Genotipizacija humanih papilomavirusa

Škara, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:180586

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Škara

Genotipizacija humanih papilomavirusa

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Odjelu za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, pod vodstvom Dr. sc. Snježane Židovec Lepej, više znanstvene suradnice, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Najljepše se zahvaljujem Dr. sc. Snježani Židovec Lepej na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da izradim ovaj rad. Posebno Vam hvala na savjetima i podršci tijekom pisanja rada.

Prof. dr. sc. Nadi Oršolić puno hvala na stručnim savjetima.

Svim članovima Odjela za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku najljepše zahvaljujem na pomoći, strpljenju i razumijevanju.

Ana

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genotipizacija humanih papilomavirusa

Ana Škara

Odjel za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“

Mirogojska 8, Zagreb, Hrvatska

Humani papilomavirusi (rod: *Alpha-papillomavirus*, porodica: *Papillomaviridae*) su heterogena skupina DNK virusa koji imaju značajnu ulogu u nastanku benignih i malignih novotvorina višeslojnog pločastog epitela. Cilj ovog rada bio je analizirati učestalost detekcije genotipova HPV-a koji su povezani s visokim odnosno niskim rizikom od nastanka raka vrata maternice u obriscima cerviksa žena koje se kontroliraju u ambulanti za urogenitalne infekcije kliničke bolnice. U dijelu uzoraka koji su bili pozitivni u kvalitativnom testu na HPV DNK odredila sam pojedinačne genotipove HPV-a i analizirala njihovu distribuciju. Metodom reverzne hibridizacije (hybrid capture 2 test) određivala sam prisutnost genotipova HPV-a koji su povezani s visokim odnosno niskim rizikom od nastanka raka vrata maternice. U radu sam koristila grupne hibridizacijske probe za visokorizične genotipove HPV-a (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) i niskorizične genotipove (6, 11, 42, 43, 44). Identifikaciju pojedinh genotipova HPV-a u uzorcima koji su prethodno bili pozitivni u kvalitativnom hibridizacijskom testu na HPV DNK odredila sam kombinacijom PCR-a i reverzne hibridizacije. Nakon izolacije DNK, PCR reakcijom umnožen je dio L1 regije HPV DNK a nakon toga je provedena reverzna hibridizacija primjenom oligonukleotidnih proba vezanih na nitrocelulozne membrane. Rezultati kvalitativne analize visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a pokazali su da je HPV DNK bila detektirana u 178 od 429 ispitanica (41.4%). Individualna genotipizacija HPV-a pokazala je da su HPV-16 i HPV-31 najučestaliji genotipovi HPV-a u uzorcima koje sam analizirala u ovom radu.

(35 stranica, 6 slika, 4 tablice, 32 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u biblioteci na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6

Ključne riječi: humani papilomavirusi, rak vrata maternice, cervikalna intraepitelijalna neoplazija, reverzna hibridizacija, lančana reakcija polimeraze

Voditelj: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, viši znanstveni suradnik
Suvoditelj: dr. sc. Nada Oršolić, prof.

Ocijenitelji: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, viši znanstveni suradnik
dr. sc. Nada Oršolić, prof.
dr.sc. Željka Vidaković-Cifrek, doc.
dr.sc. Mirjana Kalafatić, prof.

Rad prihvaćen: 03.06.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Human papillomavirus genotyping

Ana Škara

Department of Cellular Immunity and Molecular Diagnostics of the University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljevic“

Mirogojska 8, Zagreb, Hrvatska

Human papillomaviruses are a heterogenous group of DNA viruses that have significant role in appearance of benign and malignant neoplasm in multilayer epithelium. The purpose of this work was to analyze a frequency in detection of HPV genotypes related to high-risk and low-risks of cervix cancer formation in cervical swabs. The specimens were collected from women attending the Outpatient Clinics for Urogenital infections of University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljevic". For specimens that were positive on the HPV DNA qualitative test, individual HPV genotypes were determined and their distribution was analysed. Using a Hybrid Capture 2 test, the presence of HPV genotypes associated with high-risk or low-risk for the development of cervical cancer was analysed. Hybridization probes specific for high-risk HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), and low-risk genotypes (HPV 6, 11, 42, 43, 44) were used in this study. In specimens that were previously positive by HPV DNA qualitative hybridization test, individual HPV genotypes were identified by combining PCR and reverse hybridization. Following DNA isolation, a part of L1 region of the HPV DNA was amplified by PCR reaction. In the next step, the reverse hybridization and oligonucleotide probes were used. These probes were attached to nitrocellulose membranes. The results of the qualitative analysis of high-risk and low-risk HPV genotypes showed that HPV DNA was detected in 178 of 429 women (41.4%). Individual HPV genotyping showed that HPV-16 and HPV-31 were the most frequent HPV genotypes in analyzed specimens.

(35 pages, 6 figures, 4 tables, 32 references, original in Croatian language)

Thesis is deposited in the library at the Department of Biology, Faculty of Science, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Keywords: human papillomaviruses, cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia, reverse hybridization, polymerase chain reaction

Supervisor: Dr. Snježana Židovec Lepej, Senior research associate
Co-supervisor: Dr. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. Snježana Židovec Lepej, Senior research associate
Dr. Nada Oršolić, Prof.
Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.
Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.

Thesis accepted: 03.06.2009.

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. RAK VRATA MATERNICE 2

1.2. EPIDEMIOLOŠKA KLASIFIKACIJA HPV-A TEMELJEM POVEZANOSTI S RIZIKOM OD NASTANKA RAKA VRATA MATERNICE 3

1.3. ORGANIZACIJA GENOMA HPV-A 4

1.4. CITOLOŠKE PROMJENE STANICA VRATA MATERNICE KOJE SU POVEZANE S VIRUSOM HPV-A 7

1.5. DIJAGNOSTIKA AKTIVNE HPV INFEKCIJE TEMELJI SE NA DETEKCIJI VIRUSNE NUKLEINSKE KISELINE MOLEKULARNIM METODAMA 9

1.5.1. Direktni hibridizacijski testovi 10

1.5.2. PCR 11

1.6. PROFILAKTIČKA CJEPIVA PROTIV HPV-A 14

1.7. LIJEČENJE 15

1.8. CILJ ISTRAŽIVANJA 16

2. MATERIJALI I METODE 17

2.1. ISPITANICI 17

2.2. BIOLOŠKI UZORCI 17

2.3. KVALITATIVNA DETEKCIJA HPV DNK VISOKORIZIČNIH I NISKORIZIČNIH GENOTIPOVA PRIMJENOM REVERZNE HIBRIDIZACIJE 17

2.3.1. Priprema reagensa 17

2.3.2. Denaturacija 18

2.3.3. Hibridizacija 18

2.3.4. Zarobljavanje hibrida 19

2.3.5. Detekcija hibrida 19

2.3.6. Ispiranje 19

2.3.7. Pojačavanje signala 19

2.3.8. Interpretacija rezultata 19

2.4. INDIVIDUALNA HPV GENOTIPIZACIJA 20

2.4.1. Izolacija HPV DNK 20

2.4.2. PCR umnažanje HPV DNK 20

2.4.3. HPV genotipizacija korištenjem PCR-a i reverzne hibridizacije 21

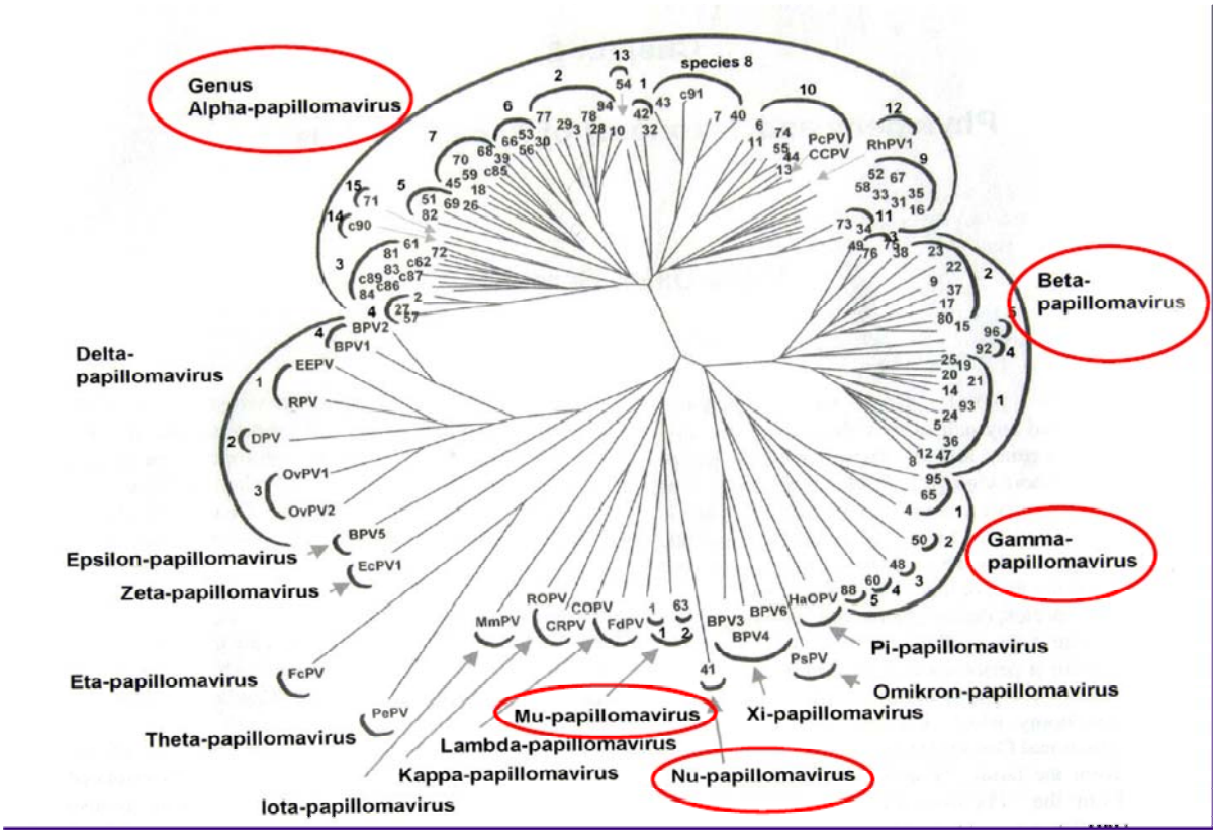
2.5. STATISTIČKE METODE 22

3. REZULTATI 23

3.1. KVALITATIVNA DETEKCIJA HPV DNK KORIŠTENJEM REVERZNE HIBRIDIZACIJE 23
3.1.1. Kliničke i citološke dijagnoze ispitanica s pozitivnim rezultatima detekcije HPV DNK u obriscima cerviksa 24
3.1.2. Detekcija HPV DNK u različitim dobnim skupinama 25
3.2. INDIVIDUALNA HPV GENOTIPIZACIJA 26
3.2.1. Rezultati individualne genotipizacije HPV-a u ispitanica s citološkom dijagnozom ASCUS-a 27
4. RASPRAVA 29
5. ZAKLJUČAK 31
6. LITERATURA 32

1. UVOD

Humani papilomavirusi (HPV) pripadaju rodu *Alpha-papillomavirusa*, te porodici *Papillomaviridae*. Oni su heterogena skupina DNK virusa koji imaju značajnu ulogu u nastanku benignih i malignih novotvorina višeslojnog pločastog epitela. (Lowy i Schiller, 2006). Francis Peyton Rous je 1935. godine otkrio HPV na animalnim modelima zečeva (Rous i Beard, 1935) kao skupinu virusa koja inficira epitel kože i sluznice gdje zatim uzrokuju dobroćudne lezije. Za otkriće i potvrdu povezanosti humanih papilomavirusa s rakom vrata maternice zaslužan je Harald zur Hausen. On je uočio da su humani papilomavirusi odgovorni za neoplastičnu transformaciju epitela vrata maternice (zur Hausen 1977 i 1988). Harald zur Hausen je za svoje otkriće povezanosti HPV-a s nastankom raka vrata maternice dobio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju 2008. godine. Klasifikacija papilomavirusa temelji se na L1 regiji genoma (Slika 1).



