

Opće županijska bolnica Požega, Služba za ginekologiju i porodništvo;
Klinika za tumore u Zagrebu, Odjel za ginekologiju*

INFEKCIJA VRATA MATERNICE PAPILOMA VIRUSOM ČOVJEKA (HPV) U POŽEŠKOJ REGIJI HUMAN PAPILOMAVIRUS (HPV) INFECTION OF UTERINE CERVIX IN POŽEGA REGION

*Damir Hodžić, Rastislav Navratil, Renata Rališ, Damir Eljuga**

Pregled

Ključne riječi: tipizacija HPV, genitalne infekcije žena, sprječavanje raka vrata maternice

SAŽETAK. Cilj rada. Opća pojavnost infekcije HPV nije poznata, ali je kao najčešća spolno prenosiva bolest nazočna u 20 do 40% spolno aktivnih žena. Poznato je da se HPV za sada ne može posve iskorijeniti niti jednim poznatim liječenjem. Sukladno brojnim literaturnim izvješćima, očevitna je povezanost HPV (human papilloma virus) s razvojem raka vrata maternice. Uzevši u obzir te činjenice, neupitna je važnost sprječavanja, odnosno učinkovitog liječenja genitalnih infekcija u žena. **Metode.** U razdoblju od svibnja 2001. do svibnja 2002. u Ginekološkoj poliklinici Opće županijske bolnice Požega liječeno je ukupno 66 bolesnica s HPV povezanim promjenama u citološkom obrisku vrata maternice i/ili kroničnom upalom donjeg genitalnog trakta. U svih bolesnica uzet je endocervikalni obrisak za mikrobiološku pretragu te identifikaciju, odnosno tipizaciju HPV metodom PCR. **Rezultati.** Od ukupno 66 bolesnica 37 (56,06%) ih je bilo HPV pozitivno. Među tim bolesnicama u 19 njih (51,35%) nađen je HPV-16, u 15 (40,54%) HPV neodređenog tipa, u 2 (5,41%) HPV-33, a u 1 (2,70%) bolesnice HPV-6, -11. Od svih 66 bolesnica, samo ih je 15 (22,73%) imalo sterilan mikrobiološki endocervikalni obrisak, od čega ih je 11 (73,33%) bilo HPV pozitivno. Sve ostale bolesnice imale su mikrobiološki potvrđenu kolonizaciju te su ciljano liječene antibioticima. U 3 (5,88%) bolesnice nađena je ponovna infekcija, te je liječenje ponovljeno prikladnijim antibiotikom. Bile su 24 (36,36%) nulipare, od kojih je 16 (66,67%) bilo HPV pozitivno. Najmlađa bolesnica imala je 19 godina, a najstarija 75. U skupini do 19 godina bile su 2 bolesnice, od kojih je 1 (50,00%) bila HPV pozitivna. U skupini od 20–29 godina bilo je 26 bolesnica od kojih 15 (57,69%) HPV pozitivno. U skupini od 30–39 godina bile su 22 bolesnice, od kojih je 13 (59,09%) bilo HPV pozitivnih. U skupini od 40–49 godina bilo je 10 bolesnica, od kojih je 5 (50,00%) bilo HPV pozitivno. U skupini od 50 i više godina bilo je 6 bolesnica od kojih je 3 (50,00%) HPV pozitivno. **Zaključak.** Otkrivanje i liječenje cerviko-vaginalnih infekcija, posebice one HPV-om, može spriječiti razvoj neoplazija vrata maternice.

