sam 1996. godine s temom « Učestalost dubokih klamidijских infekcija u našoj populaciji i njihov utjecaj na fertilitet».

Sudjelujem u postdiplomskoj nastavi iz medicinske mikrobiologije, dermatovenerologije i urologije. Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju u kojem sam više godina bila tajnica. Sudjelovala sam u organizaciji raznih simpozija i kongresa u Hrvatskoj. Sudjelujem na projektima Ministarstva znanosti i tehnologije RH.

Kao autor i koautor objavila sam više stručnih i znanstvenih radova. Doktorsku sam disertaciju prijavila 2003. godine.