Slika 1. Klasifikacija HPV virusa. Preuzeto s Ethel-Mischele de Villiers i sur. (2004).

Infekcije HPV-om najčešće se prenose spolnim putem, ali i drugim vrstama kontakta s kože na kožu različitih osoba. Infekcija HPV-om vrlo je česta, te se većina spolno aktivnih osoba zarazi barem jednim genotipom HPV-a tijekom života. Žene koje su imale jednog spolnog partnera imaju rizik od 46% da će biti zaražene virusom HPV-a tri godine nakon prvog seksualnog odnosa (Tovar i sur. 2008). Obzirom na to da nakon zaraze HPV-om nema neposrednih općih simptoma većina osoba nije svjesna postojeće infekcije što pridonosi širenju virusa među partnerima (Tovar i sur. 2008). Većina žena (oko 90%) spontano će eliminirati virus u razdoblju od 6 do 18 mjeseci zahvaljujući imunološkom sustavu inficirane osobe (Schiffman i sur. 2007). Danas je na molekularnoj razini karakterizirano oko 130 različitih genotipova HPV-a, a 40-ak genotipova inficira područje genitalnih organa. Navedeni genotipovi su razvrstani u genotipove koji su povezani s visokim odnosno niskim rizikom od nastanka raka vrata maternice (tzv. visokorizični i niskorizični genotipovi). Niskorizični genotipovi HPV-a uzrokuju dobroćudne lezije koje najčešće ne transformiraju u maligne tvorbe. Visokorizični genotipovi HPV-a imaju visok onkogeni potencijal (Boulet i sur. 2008). Pronalaskom sekvence genoma HPV-a u 99,7% slučajeva raka vrata maternice potvrđena je zur Hausenova hipoteza o HPV-u kao obveznom kofaktoru u neoplastičnoj transformaciji epitela vrata maternice (López-Revilla i sur. 2008).

1.1. RAK VRATA MATERNICE

Rak vrata maternice, s oko 500 000 novih slučajeva te 250 000 smrti godišnje, drugi je po učestalosti rak u žena u svijetu, nakon raka dojke, od kojih 80% slučajeva bilježe zemlje u razvoju (Milutin-Gašperov i sur. 2007). U Africi, Srednjoj i Južnoj Americi i jugoistočnoj Aziji rak vrata maternice predstavlja 20 do 30% od ukupnog broja zloćudnih tumora. Suprotno tome, u Sjevernoj Americi, Australiji te sjevernoj i zapadnoj Europi rak vrata maternice čini 4 do 6% od ukupnog broja zloćudnih tumora u žena. U Europi, uključujući i Hrvatsku, rak vrata maternice je na osmom mjestu po učestalosti zloćudnih karcinoma u žena (Ferlay i sur. 2004). Rak vrata maternice ozbiljan je zdravstveni problem u svijetu, ali i u Europi, s oko 50 000 oboljelih žena godišnje, te oko 25 000 umrlih. Osim toga, više od 175 000 žena u Europi živi s rakom vrata maternice u određenoj fazi bolesti. Oboljenje i smrt od raka vrata maternice veći su u zemljama istočne Europe, u kojima se već godinama provode organizirani programi ranog otkrivanja bolesti (Znaor i Strnad, 2007).

Rizik od razvoja raka vrata maternice povećava se ranim početkom seksualne aktivnosti, povećanjem broja seksualnih partnera, dugotrajnim korištenjem oralne kontracepcije i pušenjem.

Od zaraze HPV-om do nastanka karcinoma prolazi dug vremenski period (procjenjuje se najmanje 8 godina). Nastanku raka prethodi nastanak cervikalnih lezija koje nazivamo cervikalnim intraepitelijalnim neoplazijama stupnja I, II i III (CIN). CIN I, II ili III najčešće se javlja u dobi od 25 do 35 godina, dok se invazivni rak vrata maternice najčešće pojavljuje u dobi od 35 do 55 godina. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Hrvatska bilježi godišnje oko 350 slučajeva oboljelih i 100 slučajeva smrti od raka vrata maternice (HZJZ 2009). U Hrvatskoj je rak vrata maternice rijetkost prije 20. godine života, a najčešće se javlja između 30. i 49. godine života. Prosječna dob u kojoj se javlja CIN je 27 godina. Za karcinome *in situ* najviša učestalost je u dobi od 37 godina, a za invazivni rak 47 godina.

Probir na rak vrata maternice, odnosno otkrivanje stadija prije raka trenutačno se zasniva na Papa-testu, čime se značajno smanjila smrtnost od raka vrata maternice (Arbyn i sur. 2007). U Hrvatskoj se provodi oportunistički probir tj. analiziraju se uzorci žena koje dolaze na ginekološke preglede. U brojnim zemljama Europske unije koje imaju vrlo nisku incidenciju raka vrata maternice (npr. Finska) provode se organizirani programi probira tijekom kojih se žene određene dobne skupine pozivaju na preglede (putem pisama i dr.). Organiziranim programima probira koji aktivno potiču žene na kontrole Papa-testom postižu se odlični rezultati u prevenciji raka vrata maternice.

1.2. EPIDEMIOLOŠKA KLASIFIKACIJA HPV-A TEMELJEM POVEZANOSTI S RIZIKOM OD NASTANKA RAKA VRATA MATERNICE

Obzirom na rizik od nastanka raka vrata maternice, genotipove HPV-a dijelimo na visokorizične i niskorizične genotipove. U visokorizične genotipove ubrajamo HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82 (HZJZ 2009). Oni su odgovorni za nastanak više od 99% raka vrata maternice. Osim raka vrata maternice, visokorizični genotipovi uzrokuju zloćudne promjene i drugih organa kao što su rak stidnice, rodnice, penisa i anusa. Posebnost ovih genotipova je u tome što se oni uvijek ugrađuju u genom stanice koju inficiraju. Visokorizični genotipovi prisutni su u 74% uzoraka žena s CIN-om I i u oko 84% žena s CIN II i CIN III (van Hamont i sur. 2006).

Genotip HPV-a 16 je najučestaliji onkogeni genotip HPV-a u svijetu, a nalazi se u 50 do 60% slučajeva raka vrata maternice. Genotip HPV-a 18 drugi je po učestalosti u svijetu, a nalazi se u 15 do 20% slučajeva raka vrata maternice (Castle i sur. 2008). Genotipovi HPV-18 i HPV-45 češće su povezani s adenokarcinomima vrata maternice. Genotip HPV-16 pokazuje posebno visok onkogeni potencijal. Kod žena zaraženih genotipom HPV-16 rizik od razvoja CIN-a iznosi čak 40% u razdoblju od 3 do 5 godina (Clifford i sur. 2003).

U niskorizične genotipove HPV-a ubrajamo HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108 (HZJZ 2009). Oni su odgovorni za nastanak više od 95% genitalnih bradavica i laringealnih papiloma.

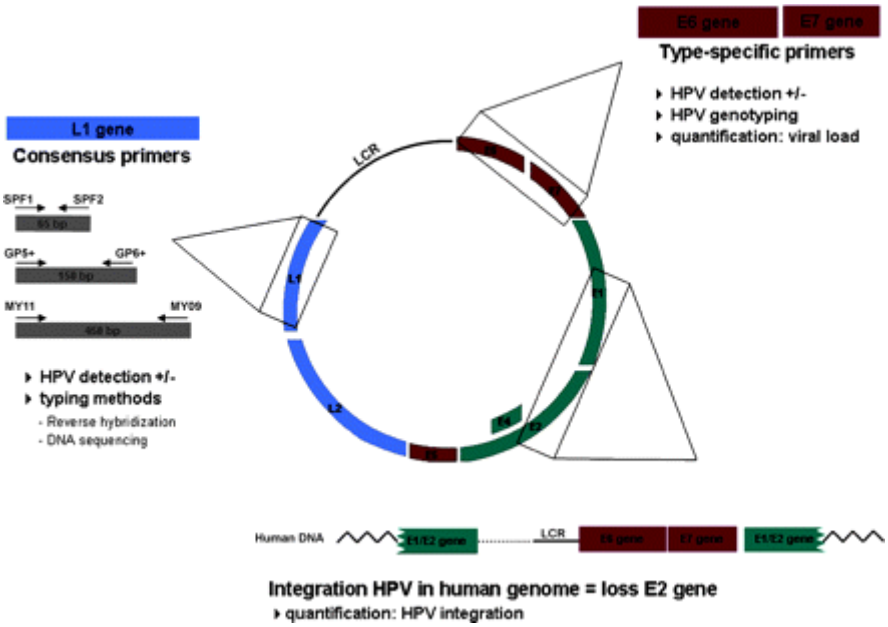
Genitalne bradavice (šiljasti kondilomi) su dobroćudne tvorevine koje se javljaju na unutrašnjem ili vanjskom području spolnih organa i oko anusa. Mogu se pojaviti nekoliko tjedana ili mjeseci nakon seksualnog odnosa sa zaraženom osobom. Kondilomi mogu biti i gotovo nevidljive glatke izrasline ali pojavljuju se i u obliku velikih grozdastih tvorbi (Tovar i sur. 2008). Uspješno se liječe, no ponekad je liječenje potrebno ponoviti nekoliko puta kako bi se promjene odstranile. U rijetkim slučajevima zahtjevaju kirurško uklanjanje (Saslow i sur. 2007).

Laringealni papilomi uglavnom nastaju kod osoba mlađih od 18 godina i opisuju se kao dobroćudni tumori koji mogu izazvati smetnje dišnog sustava. Zbog učestalog ponovnog pojavljivanja najčešće ih je potrebno nekoliko puta kirurški ukloniti. U iznimno rijetkim slučajevima ovaj dobroćudni oblik može prijeći u zloćudni oblik koji zahvaća ždrijelo i bronhe. Ove tvorbe uzrokovane su virusima HPV-a i to genotipovima HPV-a 6 i 11 (Saslow i sur. 2007).

Moguća je koinfekcija s više različitih genotipova istovremeno, odnosno koinfekcija s visokorizičnim i niskorizičnim genotipovima HPV-a.

1.3. ORGANIZACIJA GENOMA HPV-A

Genom HPV-a čini dvolančana, kružna DNK molekula veličine 7 904 pb. Možemo ga podijeliti na „rane“ i „kasne“ okvire čitanja (ORF-open reading frames). „Rani“ okviri čitanja kodiraju proteine koji su uključeni u regulaciju replikacije DNK (E1 i E2), ali kodiraju i proteine koji imaju sposobnost transformacije (E6 i E7) (Dehn i sur. 2007). Uloga proteina E4 i E5 nije poznata. „Kasni“ okviri čitanja kodiraju strukturne proteine koji tvore virusnu kapsidu (L1 i L2) (Lowy i Schiller 2006). Kapsida je proteinska ovojnica koja obavija nukleinsku kiselinu i štiti je od djelovanja enzima stanice (Slika 2).