Review

Key words: HPV typing, female genital infection, cervical cancer prevention

SUMMARY. Objective. The prevalence of HPV infection is unknown, but HPV infection, as most common sexually transmitted disease, occurs in 20–40% sexually active women. It is the fact that HPV, up to now, cannot be completely eradicated by any known therapy. According to recent literature reports, the HPV infection obviously correlates with developing of cervical cancer. Knowing these facts, the importance of the prevention of infections of lower genital tract is easily understandable as well as proper treatment. **Methods.** Between May 2001 and May 2002 at Gynecological Polyclinic of Požega County General Hospital 66 women with HPV suspect Pap smear or with chronic and persistent inflammation of lower genital tract were treated. In all of them endocervical smear for microbiological analysis was taken, as well as endocervical cyto-brush for HPV DNA identification by PCR method. **Results.** From all 66 patients, 37 (56.06%) were HPV positive. In 19 (51.35%) of them HPV-16 was found, in 15 (40.54%) there was HPV of undetermined type, in 2 (5.41%) HPV-33, and in 1 (2.70%) HPV-6. Among all patients, only in 15 (22.73%) of them no microbiological agent was isolated; out of these, 11 (73.33%) were HPV positive. All other patients with proven infection of lower genital tract were specifically treated with antibiotics. Recurrent infection occurred in 3 (5.88%) patients, and treatment was repeated with other suitable antibiotics. Nulliparae were 24 (36.36%), out of which 16 (66.67%) were HPV positive. The youngest patient was 19, and the oldest 75 years old. In the group to 19 years old there were 2 patients and 1 (50.00%) was HPV positive. In the 20–29 years old group there were 26 patients, out of them 15 (57.69%) were HPV positive. In the 30–39 years old group there were 22 patients, out of them 13 (59.09%) were HPV positive. In the 40–49 years old group there were 10 patients, out of them 5 (50.00%) were HPV positive. In the group 50 and older, there were 6 patients, out of them 3 (50.00%) were HPV positive. **Conclusion.** The detection and a treatment of cervico-vaginal infections, especially of those with HPV, may prevent the development of the neoplasia of uterine cervix.

Epidemiologija raka vrata maternice

Rak vrata maternice danas je drugi najčešći zloćudni tumor ženske populacije u gotovo svim dijelovima svijeta,

a po učestalosti ga nadmašuje samo rak dojke. Naime, svjetske statistike bilježe oko 60 bolesnica s rakom dojke te oko 50 bolesnica s rakom vrata maternice na 100.000 žena; od njih će polovica umrijeti usprkos najsuvremenijeg liječenja. Primjerice, iako je danas moguće liječiti

više od 95% bolesnica s rakom vrata maternice, u Sjedinjenim Državama godišnje umire njih oko 80.000. Prosječna pojavnost raka vrata maternice u svijetu kreće se 6–12%, što čini 35–75% svih zloćudnih tumora ženskoga spolnog sustava, a godišnje se na 100.000 žena bilježi 30–35 novootkrivenih bolesnica. Tijekom života od raka vrata maternice obolijeva oko 4% žena, najčešće u dobi između 30–49 godina. Većinom se javlja nakon 25 godina, s vrhuncem pojavnosti između 48 i 55 godina, a medijan dobi u vrijeme dijagnoze je oko 51,5 godina. Kod CIS-a je dob bolesnica u vrijeme dijagnoze znatno niža, te se javlja već nakon 20 godina života, a najčešće između 25. i 39. godine.¹⁻⁴

Godišnje se u Hrvatskoj bilježi oko 960 novih bolesnica od raka vrata maternice, od čega se u polovici radi o preinvazivnom obliku. Prema novijim podacima, rak vrata maternice u Hrvatskoj čini 6% svih novootkrivenih zloćudnih tumora u žena, odnosno gotovo 1/3 svih ginekoloških karcinoma, što godišnje iznosi 15,3 novih slučajeva na 100.000 žena. Pojavnost invazivnog raka vrata maternice u Hrvatskoj neprekidno se smanjuje od 1970-tih godina uz postupno sniženje mortaliteta, dok je pojavnost preinvazivnog raka tijekom istog razdoblja u znatnom porastu, razmjerno bržem od smanjenja pojavnosti invazivnog raka. Specifični mortalitet od raka vrata maternice u Hrvatskoj iznosi 4,3 što je oko 6 puta manje od raka dojke, odnosno 3 puta manje od raka bronha, a najviši je u žena dobi 60 i više godina.¹⁻⁴