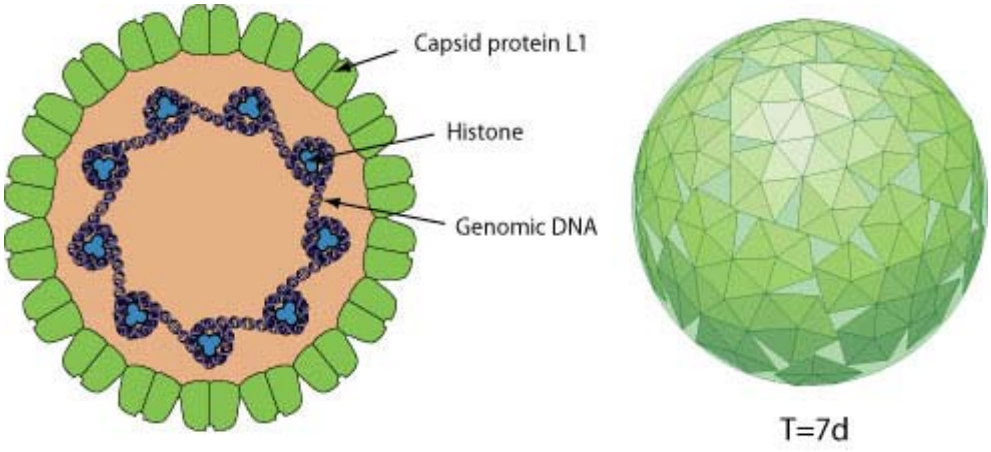
Slika 2. Organizacija genoma HPV-a. Preuzeto iz Boulet i sur. (2008).

Genom visokorizičnih genotipova HPV-a se ugrađuje u genom stanice domaćina i taj događaj se smatra ključnim za transformaciju stanica domaćina u zloćudan oblik. Samo mali broj integrirane HPV DNK nije metiliran i može uzrokovati visoku ekspresiju proteina E6. Integracija rezultira transkripcijom ljudske sekvence u vrlo dugu mRNK koja zatim daje stabilan produkt, vrlo dugi protein E6. Osim toga, integracija rezultira i delecijom okvira čitanja E1 i E2, dok okviri čitanja E6 i E7 ostaju netaknuti. S obzirom da protein E2 djeluje kao represor na ekspresiju E6 i E7 tako što se veže na promotorsko mjesto tih gena, integracija će uzrokovati povećanje transkripcije tih onkogena. Onkoproteini E6 i E7 imaju važnu ulogu u zloćudnoj transformaciji i u takvim zloćudnim tkivima njihova ekspresija je neprestana (Andersson i sur. 2006). Povećana ekspresija onkoproteina E6 dovodi do degradacije proteina p53 koji djeluje kao regulator staničnog ciklusa. Degradacija se događa kroz posredovanje ubikvitina i rezultira nekontroliranim staničnim ciklusom. S druge strane, onkoprotein E7 se veže i uzrokuje degradaciju gena Rb (retinoblastoma) te tako uzrokuje prekid regulatornog puta staničnog ciklusa Rb ciklinD/p16^{INK4a} (Dehn i sur. 2007).

Detaljna molekularna analiza staničnih promjena u predstadiju raka maternice otkriva povećanu ekspresiju p16 ^{INK4a} (inhibitor kinaze ovisan o ciklinu), a on predstavlja dokaz aktivne ekspresije onkogena E7. p16^{INK4a} je uključen u regulaciju staničnog ciklusa i njegova povećana ekspresija je u skladu s degradacijom gena Rb.

U normalnim, netransformiranim stanicama, ekspresija $p16^{INK4a}$ je vrlo niska, ali za vrijeme stresnih uvjeta njegova ekspresija lagano raste. U normalnim, tj. netransformiranim stanicama pronađena je i ekspresija E6 i E7 mRNK što govori da virus može biti prisutan u stanicama vrata maternice naprežući svoju onkogensku aktivnost prije nego što je moguće histološki vizualizirati promjenu stanica, a to podupire teoriju da je stvarno dug vremenski period do pojave stanične abnormalnosti (Andersson i sur. 2006).

Uloga ugradnje genoma visokorizičnih genotipova HPV-a u genom stanice domaćina je dakle delecija okvira čitanja E1 i E2, čime se oni oslobađaju s promotorskih mjesta E6 i E7 te prestaju djelovati kao represori tih gena. Taj događaj zatim dovodi do povećane ekspresije onkogena E6 i E7 a to uzrokuje zloćudnu transformaciju stanica (Arias-Pulido i sur. 2006).
Virioni HPV-a imaju 72 kapsomere promjera 52 do 55 nm (Slika 3).



Slika 3. Izgled viriona HPV-a. Preuzeto s www.expasy.ch/…/complete_by_species/189.html.

1.4. CITOLOŠKE PROMJENE STANICA VRATA MATERNICE KOJE SU POVEZANE S VIRUSOM HPV-A

Najuspješnija metoda za prevenciju raka vrata maternice je oportunistički probirni program koji koristi citologiju vrata maternice, a trenutačno se zasniva na Papa-testu. Cilj probira na rak vrata maternice je rano otkrivanje, dijagnoza i liječenje predstadija raka vrata maternice, kao i raka vrata maternice (Saslow i sur. 2007).

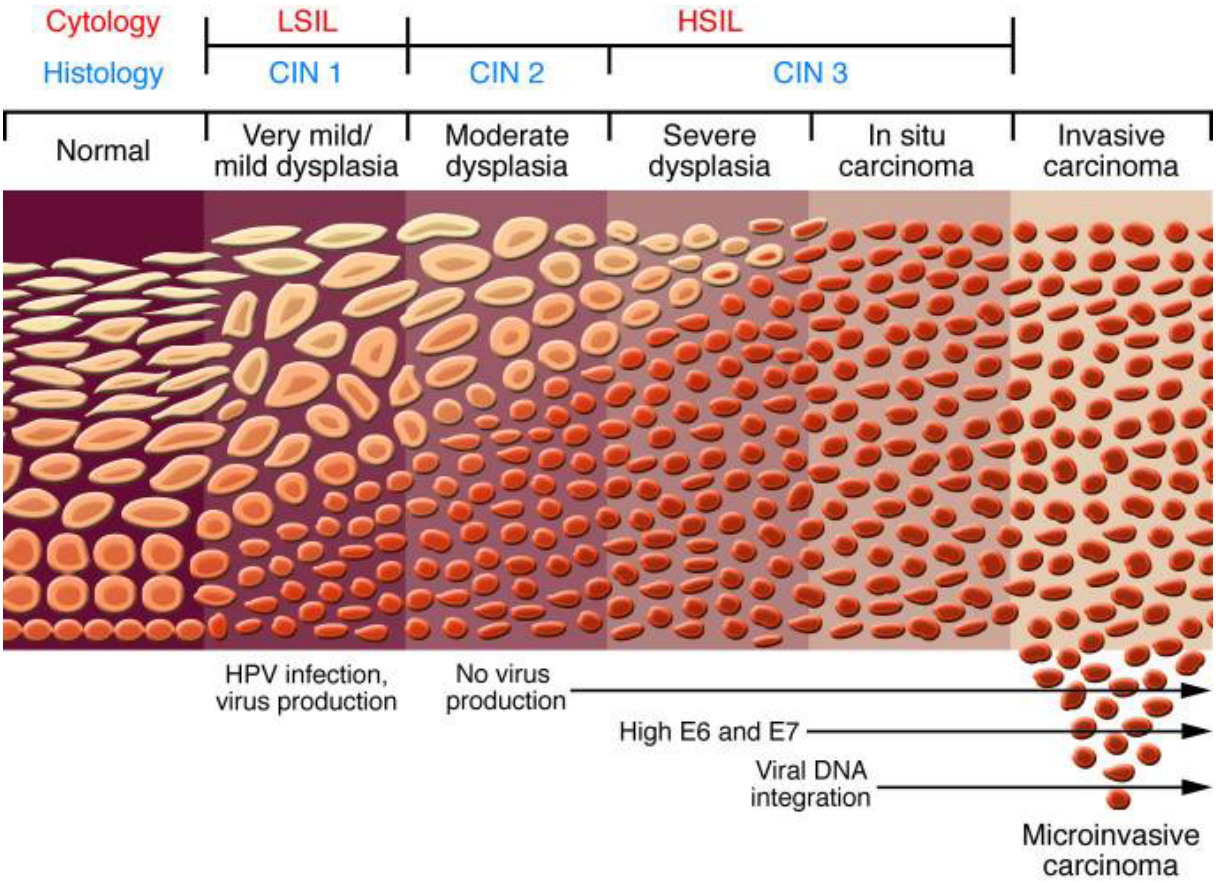
Osjetljivost Papa-testa iznosi najviše 80% ako Papa-test analizira specijalist citolog ili citopatolog u redovito vrijeme uz poštivanje normativa i u ovlaštenom citodijagnostičkom laboratoriju koji primjenjuje postupke dobre laboratorijske prakse. Kada su svi navedeni uvjeti ispunjeni, rizik lažno negativnog nalaza Papa-testa iznosi najmanje 20%. To u praksi znači da u najboljem slučaju svaka peta žena s premalignim promjenama na vratu maternice može dobiti uredan nalaz Papa-testa.

Jedino se primjenom HPV DNK testa s Papa-testom uspjelo značajno smanjiti rizik lažno negativnog nalaza u probiru zdravih žena. Primjenom oba testa istovremeno zadržava se specifičnost Papa-testa kao indirektnog pokazatelja djelovanja virusa na stanice, a osjetljivost se povećava na više od 97% zahvaljujući naprednijoj tehnologiji HPV DNK testa. Rizik lažno negativnog nalaza iznosi manje od 3% ako se koristi DNK PCR (Polymerse Chain Reaction) umnažanje(Bastić-Ban 2006).

Ukoliko je nalaz Papa-testa pozitivan, sljedeći korak je kolposkopija kojom se vrši direktan pregled vrata maternice. Iako se kolposkopija smatrala idealnom metodom za prevenciju raka vrata maternice, nedavna istraživanja pokazala su da ova metoda može pogriješiti za 33 do 50%, odnosno toliko bolesti visokog stupnja neće biti uočeno (Dehn i sur. 2007).

Obzirom na citološki nalaz razlikujemo nekoliko tipova promjena epitela. Jedan tip promjena su atipične stanice neodređenog značaja (ASCUS - Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) koje nisu još patološke stanice, ali mogu nastati kao posljedica infekcije ili čak bez nje, kao preteča promjena koje vode k CIN I. Drugi tip promjena su cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN) koje predstavljaju potencijalno premalignu transformaciju i abnormalan rast stanica na površini vrata maternice. Većina ovih promjena neće izazvati nikakve poteškoće i biti će uklonjena od strane imunološkog sustava inficirane osobe, no mali postotak njih razviti će se u rak vrata maternice. Kod CIN-a razlikujemo tri tipa promjena. Najblaži tip je CIN I, koji predstavlja samo blagu displaziju ili abnormalan rast stanica.

Ovaj tip odgovara blagim intraepitelijalnim lezijama (LSIL - Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion) koje dobijemo kao rezultat Papa-testa. Osim CIN I postoje i CIN II i CIN III koji odgovaraju težim intraepitelijalnim lezijama (HSIL - High Grade Squamous Intraepithelial Lesion), s time da CIN II predstavlja umjerenu displaziju koja zahvaća dvije trećine bazalnog epitelnog sloja, a CIN III predstavlja tešku displaziju koja zahvaća više od dvije trećine bazalnog epitelnog sloja. Ovaj tip lezija se može odnositi na karcinom *in situ* (Slika 4).



Slika 4. Napredovanje od dobroćudnih lezija na epitelu vrata maternice do invazivnog raka vrata maternice. Preuzeto iz Lowy i Schiller (2006).

1.5. DIJAGNOSTIKA AKTIVNE HPV INFEKCIJE TEMELJI SE NA DETEKCIJI VIRUSNE NUKLEINSKE KISELINE MOLEKULARNIM METODAMA

Spoznaja da rak vrata maternice uzrokuju određeni genotipovi HPV-a omogućila je razvoj molekularnih metoda za otkrivanje uzročnika (virusne nukleinske kiseline) te tako nadvladala nedostatke citološke probirne metode. Stoga se HPV testiranje primjenjuje kao primarni test probira, u praćenju žena s abnormalnim nalazom Papa-testa i nakon liječenja težih promjena raka vrata maternice.