Nastanku invazivnog raka vrata maternice prethode cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN 1–3), odnosno skvamozne intraepitelne lezije te preinvazivni oblik *karcinom in situ* (CIS). Kod CIS je dob bolesnica u vrijeme dijagnoze znatno niža, te se javlja već nakon 20 godina života, a najčešće između 25. i 39. godine kao posljedica sve ranijeg početka spolne aktivnosti (seksarhe). Napredovanje displazije do CIS traje kod lakih displazija oko 7 godina, kod srednje teških displazija oko 3 godine, a kod teških displazija oko 1 godinu; napredovanje CIS u invazivni rak vrata maternice traje 5–10 godina, iako to razdoblje može biti dulje ili kraće.^{5,6}

Zahvaljujući jednostavnosti i pouzdanosti probira Papatestom rak vrata maternice moguće je otkriti u pretkliničkom stadiju (CIS) kada još nema izraženih simptoma bolesti, a 100%-tno izlječenje moguće je jednostavnim i poštenim kirurškim zahvatom, konizacijom. Nasuprot tome, uznapredovali rak vrata maternice iziskuje radikalno kirurško liječenje (Wertheimova operacija, zdjelična eksenteracija), te radio- i kemoterapiju sa svim neugodnim nuspojavama i kasnijim posljedicama. Stoga, otkrivanje raka vrata maternice u početnoj fazi bolesti znači ne samo potpuno izlječenje i spašen život, nego i potpuno očuvanje tjelesnog integriteta bolesnice uz normalan nastavak spolnog života, te očuvanje njezine reproduktivne sposobnosti.

Iako točan mehanizam nastanka raka vrata maternice do danas nije posve razjašnjen, jasno su utvrđene rizične skupine pučanstva i pospješujući učinci, primjerice promiskuitet, virusna infekcije, pušenje i sl. Brojna epidemiološka istraživanja pokazala su, primjerice, da je rak

vrata maternice najčešći u žena niskoga socijalnoekonomskog statusa, zatim onih koje su rano stupile u spolne odnose, imale velik broj spolnih partnera, rano začele, te imale veći broj poroda i/ili pobačaja. Prostitutke su se pokazale osobito važnim izvorom papilomavirusa čovjeka (HPV) visokog rizika, a također je potvrđena uloga muškaraca kao vektora HPV odgovornih za nastanak raka vrata maternice. Naime, utvrđeno je da broj spolnih partnerica tijekom života, posebice prostitutki i detekcija HPV u penisu muškaraca nose rizik za izloženost njihovih supruga infekciji HPV i raku vrata maternice. Muškarci koji su naveli velik broj spolnih partnerica uvelike su dokazani vektori HPV visoka rizika, čime svoje supruge stavljaju u skupinu visoka rizika za nastanak raka vrata maternice. Rizik razvoja raka vrata maternice također je malo veći u žena koje žive s muževima čije su bivše supruge imale rak vrata maternice.⁷⁻¹¹

Uloga HPV u nastanku i razvoju raka vrata maternice

Danas je nedvojbeno utvrđena važnost HPV kao glavnog čimbenika i promotora u razvoju neoplazija vrata maternice. Od kako je Zur Hausen prvi put 1976. godine ustanovio moguću ulogu HPV u etiologiji pločastog karcinoma vrata maternice, te objavio hipotezu o HPV kao jednom od uzročnih činitelja raka vrata maternice, u Republici Hrvatskoj također počinje zanimanje za proučavanje utjecaja HPV na cervikalnu intraepitelnu neoplaziju.^{7,11-26} Do danas je u svijetu brojnim epidemiološkim istraživanjima potvrđeno kako su određeni tipovi HPV činitelji raka vrata maternice. Naime, nazočnost DNA HPV u bioptičkom materijalu raka vrata maternice u preko 90%, kao i rezultati brojnih eksperimentalnih istraživanja, uvelike doprinose potvrdi Zur Hausenove hipoteze.²⁷⁻³⁰

Infekcija HPV je spolno prenosiva bolest nazočna u 20 do 40% spolno aktivnih žena. Tako je, primjerice, najveća učestalost HPV infekcija u žena u dobi od 20 do 25 godina, te se kreće od 10 do 20%, dok se učestalost znatno smanjuje nakon dobi od 35 godina, na 1,5 do 3,5%.^{2,5,14,15,31,32} Osim toga, u gotovo 50% intraepitelnih neoplazija vrata maternice može se dokazati infekcija HPV, iako oko 60% žena s infekcijom HPV ima normalan citološki nalaz i nema kliničke znakove upale.

Prema riziku nastanka preinvazivnih promjena i raka vrata maternice, odnosno prema onkogenom djelovanju, HPV se dijele na tipove niskog rizika (6, 11 i ostali), te visokog rizika (16, 18 i ostali). Pri tome su HPV-6 i -11 česti kod neneoplastičnih condylomata accuminata i slabog su onkogeno potencijala, ako se ne promijene ili ne povežu s jakim sučiniteljima, dok su HPV-16 i -18 (a rjeđe -31, -34, -35) česti kod CIN, te invazivnog raka vrata maternice.^{9,13,33}

Poznato je, nadalje, da su bolesnice s HPV visokog rizika sklone bržem razvoju raka vrata maternice.^{21,34,35} Primjerice, iako prosječno vrijeme prijelaza displazije vrata maternice u invazivni rak iznosi 5 do 7 godina, Syrjanen i sur.³⁶ iznose primjer višestruke infekcije HPV

16/18 vrata maternice, u kojeg je CIN 1 progredirao u invazivni rak vrata maternice za manje od 3 godine.

Trajna nazočnost virusne DNA u većine bolesnica s rakom vrata maternice, te čak i u metastazama limfnih čvorova, pokazuje značajnu ulogu HPV u održavanju zloćudnog procesa.^{11,37} Izuzetak je, međutim, rak svijetlih stanica (»clear cell«) vrata maternice koji može biti uzrokovan intrauterinom izloženosti diethylstilbestrolu (DES), ali može nastati i bez njegovog utjecaja, te se javlja već u dječjoj dobi, kao i u spolno inaktivnih bolesnica (djevice). Stoga je danas gotovo opće prihvaćeno stajalište da HPV uzrokuje pločasti rak vrata maternice, vjerojatno nema pločastog raka vrata maternice bez HPV infekcije. Prema nekim izvješćima, HPV je nazočan u 100% invazivnih oblika raka vrata maternice, a eventualna manja zastupljenost pripisuje se nedovoljno osjetljivoj tehnici otkrivanja ili lošoj kvaliteti uzorka.

Klinička iskustva pokazuju da je vrat maternice sijelo gdje nakon infekcije HPV nastaju zloćudne promjene češće nego na stidnici, rodnici ili čmaru, moguće stoga što je na vratu maternice posebno učestala infekcija HPV visokog rizika, posebice tipa HPV-16. Također je ustanovljeno^{12,36,38} da zbog infekcije HPV 2 do 3% mladih žena u populaciji tijekom jedne godine razvije nenormalnost epitela vrata maternice, što u Hrvatskoj iznosi njih nekoliko desetaka tisuća.

U Republici Hrvatskoj infekcija HPV je najzastupljenija kod mladih žena, s vrhuncem učestalosti u 22. godini života, a u većini slučajeva dolazi od spontanog samozlječenja.^{14,16,17,33} Samo mali broj inficiranih žena postaje kronični nositelj virusa i upravo su one pod najvećim rizikom od nastanka raka vrata maternice. Relativni rizik od nastanka raka vrata maternice je oko 65 puta veći u HPV-pozitivnih žena u odnosu na HPV-negativne, a također je ustanovljeno da u žena s kroničnom HPV infekcijom postoji 200 puta veći rizik od progresije normalnog Papa-nalaza kod CIN 2 i/ili 3 u dvogodišnjem razdoblju u odnosu na HPV negativne žene.^{4,12}