Nedavna istraživanja pokazala su da HPV testiranje kao primarni test probira ima 25 do 35% veću osjetljivost od citološke probirne metode. S druge strane, mana HPV testiranja kao probirne metode je njegova niža specifičnost (5 do 10%) i predviđena niska pozitivna vrijednost za visoki stupanj CIN-a zato što je veliki broj HPV infekcija samo prolazan. S obzirom da najveći broj žena u dvadesetim godinama infekciju eliminira spontano, HPV testiranje kao primarni test probira je manje učinkovit u tim godinama, odnosno ovaj tip testiranja se primjenjuje kod žena starijih od 30 godina.

HPV testiranje u praćenju žena s abnormalnim nalazom Papa-testa pokazalo se kao vrlo dobra metoda, jer je njegova osjetljivost istovjetna osjetljivosti kolposkopije, pa se na taj način bitno smanjuje potreba za kolposkopijom.

HPV testiranje nakon liječenja težih promjena raka vrata maternice pokazuje preostale promjene vrata maternice puno brže i puno je osjetljivije od citološke probirne metode u istu svrhu (Boulet i sur. 2008).

Važnost HPV testiranja i njegova prednost pred citološkim probirnim metodama je ta da većina inficiranih osoba nema vidljivih promjena na sluznicama ili koži, a takve promjene nisu karakteristične za skupinu genitalnih genotipova HPV-a visokog rizika. Kada promjene povezane s onkogenim djelovanjem HPV-a postanu vidljive, tada je obično prekasno za uspješno liječenje. Morfološki izgled stanica može upućivati na HPV infekciju, ali svjetske studije ukazuju da je u 40 do 50% slučajeva CIN I testiranje na prisutnost HPV DNK negativno. Stoga su danas isključivo HPV DNK testovi prihvaćeni kao metoda za dokazivanje nazočnosti HPV DNK (Bastić-Ban 2006).

HPV testiranje kao metoda mora biti iznimno osjetljiva, mora imati visoku prediktivnu negativnu vrijednost za rak vrata maternice povezan s HPV-om, naročito jer je većina nalaza Papa-testa normalna ili neodređenog značaja (ASCUS). Osim toda HPV testovi moraju biti standardizirani, pouzdani, točni i precizni (Halfon i sur. 2006).

Postoje dvije glavne metode za otkrivanje HPV-a, a to su direktna hibridizacija i PCR.. Hibridizacijski testovi općenito imaju nižu osjetljivost, jer su ograničeni količinom tražene DNK u uzorku, i nižu specifičnost, jer postoji problem križne hibridizacije i većeg postotka lažno pozitivnih nalaza.

Primjena PCR-a omogućuje otkrivanje vrlo male količine tražene DNK u uzorku, koje bi primjenom drugih metoda ostale neotkrivene. Osim toga, ovaj tip testova omogućuje testiranje uzoraka koji sadrže manju količinu tkiva ili stanica. Uzorak može imati lošiju kvalitetu DNK ili manje kopija virusnih čestica (Bastić-Ban 2006).

1.5.1. Direktni hibridizacijski testovi

U direktne hibridizacijske testove ubrajamo Southern blot i *in situ* hibridizaciju. Southern blot se zasniva na korištenju agarozne gel elektroforeze koja razdvaja DNK na temelju veličine, a nakon toga slijedi prijenos razdvojenih DNK na membranu od nitroceluloze ili najlona gdje će uslijediti hibridizacija s probama. Probe su uglavnom obilježene radioaktivno ili s fluorescentnom bojom radi lakšeg očitanja rezultata.

In situ hibridizacija se zasniva na komplementarnom sparivanju obilježene probe i HPV antigena ili nukleinske kiseline (DNK ili mRNK) unutar obriska cerviksa. Biotinilirane probe mogu biti detektirane s kromogenim supstratom a test može biti automatiziran za kliničku upotrebu. Prednost ovog testa je što HPV infekcija može biti otkrivena unutar specifičnih stanica, a i možemo otkriti fizičko stanje infekcije (npr. je li došlo do integracije genoma HPV-a u stanični genom). Ako je metoda dovoljno osjetljiva može se odrediti i broj integriranih HPV kopija. Glavna mana ove metode je cijena, jer višestruki *in situ* hibridizacijski pokusi moraju biti napravljeni za svaki uzorak za HPV genotipizaciju. Standardizirani *in situ* hibridizacijski testovi su Inform HPV test (Ventana, Tuscon, SAD), GenPoint test (Dako, Glostrup, Danska), InPath In-Cell HPV test (Invirion, Frankfurt, Njemačka).

Jedini hibridizacijski test koji je ovlašten od Europske unije (EMEA-European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) i SAD-a (FDA-Food and Drug Administration) je Digene HPV test (Hybrid capture 2, Digene, Gaithersburg, SAD) (Dehn i sur. 2007).

Hybrid capture 2 HPV test je kvalitativni test za detekciju DNK koji koristi princip tekućinske hibridizacije (koktel specifičnih RNK proba) s detekcijom koja se temelji na pojačavanju signala.

Ovim testom moguće je odrediti prisutnost HPV DNK jednog ili više od ukupno 13 visokorizičnih genotipova HPV-a (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68), ali i prisutnost HPV DNK jednog ili više od ukupno 5 niskorizičnih genotipova HPV-a (6, 11, 42, 43, 44). Negativan rezultat ovog testa znači da je količina DNK visoko i niskorizičnih genotipova HPV-a manja od 1 pg/ml uzorka. Za vrijeme ovog testa uzorak koji sadrži HPV DNK hibridizira sa specifičnom HPV RNK probom. Jedna je proba za 13 visokorizičnih genotipova HPV-a, a druga za 5 niskorizičnih genotipova HPV-a. Nastali hibridi RNK:DNK zatim postaju zarobljeni na površini mikrotitarske pločice za koju su već bila vezana antitijela specifična za hibride RNK:DNK. Imobilizirani hibridi zatim reagiraju s antitijelima konjugiranima alkalnom fosfatazom koja je specifična za hibride RNK:DNK, a detektirani su kemiluminiscentnim supstratom.

Nekoliko molekula alkalne fosfataze konjugirano je na svako antitijelo koja se zatim vežu za hibride RNK:DNK rezultirajući pojačavanjem signala. Kako se supstrat oslobađa od vezane alkalne fosfataze odašilje se svjetlost koju mjerimo u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLUs – Relative Light Units) na luminometru. Intenzitet svjetlosti označava prisutnost ili odsutnost DNK u uzorku.

Hybrid capture 2 HPV test ima i neke nedostatke od kojih je najvažniji rizik od križne hibridizacije dodatnih genotipova HPV-a s RNK probama. Valja naglasiti da je njegova granica osjetljivosti niža u usporedbi s PCR testovima ali to je istovremeno i njegova prednost u smislu kliničke interpretacije rezultata. Naime, cilj ovog tipa analize je otkriti one infekcije HPV-om koje su klinički značajne pa je granica detekcije hibridizacijskog testa hybrid capture 2 opitimizrana za detekciju 5000 kopija HPV DNK u uzorku. Naime, postoje nedvojbeni dokazi o tome da je upravo ta količina HPV DNK potrebna da u razdoblju od 8 godina nastane rak vrata maternice. Osjetljivije metode od hibridizacije (npr. PCR) dati će nam veći broj pozitivnih rezultata testiranja ali za sada nema dokaza o kliničkoj značajnosti tih dodatnih rezultata (Boulet i sur. 2008).

1.5.2. PCR

Dostupna su dva tipa PCR testova, a to su PCR test specifičan za određeni genotip i grupno specifičan PCR test. PCR test specifičan za određeni genotip omogućuje umnažanje jednog genotipa HPV-a. Grupno specifični PCR testovi omogućuju detekciju širokog spektra genotipova HPV-a.

Početnice su oblikovane za ciljanje konzerviranih regija različitih genotipova poput L1 regije genoma HPV-a. L1 regija nije samo visoko konzervirana već se koristi i za klasifikaciju papilomavirusa. Većina korištenih početnica tako koristi L1 regiju kao ciljnu regiju (Dehn i sur. 2007). Najčešće korištene početnice su GP5+/6+, MY09/11 i SPF. GP5+/6+ početnice detektiraju široki spektar genotipova HPV-a na nižoj temperaturi vezanja početnica i umnažaju fragment L1 regije veličine 150 pb. MY09/11 početnice umnažaju fragment L1 regije veličine 450 pb, a sintetizirane su od nekoliko degeneriranih nukleotida u svakoj početnici, tvoreći tako smjesu od 25 početnica koje su sposobne umnožiti širok spektar genotipova HPV-a i koje mogu detektirati dvostruko više višestrukih infekcija. Ovaj tip početnica ima i unaprijeđenu verziju, a to je PGMY09/11. SPF početnice umnažaju fragment L1 regije veličine 65 pb, a sadrže inozin koji se veže s bilo kojim nukleotidom i omogućava PCR reakciju na optimalnj temperaturi vezanja početnica uzrokujući tako veći postotak detekcije HPV-a od početnica MY09/11 (Boulet i sur. 2008; Guo i sur. 2008).

Nakon umnažanja DNK PCR-om, specifični genotip HPV-a može biti određen hibridizacijom nukleinskih kiselina, korištenjem restrikcijskih endonukleaza i sekvenciranjem. Najčešće se koristi hibridizacija nukleinskih kiselina gdje se umnoženi PCR produkt obilježen biotinom veže za streptavidin kojim je obložena plastična posudica za hibridizaciju. Tako imobilizirani fragmenti DNK zatim se denaturiraju i nakon toga hibridiziraju s DNK probama koje su obilježene digoksigeninom, a komplementarne su sekvenci genotipa HPV-a. Završni korak je kolorimetrijska reakcija, a rezultat je prikazan kao optička gustoća.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) koristi cijepanje PCR produkta pomoću različitih restrikcijskih endonukleaza koje cijepaju HPV DNK na specifičnom mjestu. Rezultat takvog cijepanja su HPV DNK fragmenti različite dužine koji se zatim detektiraju agaroznom gel elektroforezom. Iako je ova metoda jeftina zahtjeva puno posla ako se koristi više od jedne restrikcijske endonukleaze. Osim toga, zahtjeva i veliki volumen PCR produkta što može povećati trošak po uzorku. RFLP je ručna metoda, pa dolazi do odstupanja u rezultatima nakon svakog pokusa.

Sekvenciranje je relativno skupa metoda, ali može biti korištena nakon PCR umnažanja, a i brza je metoda za analizu sekvenci genotipova HPV-a. Nedostatak metode je smanjena osjetljivost prilikom detekcije višestrukih genotipva HPV-a u jednom uzorku. Ova metoda se ne koristi za rutinsko određivanje genotipova HPV-a u kliničke svrhe (Dehn i sur. 2007).

Nekoliko je standardiziranih PCR testova, kao što su AMPLICOR HPV PCR test, Linear Array HPV genotipizacijski test i INNO-LiPA HPV genotipizacijski test.

AMPLICOR HPV PCR (Roche Diagnostics, SAD) test je kvalitativni molekularni test koji se temelji na kombinaciji PCR-a i hibridizacije nukleinskih kiselina. Koristi se za određivanje prisutnosti HPV DNK jednog ili više od ukupno 13 visokorizičnih genotipova HPV-a (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Ciljna sekvenca ovog testa je L1 regija genoma HPV-a, pa PCR reakcijom nastaje produkt veličine 165 pb. Osim toga, postoji i interna kontrola, a to je beta-globinski gen, koji u PCR reakciji daje produkt veličine 268 pb (Sandri i sur. 2006).

Uspoređujući ovaj test s Digene HPV testom, AMPLICOR HPV PCR test je pokazao veću osjetljivost ali klinička značajnost dodatnih pozitivnih rezultata u smislu rizika od nastanka karcinoma nije poznata. Zajednička svojstva oba testa su da se njima ne može odrediti genotip HPV-a. (van Hamont i sur. 2006).