Onkogeno djelovanje HPV

Prije gotovo četvrt stoljeća ništa se nije znalo o HPV, jer se ti virusi teško uzgajaju na staničnim kulturama ili životinjama. Te poteškoće su prevladane kada je kloniran virusni genom. Danas je molekularno klonirano i sekvencionirano preko 85 različitih, od kojih je preko 40 povezano s promjenama u spolnome sustavu.^{8,39} Široka primjena genoma HPV u eksperimentalnim i epidemiološkim istraživanjima omogućila je upoznavanje njihove biološke naravi. HPV pripadaju porodici Papovaviridae čiji se genom sastoji od dvočlane molekule DNA veličine oko 8.000 parova baza (ili 8 kb). Infekcija HPV klinički se može manifestirati kao latentna minimalno izražena infekcija (prisutna DNA HPV), te kao aktivna bolest, što uključuje genitalne kondilome, cervikalnu displaziju, odnosno rak vrata maternice.

Glavna karakteristika HPV visokog rizika jest ugradnja njihova genoma u genom stanice domaćina, za razliku od HPV niskog rizika čiji genom ostaje u episomalnoj formi. Nakon ugradnje virusne DNA u genom stanice

domaćina, pojačana je ekspresija virusnih onkogenih E5, E6 i E7, te sinteza odgovarajućih proteina. Transfekcija onkogenima E6 i E7 HPV visokog rizika može humane keratinocite u staničnoj kulturi učiniti »besmrtnima«, a njihov daljnji rast na masi kolagena ili u mišje mladunčadi može proizvesti histološke oblike gotovo identične CIN-u 3.¹²

Proteini E5, E6 i E7 na različite načine interferiraju s normalnim mehanizmima kontrole stanične diobe. Tako E7 protein disocira kompleks proteina pRB tumor supresora i faktora transkripcije E2F koji je aktivan u G0 i G1 fazi staničnog ciklusa. Oslobođeni E2F aktivira ekspresiju gena regulatora staničnog ciklusa kao što su *c-myc*, timidin kinaza, te DNA polimeraza, a koji su potrebni za ulazak u S fazu staničnog ciklusa. E7 protein nadalje sprečava vezanje pRB za DNA, što onemogućuje inhibiciju staničnog rasta preko pRB. Proteini E7 niskorizičnih HPV-6 i -11 vežu se manjom prijemčivošću za pRB od proteina E7 visokorizičnih HPV-16 i -18.^{34,40,41}

Protein E6 HPV-16 i -18 stvara kompleks sa tumor supresorom p53, te na taj način započinje njegovu razgradnju. Inače, uloga proteina p53 jest održavanje integriteta staničnog genoma. Inaktivacija p53 putem E6 doводи do nakupljanja genskih oštećenja i na taj način doprinosi napredovanju tumora.⁴²

Protein E5 stvara kompleks s p16 komponentom vakuolarnog ATP-aze koja sudjeluje u unutarstaničnom zakiseljenju. Osim toga, on pojačava djelovanje epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor*) unutar stanice putem hiperfosforilacije njegovih receptora čime inhibira njihovu razgradnju. Smatra se da E5 također pridonosi inhibiciji lizosomske razgradnje EGFR receptora.^{31,43}

Dijagnostika HPV

HPV visokog rizika ima izraziti citopatogeni učinak, koji se citološki i histološki očituje nazočnošću koilocita tj. epitelnih stanica s perinuklearnom citoplazmatskom vakuolizacijom i povećanom jezgrom. Koilocitoza je značajno učestalija u bolesnica s cervikalnom atipijom, a kolilociti se danas, zbog promjena seksualnog ponašanja, javljaju u sve mlađih dobnih skupina žena.^{44,45}