Linear Array genotipizacijski test (Roche Diagnostics, SAD) koristi PGMY09/11 početnice i omogućava detekciju čak 37 visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a, uključujući i sve poznate onkogene genotipove HPV-a (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 82v i 89). Njegova je prednost da može detektirati i infekciju koja uključuje više genotipova HPV-a (Castle i sur. 2008). Ovaj test se ne koristi u kliničkoj dijagnostici već samo za istraživanje molekularne epidemiologije HPV infekcije.

INNO-LiPA genotipizacijski test (Innogenetics, Gent, Belgija) je test kojim je moguće detektirati prisutnost genotipova HPV-a 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 54, 58, 59, 68, 70, 73, 74, 82 i 97. Test ne detektira visokorizične genotipove HPV-a 35, 39, 52 i 56, niti se njime mogu razlikovati genotipovi HPV-a 68, 73 i 97. Koristi kombinaciju PCR-a i reverzne hibridizacije. PCR se primjenjuje za umnažanje dijela L1 regije, a za PCR se koriste SPF početnice koje su obilježene biotinom. Nakon PCR reakcije slijedi reverzna hibridizacija gdje se dio L1 regije koji je umnožen hibridizira sa specifičnim oligonukleotidnim probama koje su imobilizirane na nitroceluloznoj membrani. Nakon hibridizacije i ispiranja dodaje se alkalna fosfataza konjugirana streptavidinom koja će se vezati za svaki stvoreni biotinilirani hibrid. Inkubacija s kromogenom daje obojeni talog, te tako možemo očitati rezultate (Sabol i sur. 2008). Ovaj se test također koristi isključivo u epdimiologiji, a ne u kliničkoj dijagnostici.

1.6. PROFILAKTIČKA CJEPIVA PROTIV HPV-A

Obzirom na to da je infekcija HPV-om obvezni kofaktor u nastanku raka vrata maternice, upotreba profilaktičkog ili terapijskog cjepiva protiv HPV-a biti će od velike važnosti za prevenciju tog tipa raka. Terapijsko cjepivo protiv HPV-a bilo bi vrlo poželjno kako bi spriječilo komplikacije HPV infekcija koje su povezane s rakom koje se razvijaju nakon mnogo godina infekcije. No, unatoč velikom trudu uloženom u razvoj terapeutskog cjepiva, niti jedan pokušaj nije se pokazao klinički uspješan (Lowy i Schiller 2006).

Danas su na raspolaganju dva profilaktička cjepiva protiv HPV-a koja su odobrena i široko se primjenjuju u svijetu a, u nešto manjem opsegu, i u Hrvatskoj. Oba se cjepiva zasnivaju na rekombinantnoj ekspresiji i samostalnom okupljanju proteina L1 u čestice nalik virusu (VLPs-virus like particles) koje sliče vanjskoj ovojnici (kapsidi) virusa. Čestice nalik virusu HPV-a ne sadrže DNK i nisu živi virusi.

Jedan tip profilaktičkog cjepiva je četverovalentno cjepivo koje štiti od bolesti uzrokovanih genotipovima HPV-6, 11, 16, 18. tj. od raka vrata maternice, abnormalnih i prekanceroznih promjena vrata maternice, rodnice i stidnice kao i od genitalnih bradavica.

Drugi tip cjepiva je bivalentno cjepivo koje štiti od bolesti uzrokovanih genotipovima HPV-a 16 i 18, kao što su rak vrata maternice, abnormalne i prekancerozne promjene vrata maternice, abnormalne i prekancerozne promjene rodnice i abnormalne i prekancerozne promjene stidnice.

Cilj profilaktičkog cjepiva je smanjenje učestalosti bolesti genitalnih organa povezanih s HPV-om, uključujući rak vrata maternice, penisa, rodnice, stidnice i anusa. Osim toga, cilj je i smanjenje učestalosti genitalnih bradavica kod onih osoba koje su primile četverovalentno cjepivo i smanjenje učestalosti laringealnih papiloma kod njihove djece (Saslow i sur. 2007).

Čestice nalik virusu iz četverovalentnog cjepiva stvorene su na modelu kvasca, dok su one iz dvovalentnog cjepiva stvorene u stanicama kukaca primjenom rekombinantnog bakulovirusa (Lowy i Schiller 2006).

Uspješnost ovih cjepiva u sprječavanju prekanceroznih promjena vrata maternice i stidnice ispitana je među ženama u dobi od 16 do 26 godina s visokom djelotvornošću od 95 do 100% (Tovar i sur. 2008).

Tri su važna faktora o kojima treba voditi računa prilikom određivanja dobi kada bi bilo najbolje započeti cijepljenje, a to su: trajanje njihove zaštite za koju se smatra da je pouzdana 5 godina nakon cijepljenja, godine za optimalnu učinkovitost cjepiva i plan za raspodjelu cjepiva.

Cjepivo će najbolje štititi prije bilo kakvog kontakta s genotipovima 6, 11, 16 i 18, tako da bi najsigurnije bilo cijepiti prije početka spolne aktivnosti. Danas se cijepljenje provodi u mnogim zemljama tako da se cijepe djevojčice u dobi između 9 i 16 godina i ono se provodi u 3 doze (Lenselink i sur. 2008). Osim toga, preporuča se i cijepljenje djevojkama do 26 godine. Osoba koja je već zaražena s HPV-om može imati koristi od ovog cjepiva, jer većina ljudi nije zaražena sa sva četiri genotipa virusa od kojih cjepivo štiti, pa će imati djelomičnu zaštitu od preostalih genotipova sadržanih u cjepivu. Nije potrebno raditi HPV testiranje prije početka cijepljenja (Saslow i sur. 2007).

Iako je imunološki odgovor muškaraca na cjepivo istovjetan onom kod žena još uvijek se ne zna štiti li ovo cjepivo i muškarce. Istraživanja su usmjerena na žensku populaciju jer se više od 80% slučajeva raka povezanih s HPV-om javlja kod žena (Lowy i Schiller 2006).

Ograničenja postojećih cjepiva protiv HPV-a su sljedeća: ne pružaju zaštitu prema svim genotipovima HPV-a, ne liječe postojeće HPV infekcije, ne zna se točno koliko dugo štite cjepiva, a i cijena cjepiva će vjerojatno ograničiti upotrebu cjepiva na populaciju koja je zdravstveno osigurana.

Iako je profilaktičko cjepivo od velike važnosti za prevenciju raka vrata maternice i dalje se preporuča probir na rak vrata maternice (Papa-test, kolposkopija ili HPV testiranje) (Saslow i sur. 2007).

1.7. LIJEČENJE

Trenutno ne postoji lijek kojim bi se mogla izliječiti nastala HPV infekcija. Međutim, cervikalne intraepitelijalne neoplazije koje su gotovo uvijek uzrokovane virusom HPV-a najčešće su uklonjene zahvaljujući imunološkom sustavu osobe koja je zaražena virusom. Ako ne budu uklonjene imunološkim sustavom postoje metode za njihovo uklanjanje a sve uključuju odstranjivanje stanica površinskog sloja vrata maternice. Takve metode su krioterapija (koja se temelji na smrzavanju stanica), elektrokoagulacija (uključuje paljenje tkiva), laserski tretman, kirurško uklanjanje ili ubrizgavanje interferona u svaku genitalnu bradavicu, a ta metoda ima cilj spriječiti integraciju genoma HPV-a stanicu domaćina (Kreimer i sur. 2006).

1.8. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je analizirati učestalost detekcije genotipova HPV-a koji su povezani s visokim odnosno niskim rizikom od nastanka karcinoma vrata maternice u obriscima cerviksa žena koje se kontroliraju u ambulanti za urogenitalne infekcije kliničke bolnice. U dijelu uzoraka koji su bili pozitivni u kvalitativnom testu na HPV DNK odredila sam pojedinačne genotipove HPV-a i analizirala njihovu distribuciju.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. ISPITANICI

Ovo istraživanje provedeno je u Odjelu za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, od ožujka do lipnja 2008. godine. U istraživanje su uključeni pacijenti Ambulante za urogenitalne infekcije Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

U istraživanje je uključeno 429 ispitanica starijih od 18 godina. Biološki uzorci korišteni u ovom istraživanju bili su obrisci cerviksa. Uzorci cervikalne sluzi za utvrđivanje HPV genotipa uzeti su u okviru rutinskih ginekoloških pregleda i upućeni u Odjel na rutinsko testiranje.

2.2. BIOLOŠKI UZORCI

Obrisci cerviksa za analizu HPV DNK prikupljeni su u medij Female Swab Specimen Collection Kit (Hybrid Capture 2®, Digene, Gaithersburg, SAD). Uzorci su pohranjeni na temperaturi od 2°C do 10°C do testiranja.

2.3. KVALITATIVNA DETEKCIJA HPV DNK IZ VISOKORIZIČNIH I NISKORIZIČNIH GENOTIPOVA KORIŠTENJEM DNK/RNK TESTA (DIGENE HPV TEST, HYBRID CAPTURE 2, DIGENE, GAITHERSBURG, SAD)

2.3.1. Priprema reagensa

Prije provedbe testa potrebno je pripremiti reagense. Denaturacijski reagens (razrijeđena otopina NaOH) sam pripremila tako da sam dodala 5 kapi indikatorske boje (boja koja sadrži natrijev azid) u bočicu denaturacijskog reagensa i zatim dobro promiješala bočicu na mješalici. Ovako pripremljen denaturacijski reagens može se koristiti 3 mjeseca ako je pohranjen na temperaturi od 2°C do 8°C.

Probe za nisko i visokorizične genotipove HPV-a pripravila sam za vrijeme denaturacije uzoraka miješanjem s reagensom za razrjeđivanje probe (otopina pufera koja sadrži natrijev azid).

Osim toga pripremila sam i pufer za ispiranje i to tako da sam 100 ml koncentrata pufera za ispiranje (sadrži natrijev azid) razrijedila s 2,9 L destilirane ili deionizirane vode uz miješanje. Ovako pripremljen pufer za ispiranje može se koristiti tri mjeseca ako je pohranjen na temperaturi od 2°C do 30°C.

2.3.2. Denaturacija

U svaku epruvetu (koja sadrži kalibrator, kontrolu kvalitete ili uzorak) dodala sam denaturacijski reagens i to 500 µl u svaku epruvetu koja sadrži uzorak, niskorizični kalibrator (1 pg/ml klonirane HPV 11 DNK i DNK nosač u mediju koji sadrži natrijev azid) ili visokorizični HPV kalibrator (1 pg/ml klonirane HPV 16 DNK i DNK nosač u mediju koji sadrži natrijev azid) ili niskorizičnu kontrolu kvalitete (5 pg/ml klonirane HPV 6 DNK i DNK nosač u mediju koji sadrži natrijev azid) ili visokorizičnu kontrolu kvalitete (5 pg/ml klonirane HPV 16 DNK i DNK nosač u mediju koji sadrži natrijev azid), a 1000 µl sam dodala u epruvetu koja sadrži negativni kalibrator (DNK nosač u mediju koji sadrži natrijev azid). Dodatkom denaturacijskog reagensa sadržaj epruveta poprimio je ljubičastu boju, zbog indikatora boje koji je prisutan u denaturacijskom reagensu. Sve epruvete sam promiješala na mješalici, te stavila u stalak koji sam zatim stavila u vodenu kupelj na 65°C i inkubirala 45 minuta.

2.3.3. Hibridizacija

Nakon inkubacije izvadila sam stalak iz vodene kupelji, te pipetirala po 75 µl uzorka, kontrole ili kalibratora u hibridizacijske epruvete i zatim ih inkubirala 10 minuta na temperaturi od 20°C do 25 °C. Zatim sam u svaku epruvetu pipetirala 25 µl HPV proba, te sam svaku epruvetu dobro promiješala na mješalici dok boja njihova sadržaja nije prestala biti ljubičasta. Do promjene boje došlo je zbog promjene pH vrijednosti. Naime, denaturacijski reagens je bazičan, za razliku od proba koje su kisele, pa njihovim dodavanjem dolazi do neutralizacije pH vrijednosti, te promjene ljubičaste boje u žutu. Ako se ne dogodi promjena boje onda je potrebno dodati jos 25 µl mješavine probe u hibridizacijsku epruvetu. Zatim sam epruvete poslagala u stalak koji sam stavila u vodenu kupelj na 65°C i inkubirala 60 minuta.

2.3.4. Zarobljavanje hibrida

Nakon inkubacije sadržaj svake hibridizacijske epruvete premjestila sam na mikrotitracijsku pločicu za koju su već bila vezana antitijela specifična za hibride RNK:DNK te sam je pokrila folijom kako ne bi došlo do kontaminacije.

Nakon toga slijedilo je miješanje na 1100 okretaja u minuti i inkubacija 60 minuta na temperaturi od 20°C do 25°C. Kada je inkubacija bila završena uklonila sam suvišak sadržaja iz mikrotitracijske pločice.

2.3.5. Detekcija hibrida

Oprezno sam otpipetirala 75 µl detekcijskog reagensa 1 (antitijela konjugirana alkalnom fosfatazom specifična za hibride RNK:DNK u otopini pufera koja sadrži natrijev azid) u svaku jažicu mikrotitracijske pločice, te sam pločicu prekrila folijom i inkubirala 30 do 45 minuta na temperaturi od 20°C do 25°C.

2.3.6. Ispiranje

Nakon inkubacije sav sadržaj mikrotitracijske pločice sam uklonila, te šest puta isprala puferom za ispiranje. Zatim sam osušila pločicu.

2.3.7. Pojačavanje signala

Oprezno sam pipetirala 75 µl detekcijskog reagensa 2 (kemiluminiscentni supstrat) u svaku jažicu mikrotitracijske pločice. Djelovanjem alkalne fosfataze na detekcijski reagens 2 dolazi do njegovog cijepanja i u jažicama se pojavljuje žuta boja. Pločicu sam prekrila folijom i inkubirala 15 minuta na temperaturi od 20°C do 25°C u mraku. Kako se supstrat oslobađa od vezane alkalne fosfataze odašilje se svjetlost koja se mjeri u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLUs) na instrumentu DML 2000 (Digene Microplate Luminometer 2000).

2.3.8. Interpretacija rezultata

Računalni program izračunava aritmetičku sredinu tri pozitivna kalibratora. Dobivena vrijednost se definira kao granična vrijednost. Svi uzorci koji imaju nižu vrijednost od granične smatraju se negativnima, dok se uzorci koji imaju višu vrijednost od granične smatraju pozitivnima.

2.4. INDIVIDUALNA HPV GENOTIPIZACIJA

2.4.1. Izolacija HPV DNK

Za izolaciju HPV DNK koristila sam QIAamp DNK Mini Kit (Qiagen N.V., Venlo, Nizozemska). Pipetirala sam 20 µl QIAGEN proteaze u epruvetu za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml i dodala 200 µl uzorka, te 200 µl AL pufera, nakon čega sam smjesu promiješala na mješalici 15 sekundi. Zatim je slijedila inkubacija 10 minuta na 56°C, nakon čega sam dodala 200 µl 96-100% otopine etanola, promiješala na mješalici, te centrifugirala na 8 000 okretaja u minuti jednu minutu. Zatim sam sve premjestila u QIAamp Mini kolonu za centrifugiranje od 2 ml i centrifugirala na 8 000 okretaja u minuti jednu minutu. Donji dio kolone sam odbacila, a gornji dio sam stavila u novu QIAamp Mini kolonu za centrifugiranje i dodala sam 500 µl pufera AW1, te centrifugirala na 8 000 okretaja u minuti jednu minutu. Donji dio kolone sam odbacila, a gornji dio sam stavila u novu QIAamo Mini kolonu za centrifugiranje, dodala 500 µl pufera AW2 i centrifugirala na 14 000 okretaja u minuti tri minute. Gornji dio sam premjestila u novu epruvetu za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml i dodala 200 µl pufera AE, inkubirala jednu minutu na sobnoj temperaturi (20°C-25°C) i zatim centrifugirala na 8 000 okretaja u minuti jednu minutu.

2.4.2. PCR umnažanje HPV DNK

PCR umnažanje provela sam tako što sam pripremila reakcijsku smjesu koja je sadržavala 5 µl PCR pufera II, jednu i pol jedinicu AmpliTaq Gold DNA polimeraze, 2,0 mM $MgCl_2$, 200 µM svakog od četiri dNTP-a (deoksinukleozid trifosfata), 10 µl mješavine početnica i destilirane vode do ukupnog volumena od 40 µl. U pokusima sam koristila početnice SPF koje imaju odgovarajuće sekvence a koje se nalaze u Tablici 1.

Dobivenu smjesu dobro sam promiješala na mješalici i zatim joj dodala 10 µl DNK. Takve uzorke sam smjestila u instrument INNO-LiPA HPV Genotyping CE Amp u kojem se zatim odvijala PCR reakcija i to tako da je prvi korak bila denaturacija 9 minuta na 94°C, nakon čega sam 40 puta ponovila denaturaciju na 94°C 30 sekundi, vezanje početnica na 52°C 45 sekundi i produljenje početnica na 72°C 45 sekundi. Zadnji korak je bio završno produljenje na 72°C pet minuta.

Tablica 1. Sekvence SPF početnica. Preuzeto s Kleter i sur. (1998).

SPF POČETNICE	SEKVENCE SMJERA 5'→3'
SPF1A	GCiCAGGGiCACAATAATGG
SPF1B	GCiCAGGGiCATAACAATGG
SPF1C	GCiCAGGGiCATAATAATGG
SPF1D	GCiCAAGGiCATAATAATGG
SPF2B-bio	GTiGTATCiACAACAGTAACAAA
SPF2D-bio	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA

i-inozin

2.4.3. HPV genotipizacija korištenjem INNO-LiPA genotipizacijske metode (Innogenetics, Gent, Belgija)

Deset µl denaturacijske otopine (bazična otopina NaOH koja sadrži EDTA-ethylenediaminetetraacetic acid) i 10 µl umnoženog biotiniliranog PCR produkta sam promiješala, i ostavila da se denaturira pet minuta na sobnoj temperaturi. Promiješala sam hibridizacijsku otopinu (1x80 ml SSC pufer (saline-sodium citrate) koji sadrži SLS (sodium lauryl sulfate)) koju sam prethodno zagrijala na oko 37°C i dodala 2 ml te otopine u plastičnu posudicu za hibridizaciju u koju sam stavila i nitroceluloznu membranu na kojoj su prethodno bile hibridizirane probe specifične za pojedine genotipove HPV-a. U eksperimentu sam koristila nitrocelulozne membrane INNO-LiPA na kojima su bile hibridizirane DNK probe specifične za genotipove HPV-a 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 54, 58, 59, 68, 70, 73, 74, 82 i 97. Probe su obilježene digoksigeninom. Stalak s posudicama za hibridizaciju stavila sam u mješajuću vodenu kupelj na 49°C i inkubirala 60 minuta.

Nakon hibridizacije stalak s posudicama za hibridizaciju sam izvadila iz vodene kupelji, te sam vakuum sisaljkom uklonila svu tekućinu iz posudica za hibridizaciju. Dodala sam 2 ml otopine za ispiranje (1x200ml SSC pufera koji sadrži SLS),te miješanjem ispirala nitroceluloznu membranu 10-20 sekundi na sobnoj temperaturi, a otopinu sam zatim uklonila vakuum sisaljkom. Taj korak sam ponovila još dva puta, s tim da sam zadnji put nakon dodavanja 2 ml otopine za pranje inkubirala 30 minuta u mješajućoj vodenoj kupelji na 49°C.

Svaku nitroceluloznu membranu sam dva puta ispirala po jednu minutu s 2 ml razrijeđene otopine za ispiranje (fosfatni pufer koji sadrži NaCl i Triton®) te sam otopinu uklonila vakuum sisaljkom.

U svaku posudicu za hibridizaciju dodala sam 2 ml konjugacijske otopine (streptavidin obilježen alkalnom fosfatazom u Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane) puferu koji sadrži stabilizatore proteina) i inkubirala 30 minuta uz njihanje. Nakon inkubacije otopinu sam uklonila vakuum sisaljkom. Svaku nitrocelulozu membranu sam dva puta ispirala po jednu minutu s 2 ml razrijeđene otopine za ispiranje i još jedan put s 2 ml supstratnog pufera (Tris pufer koji sadrži NaCl i $MgCl_2$). Slijedilo je uklanjanje otopine vakuum sisaljkom. Zatim sam dodala 2 ml supstratne otopine (BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate i NBT (nitro blue tetrazolium) u DMF (dimethylformamide) i inkubirala 30 minuta uz njihanje. Slijedilo je ukljanjanje otopine vakuum sisaljkom. Razvijanje boje sam zaustavila ispiranjem traka s 2 ml destilirane vode kroz tri minute. Boja je nastala kao posljedica djelovanja alkalne fosfataze na supstratnu otopinu, jer ona cijepa supstratnu otopinu, pa na nitroceluloznim membranama nastaje obojeni talog.

2.5. STATISTIČKE METODE

Za statističku obradu podataka koristila sam statistički program SAS (verzija 8. 2., SAS Institute, Cary, North Carolina, SAD).

3. REZULTATI

3.1. KVALITATIVNA DETEKCIJA HPV DNK KORIŠTENJEM REVERZNE HIBRIDIZACIJE

Rezultati detekcije HPV DNK visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a primjenom reverzne hibridizacije prikazani su u Tablici 2.

Rezultati kvalitativne analize visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a pokazali su da je HPV DNK bila detektirana u 178 od 429 ispitanica (41.4%). Visokorizični genotipovi HPV-a detekrtirani su u 110 uzoraka (25,6%). Kombinacija visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a otkrivena je u 47 uzoraka (10,9%) dok su u 21 uzorku (4,9%) detektirani samo niskorizični genotipovi.

Tablica 2. Rezultati primjene kvalitativnog grupnog genotipizacijskog testa za HPV DNK metodom reverzne hibridizacije

KVALITATIVNA DETEKCIJA HPV DNK	**BROJ UZORAKA (%)**
HPV DNK negativno	251 (58,5%)
HPV DNK visokog rizika	110 (25,6%)
HPV DNK visokog i niskog rizika	47 (10,9%)
HPV DNK niskog rizika	21 (4,9%)

3.1.1. Kliničke i citološke dijagnoze ispitanica s pozitivnim rezultatima detekcije HPV DNK u obriscima cerviksa

Kliničke i citološke dijagnoze ispitanica s pozitivnim rezultatima detekcije HPV DNK u obriscima cerviksa nalaze se u Tablici 3.

Kvalitativna detekcija HPV DNK pokazala je prisutnost HPV DNK u 178 ispitanica a analizom podataka utvrđene su i različite kliničke i citološke dijagnoze. Deset ispitanica imalo je citološki nalaz ASCUS-a, u 20 ispitanica otkrivene su cervikalne intraepitelijalne neoplazije blažeg tipa (CIN I), u jedne ispitanice otkrivena je prisutnost CIN I/II, u sedam ispitanica otkrivena je prisutnost CIN II, u tri ispitanice otkrivena je prisutnost CIN II/III, a u tri ispitanice prisutnost CIN III. Trima ispitanicama dijagnosticirana je *Dysplasia gravis*, a kod četiri ispitanica dijagnosticirana je *Dysplasia levis*. Kod tri ispitanice dijagnosticiran je *Cervicitis chronica,* kod 11 *Portio susp*. Tri ispitanice imaju genitalne bradavice, kod tri je dijagnosticiran *Vaginitis simplex*, a kod 109 ispitanica nije bilo dijagnoze.

Tablica 3. Kliničke i citološke dijagnoze ispitanica s pozitivnim rezultatima detekcije HPV DNK u obriscima cerviksa.