Ovisno o dobi inficirane bolesnice, sijelu i naravi infekcije HPV, osjetljivost citologije kreće se 30 do 90%, a kako bi se povećala dijagnostička osjetljivost i posebnost, uvedene su neke nove tehnike. Tako se, primjerice, antigen površine virusa može dokazati enzimskim imunoesejem (EIA, engl. *enzyme-linked immunoassay*); ovaj antigen nazočan je u oko 50% HPV promjena, no rjeđe ako je infekcija uzrokovana visokorizičnim HPV-16 i -18. U novije vrijeme uvedena je i serološka pretraga u dijagnostici infekcija HPV (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), a kao antigen rabi se kapsida proteina L1.^{22,39,46}

Nadalje, kao što je poznato, postoje mnoge metode identifikacije i genotipizacije HPV, većinom na temelju detekcije virusnog genoma (DNA) ili produkata virusne transkripcije (RNA). Te su metode temeljene na postup-

cima hibridizacije koje uključuju *Southern blot*, *Northern blot*, točkastu hibridizaciju, *Filter in situ* hibridizaciju, *in situ* hibridizaciju (ISH), *Hybride Capture II* (HC II).^{8,13,47–51} Različitost raspoloživih postupaka detekcije omogućuje daljnji porast osjetljivosti tih metoda. Nadalje, virusna DNA i RNA također se može otkriti metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*), u serijama selektivne i eksponencijalne amplifikacije nukleinskih kiselina nazočnih u biološkim uzorcima.^{16–19,20,52}

Osjetljivost i posebnost ranije spomenutih metoda široko varira, te je stoga vrlo važno razmotriti koja će se metoda primijeniti. Za analizu virusnog genoma, *Southern blot* hibridizacija odlična je metoda koja može pružiti kvalitetne podatke, količinu i tip virusa, ali je skupa, dugotrajna, te iziskuje obilne količine visoko pročišćene DNA. Provedba detekcije HPV u programima probira raka vrata maternice zahtijeva postupke visoke osjetljivosti i posebnosti. Idealni testovi trebali bi biti jednostavni za primjenu, ekonomski isplativi, te pouzdani u detekciji klinički suspektne osobe.^{14,15}

Danas se široko primjenjuju dvije metode podjednake osjetljivosti i posebnosti; HC 2 te PCR. Dok HC 2 otkriva 18 najčešćih i klinički značajnih tipova HPV jednostavnijim postupkom, PCR je potencijalno sposobniji u detekciji svih mukoznih HPV.^{14,20,53} Osim toga, PCR omogućuje tipizaciju pojedinih tipova HPV.^{16,17,20} Identifikacija preko 40 tipova HPV može se također postići točkastom hibridizacijom primjenom multiplih, tipski specifičnih podloga.²⁶

S obzirom na navedeno pri sumnji na infekciju HPV vrlo je korisno radi procjene rizičnosti virusa i primjene učinkovitog liječenja učiniti detekciju i/ili genotipizaciju HPV (u daljnjem tekstu tipizaciju) metodama hibridizacije ili PCR.^{25,54–57}

Smatra se, nadalje, da se kombinacijom Papa-testa i pretraga DNA HPV postiže novčana ušteda, jer negativnost oba testa smanjuje potrebu za češćom kontrolom, te se razmaci između dvije kontrole mogu produžiti i na pet godina. Također se smanjuje potreba za dodatnom ginekološkom obradom (kolposkopija) u žena s blagim citološkim nenormalnostima, jer se one s HPV-negativnim nalazom mogu uzeti u obzir kao niskorizične, te je u njih dovoljno ponoviti Papa-test nakon godinu dana. U žena s ASCUS ili CIN 1, ako su HPV-pozitivne, valja učiniti kolposkopiju i sukladno nalazu odabrati primjeren način liječenja.^{5,32,58}