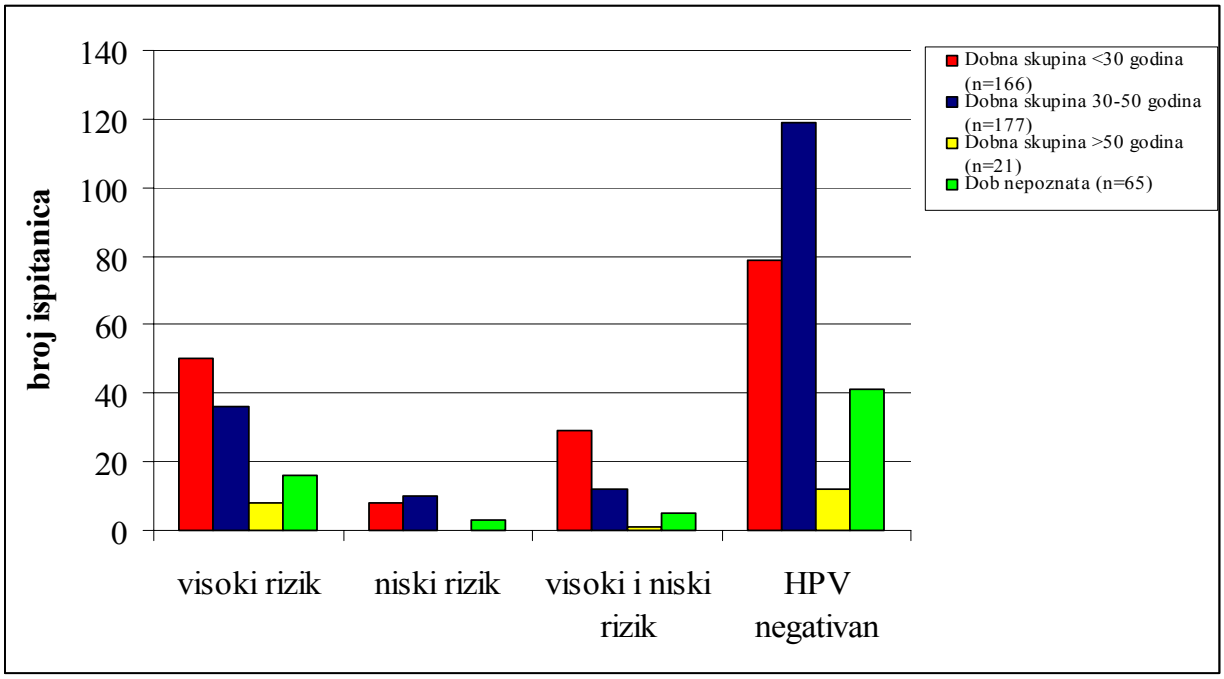
KLINIČKA I CITOLOŠKA DIJAGNOZA	BROJ ISPITANICA	POZITIVAN HPV VISOKOG RIZIKA	POZITIVAN HPV VISOKOG RIZIKA	POZITIVAN HPV IZ OBJE GRUPE
ASCUS	10	5	1	4
CIN I	20	13	3	4
CIN I/II	1			1
CIN II	7	6	1	
CIN II/III	3	2		1
CIN III	3	3		
Dysplasia gravis	1	1		
Dysplasia levis	4	3	1	
Cervicitis chronica	3	1	1	1
Portio susp.	11	5	3	3
Genitalne bradavice	3	1	1	1
Vaginitis simplex	3	3		
Nema dijagnoze	109	67	10	32

3.1.2. Detekcija HPV DNK kod ispitanica u različitim dobnim skupinama

Detekcija HPV DNK kod ispitanica iz različitim dobnim skupinama prikazana je na Slici 5.

U istraživanje je uključeno 429 ispitanica (medijan dobi 31 godina, raspon 19-78 godina). Detekcija HPV DNK kod ispitanica u različitim dobnim skupinama pokazala je da su najrizičnije dobne skupine ona do 30 godina starosti, i ona od 30 do 50 godina starosti te nešto nižu učestalost pozitivnih nalaza u žena starijih od 50 godina. Visokorizični genotipovi HPV-a najčešće su prisutni kod ispitanica do 30 godina starosti, a najrjeđe kod ispitanica iznad 50 godina starosti.

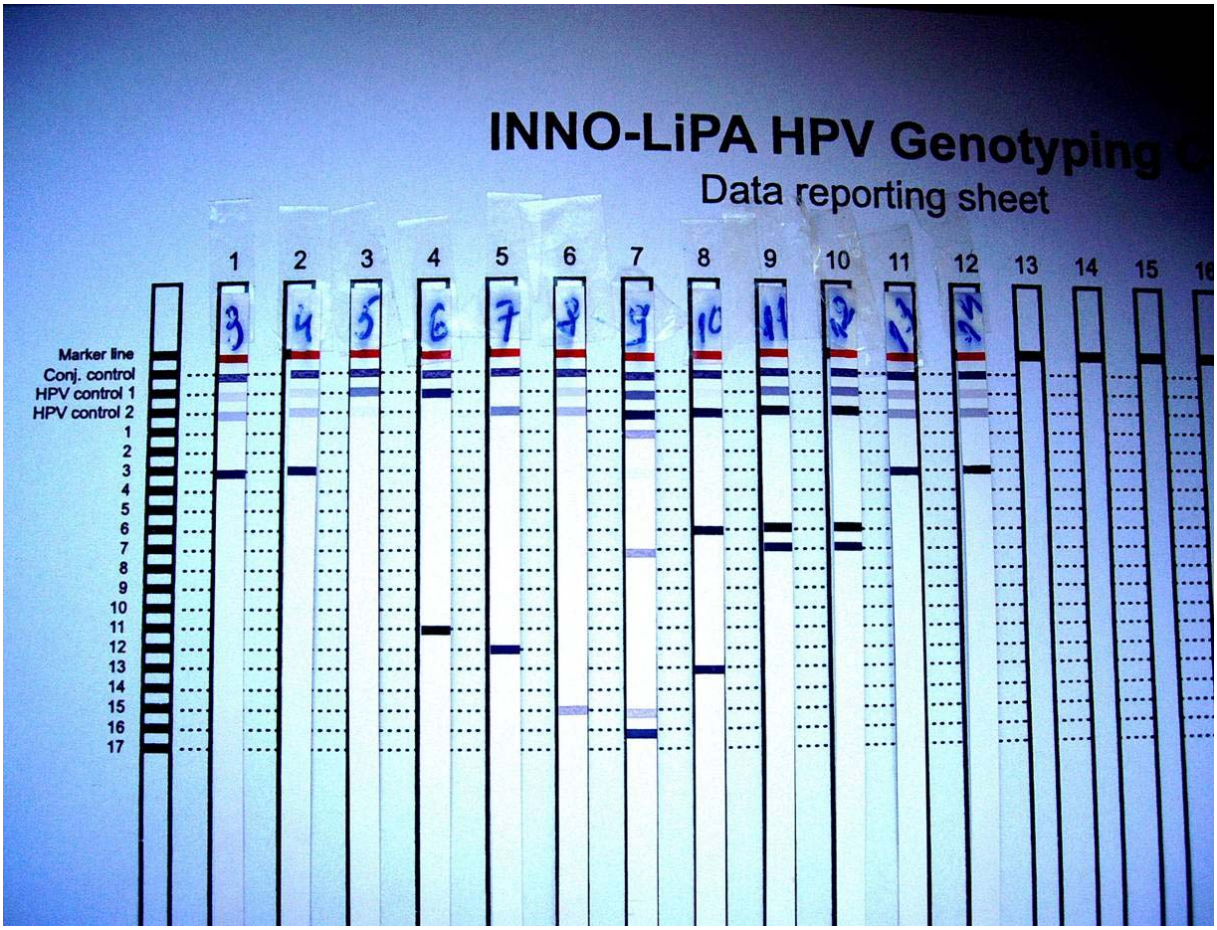
Niskorizični genotipovi HPV-a najčešće su prisutni kod ispitanica starosti od 30 do 50 godina, a najrjeđe kod onih iznad 50 godina. Genotipovi HPV-a iz obje grupe rizika (visoki i niski rizik) najčešče su prisutni kod ispitanica do 30 godina starosti, a najrjeđe kod ispitanica iznad 50 godina starosti.



Slika 5. Detekcija HPV DNK kod ispitanica u različitim dobnim skupinama.

3.2. INDIVIDUALNA HPV GENOTIPIZACIJA

Nakon kvalitativne detekcije HPV DNK nasumično sam odabrala 12 pozitivnih uzoraka obriska cerviksa s citološkom dijagnozom ASCUS-a za individualnu HPV genotipizaciju. Izgled nitroceluloznih membrana nakon individualne genotipizacije primjenom kombinacije PCR-a i reverzne hibridizacije prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Nitrocelulozne membrane s oligonukleotidnim probama specifičnim za pojedine genotipove HPV-a nakon hibridizacije PCR produkata (tamne linije vizualiziraju umnožene fragmente DNA specifične za pojedine genotipove virusa)

3.2.1. Rezultati individualne genotipizacije HPV-a u ispitanica s citološkom dijagnozom ASCUS-a

Rezultati individualne genotipizacije HPV-a u ispitanica s citološkom dijagnozom ASCUS-a nalaze se u Tablici 4.

Iz rezultata je vidljivo da je kod najvećeg broja uzoraka prisutan genotip HPV-a 16 (kod uzoraka 1, 2, 11 i 12). Genotip HPV-a 31 prisutan je u dva uzorka (uzorak 9 i 10). Uzorak 3 ne pokazuje niti jedan genotip HPV-a, iako ima pozitivnu amplifikacijsku kontrolu. Možemo smatrati da je taj uzorak pozitivan na jedan od genotipova koji se mogu detektirati hybrid capture 2 testom (35, 39, 52, 56), ali ih nije moguće detektirati PCR-om i reverznom hibridizacijom na nitroceluloznim membranama testa INNO-LiPA kojeg sam koristila u ovom radu.

Uzorak 4 sadrži genotip HPV-a 51, dok uzorak 5 sadrži genotip HPV-a 53, uzorak 6 sadrži genotip HPV-a 66, a uzorak 8 sadrži genotip HPV-a 58. Kod uzorka 7 prisutni su genotipovi HPV-a 6, 54, 66, 68, 73, 97.

Tablica 4. Rezultati individualne genotipizacije HPV-a u ispitanica s citološkom dijagnozom ASCUS-a.

OBRISCI CERVIKSA	**GENOTIP HPV-a**
Uzorak 1	HPV 16
Uzorak 2	HPV 16
Uzorak 3	Genotip nije moguće odrediti INNO-LiPA genotipizacijskim testom
Uzorak 4	HPV 51
Uzorak 5	HPV 53
Uzorak 6	HPV 66
Uzorak 7	HPV 6, 54, 66, 68, 73, 97
Uzorak 8	HPV 58
Uzorak 9	HPV 31
Uzorak 10	HPV 31
Uzorak 11	HPV 16
Uzorak 12	HPV 16

4. RASPRAVA

Rezultati ovog rada pokazali su visoki postotak pozitivnih rezultata u kvalitativnom testu detekcije DNK visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a u obriscima cerviksa žena koje se rutinski kontroliraju. U većini pozitivnih uzoraka detektirani su visokorizični genotipovi HPV-a. Individualna genotipizacija HPV-a u uzorcima žena s citološkom dijagnozom ASCUS-a pokazala je da se u uzorcima često nalazi HPV-16 ali i da postoje uzorci s koinfekcijama različitim genotipovima HPV-a.

Kvalitativnu detekciju HPV DNK provela sam primjenom hybrid capture 2 što znači da je u nešto više od polovice uzoraka koji su bili negativni bilo manje od 1 pg/ml HPV DNK. U ranijim istraživanjim uočeni su neki nedostaci hybrid capture 2 testa poput rizika od križne hibridizacije dodatnih genotipova HPV-a s RNK probama (Boulet i sur. 2008). Međutim, valja naglasiti da je metoda reverzne hibridizacije, posebice hybrid capture 2 test jedini test za kojeg postoje nedvojbeni podatci o kliničkoj primjenjivosti (Dehn i sur. 2007).

Visokorizični genotipovi HPV-a odgovorni su za nastanak raka vrata maternice. Najkritičniji događaj koji uvjetuje nastanak raka vrata maternice je ugradnja genoma visokorizičnog genotipa HPV-a u genom stanice domaćina (Andersson i sur. 2006). Većina ispitanica u ovom istraživanju bila je zaražena upravo visokorizičnim genotipovima HPV-a. Valja naglasiti da zaraza HPV-om iz grupe visokorizičnih genotipova ne znači nužno da postoji neposredna opasnost od nastanka karcinoma. Naime, poznato je da više od 90% infekcija HPV-om eliminira imunološki sustav zaraženih žena. Opasnost od nastanka raka vrata maternice odnosi se isključivo na perzistentne infekcije koje traju nekoliko godina (najčešće više od 8 godina). Stoga je vrlo vjerojatno da će većina žena mlađih od 30 godina koje su imale pozitivan nalaz HPV DNK u ovom istraživanju uspjeti samostalno eliminirati infekciju. Međutim, u žena starije životne dobi, posebice iznad 50 godina postoji mogućnost da se radi o perzistentnoj infekciji (pretpostavka je da se većina zaraza događa u mlađpj životnoj dobi) i takvi rezultati trebaju biti pažljivo interpretirani.

Niskorizični genotipovi HPV-a uzrokuju dobroćudne lezije koje imaju minimalni rizik da će prijeći u maligne tvorbe (Boulet i sur. 2008). Oko 5% ispitanica u ovom istraživanju bilo je pozitivno na niskorizične genotipove HPV-a.

Kliničke i citološke dijagnoze žena s pozitivnim rezultatima detekcije HPV DNK u obriscima cerviksa dobivene su primjenom Papa-testa. Pozitivni rezultati detekcije visokorizičnih genotipova HPV-a u ispitanica s težim lezijama cerviksa (CIN II i CIN III) su klinički značajni i zahtijevaju dalju terapijsku obradu (Schiffman i sur. 2007).

Detekcija HPV DNK kod ispitanica u različitim dobnim skupinama pokazala je da je HPV infekcije česta u mlađih žena dok je u žena starijih od 50 godna nešto rjeđa. Uočeno je da najveći broj ispitanica pozitivnih na prisutnost HPV DNK pripadalo dobnoj skupini do 30 godina starosti. Iduća dobna skupina po zastupljenosti bila je ona od 30 do 50 godina starosti, dok je dobna skupina iznad 50 godina starosti bila najmanje zastupljena. Takvi rezultati dijelom su u skladu s drugim istraživanjima. Naime, García –Piñares i sur. (2006) utvrdili su da je najveći broj HPV infekcija uočen kroz prvih par godina nakon početka seksualne aktivnosti. Nakon toga dolazi do značajnog smanjenja broja HPV infekcija s porastom dobi ispitanica, te ponovni porast broja HPV infekcija nastupa kod žena starijih od 55 godina. Do takve razlike u rezultatima moglo je doći zbog slabije osviještenosti žena o rizicima HPV-a, te činjenice da je za razvoj raka vrata maternice potrebno oko 25 godina od inficiranja virusom HPV-a (Andersson i sur. 2006). Osim toga imunološki sustav žena starijih od 50 godina teže uklanja HPV iz organizma, pa bi se žene te dobne skupine također trebale učestalo testirati na prisutnost HPV DNK.

Nakon kvalitativne detekcije HPV DNK nasumično sam odabrala 12 pozitivnih uzoraka obriska cerviksa s citološkom dijagnozom ASCUS-a za individualnu HPV genotipizaciju. Rezultati su pokazali da je genotip HPV-a 16 bio najučestaliji, a pratio ga je genotip HPV-a 31. Genotipovi HPV-a 51, 53, 66 i 58 bili su prisutni s puno manjom učestalošću, kao i višestruke infekcije uzrokovane virusom HPV-a. U Hrvatskoj je utvrđeno da je najučestaliji genotip HPV 16 s učestalošću od 16%, uključujući jednostruke i višestruke infekcije. Slijedili su ga genotipovi HPV-a: 31 s 9%, 6/11 sa 7%, 33 s 5%, 18 s 4%, 52 i 45 s 2%, te 58 s 1% učestalosti (Grce i sur. 2007). Genotip HPV-a 16 smatra se najučestalijim genotipom HPV-a i u svijetu, a nalazi se u 50 do 60% slučajeva raka vrata maternice pločastog epitela, dok je genotip HPV-a 18 drugi po učestalosti u svijetu, a nalazi se u 15 do 20% slučajeva raka vrata maternice pločastog epitela (Castle i sur. 2007).

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada pokazali su visoki postotak pozitivnih rezultata u kvalitativnom hibridizacijskom testu detekcije DNK visokorizičnih i niskorizičnih genotipova HPV-a u obriscima cerviksa žena koje se rutinski kontroliraju. U većini pozitivnih uzoraka detektirani su visokorizični genotipovi HPV-a, posebice u žena mlađe životne dobi i žena s težim oblicima cervikalnih lezija. Individualna genotipizacija HPV-a u uzorcima žena s citološkom dijagnozom ASCUS-a pokazala je da se u uzorcima često nalazi HPV-16 ali i da postoje uzorci s koinfekcijama različitim genotipovima HPV-a.

6. LITERATURA

Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A, Karlsen F, Johansson B (2006) Expression of E6/E7 mRNA from „high risk“ human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and $p16^{INK4a}$. International Journal of Oncology. 29, 705-711.

Arbyn M, Primic-Zakeus M, Raifu AO, Grce M, Paraskevaidis E, Diakomanolis E, Kesić V, Nicula FA, Suten O, von Karsa L (2007) The burden of Cervical Cancer in South-East Europe at the Beginning of the 21st Century. Coll Antropol. 31, 7-10.

Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. Journal of Clinical Microbiology. 44, 1755-1762.

Bastić-Ban S (2006) DNK PCR testovi u dijagnostici infekcije humanim papiloma virusom (HPV). Medix. 62/63, 143-146.

Boulet GAV, Horvath CAJ, Berghmans S, Bogers J (2008) Human Papillomavirus in Cervical cancer Screening: Important Role as Biomarker. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 17, 810-817.

Castle PE, Gravitt PE, Solomon D, Wheeler CM, Schiffman M (2008) Comparison of Linear Array and Line Blot Assay for Detection of Human Papillomavirus and Diagnosis of Cervical Precancer and Cancer in the Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study. Journal of Clinical Microbiology. 46, 109-117.

Castle PE, Porras C, Quint WG, Rodriguez AC, Schiffman M, Gravitt PE, González P, Katki HA, Silva S, Freer E, van Doorn L-J, Jiménez S, Herrero R, Hildesheim A (2008) Comparison of Two PCR-Based Human Papillomavirus Genotyping Methods. Journal of Clinical Microbiology. 46, 3437-3445.

Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S (2003) Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. Br. J. Cancer. 89, 101-105.

Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR (2007) Human Papillomavirus Testing and Molecular Markers of Cervical Dysplasia and Carcinoma. Cancer Cytopathology. 111, 1-13.

Ferlay J, Bray F, Pisani, Parkin DM (2002) Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No. 5, version 2.0. Lyon, France: IARC Press, 2004.

García-Piñares AJ, Hildesheim A, Herrero R, Trivett M, Williams M, Atmetlla I, Ramírez M, Villegas M, Schiffman M, Rodríguez AC, Burk RD, Hildesheim M, Freer E, Bonilla J, Bratti C, Berzofsky JA, Pinto LA (2006) Persistent Human Papillomavirus Infection is Associated with a Generalized Decrease in Immune Responsivness in Older Women. Cancer Res. 66, 11070-11076.

Grce M, Grahovac B, Rukavina T, Vrdoljak-Mozetic D, Glavas-Obrovac L, Kaliterna V, Zele-Starcevic L (2007) HPV testing for cervical screening in Croatia. Coll Antropol. 31, 67-71.

Guo M, Gong Y, Deavers M, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Luthra R, Lin E, Lai HC, Zhang W, Sneige N (2008) Evaluation of a Commercialized In Situ Hybridization Assay for Detecting Human Papillomavirus DNA in Tissue Specimens from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma. Journal of Clinical Microbiology. 46, 274-280.

Halfon P, Trepo E, Antoniotti G, Bernot C, Cart-Lamy P, Khiri H, Thibaud D, Marron J, Martineau A, Pénaranda G, Benmoura D, Blanc B (2007) Prospective Evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Tests for Detection of 13 High-Risk HPV Genotypes in Atypical Squamous Cells of Uncertain Significance. Journal of Clinical Microbiology. 45, 313-316.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, HZJZ (2009) Godišnje izvješće oboljelih od raka vrata maternice. http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm.

Kleter B, van Doorn L-J, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen, Burger M, ter Harmsel B, Quint W (1998) Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses. American Journal of Pathology. 153, 1731-1739.

Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J, Wheeler CM, Castle PE (2006) Human Papillomavirus Testing Following Loop Electrosurgical Excision Procedure Identifies Women at Risk for Posttreatment Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 or 3 Disease. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 15, 908-914.

Lenselink CH, Melchers WJG, Quint WGV, Hoebers AMJ, Hendriks JCM, Massuger LFAG, Bekkers RLM (2008) Sexual Behaviour and HPV Infections in 18 to 29 Year Old Women in the Pre-Vaccine Era in the Netherlands. PloS one. 3, 1-10.

López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M (2008) Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Infectious Agents and Cancer. 3, 1-13.

Lowy DR, Schiller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. J. Clin. Invest. 116, 1167-1173.

Milutin-Gašperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M (2007) Retrospective Study of the Prevalence of High-Risk Human Papillomaviruses among Croatian Women. Coll Antropol. 31, 89-96.

Rous FP, Beard JW (1935) The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). J. Exp. Med. 62, 523-548.

Sabol I, Salakova M, Smahelova J, Pawlita M, Schmitt M, Milutin-Gašperov N, Grce M, Tachezy R (2008) Evaluation of Different Techniques for Identification of Human Papillomavirus Types of Low Prevalence. Journal of Clinical Microbiology. 46, 1606-1613.

Sandri MT, Lentati P, Benini E, Dell`Orto P, Zorzino L, Carozzi FM, Maisonneuve P, Passerini R, Salvatici M, Casadio C, Boveri S, Sideri M (2006) Comparison of the Digene HC2 Assay and rhe Roche AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Test for Detection of High-Risk HPV Genotypes in Cervical Samples. Journal of Clinical Microbiology. 44, 2141-2146.

Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG, Goldie SJ, Harper DM, Kinney W, Moscicki A-B, Noller KL, Wheeler CM, Ades T, Andrews KS, Doroshenk MK, Green Kahn K, Schmidt C, Shafey O, Smith RA, Patridge EE, Garcia F (2007) American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. CA Cancer J. Clin. 57, 7-28.

Schiffman M (2007) Integration of Human Papillomavirus Vaccination, Cytology and Human Papillomavirus Testing. Cancer Cytopathology. 111, 145-153.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S (2007) Human Papillomavirus and cervical cancer. Lancet. 370, 890-907.

Tovar JM, Bazaldua OV, Vargas L, Reile E (2008) Human Pappilomavirus, Cervical Cancer and the Vaccines. Postgraduate Medicine. 120, 109-111.

van Hamont D, van Ham MAPC, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG (2006) Evaluation of the SPF_{10}-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. Journal of Clinical Microbiology. 44, 3122-3129.

Znaor A, Strnad M (2007) Cervical Cancer in Croatia: State of the Art and Possibilities for Prevention. Coll Antropol. 31, 37-40.

zur Hausen H (1977) Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr. Top Microbiol. Immunol. 78, 1-30.

zur Hausen H (1988) Papillomaviruses in human cancers. Mol. Carcinog. 1, 147-150.