S obzirom na visoki udio mladih žena s HPV infekcijom, važna je edukacija tih žena, kao i njihovih spolnih partnera. Promicanje barijernih sredstava zaštite (»safe sex«), te pojačan zdravstveni nadzor ugroženih skupina (prostitutke, ovisnici o heroinu, HIV-pozitivne osobe), trebaju doprinijeti dugoročnom programu suzbijanja infekcija HPV, a time i raka vrata maternice. Sukladno tome, detekcija virusa treba biti sastavnicom dijagnostičkog postupka intraepitelnih neoplazija svih stupnjeva, posebice u mladih žena i nulipara, iako za sada ne i metoda širokog probira u općoj populaciji žena. Praktičnu ulogu tipizacije HPV metodom PCR u sekundarnoj pre-

venciji raka vrata maternice, kao i njezin »cost-benefit« valja nepristrano razmotriti, te prospektivno ispitati tijekom razumnog vremenskog razdoblja.^{5,8,15,58,59}

Ispitanice i način rada

U istraživanje je prospektivno uključeno 66 bolesnica s promjenama u citološkom obrisku vrata maternice suspektne na HPV. U svih bolesnica iz te skupine ispitana je u obriscima vrata maternice prisutnost HPV, klamidija, mikoplazmi, ureaplazmi, trihomonas vaginalisa, aeroba i anaeroba. Sukladno nalazu, u svih je provedeno kombinirano peroralno i lokalno liječenje. Uporabljani su preparati »Plive«: azitromicin (Sumamed), doksiciklin (Hiramycin), oksitetraciklin (Geomycin), klotrimazol (Plimycol), amoksicilin (Amoxil), cefaleksin (Ceporex), nistatin (Nistatin), nistatin + oksitetraciklin (Geonistin).

Prilikom redovitih kontrolnih pregleda ponavljan je Papa-test, tipizacija HPV, te mikrobiološke analize radi objektivnog praćenja i procjena učinkovitosti provedenog liječenja. Klinička, citološka i mikrobiološka obrada bolesnica provedena je u Odjelu za ginekologiju, te Citološkom i Mikrobiološkom laboratoriju Opće županijske bolnice Požega.

Citološki obrisak uziman je standardnim postupkom VCE razmaza (rodnice, porcije i endocerviksa), a nalaz je klasificiran prema Jedinstvenoj klasifikaciji citoloških nalaza vrata maternice u Hrvatskoj.⁶⁰

Identifikacija *Chlamydiae trachomatis* provedena je *Chlamydia Direct IF*-testom (BioMerieux), putem direktne imunofluorescencije pomoću dvaju fluorescein-konjugiranih monoklonskih protutijela protiv različitih antigen-skih struktura (I. prepoznaje epitop većeg proteina vanjske membrane, izvorno nađenog u vanstaničnim elementarnim tjelešcima; II. usmjereno protiv grupno-specifičnog antigena, prepoznaje lipopolisaharidne strukture nazočne u svim stadijima razvojnog ciklusa: elementarnim tjelešcima, retikularnim tjelešcima i inkluzijama).

Izolacija *Mycoplasmae hominis* i *Ureaplasmae urealyticum* provedena je pomoću *Mycoplasma-Lyo*-testa (BioMerieux), inokulacijom na urea-argininskom bujonu i krvnom agaru, te inkubacijom od 24 do 48 sati na temperaturi od 37°C.

Trichomona vaginalis izoliran je na dvofaznoj hranjivoj podlozi po Diamondu (hranjivi bujon, konjski serum, vitamini, mikostatik), koja se sastoji od krutog ukošenog i tekućeg dijela. Inokulum se unosi u tekući dio uz istodobno dodavanje penicilina radi prigušenja bujnog rasta bakterija. Podloga se inkubira na temperaturi od 37°C, te prenošenjem subkultivira svakih 48 sati.

Aerobne bakterije izolirane su na krvnom agaru i bujonu inkubacijom od 24 sati na temperaturi od 37°C, a *anaerobne bakterije* pomoću »Generbox« anaerobindikatora na Columbia-podlozi inkubacijom od 48 sati na temperaturi od 37°C.

Pretraživanje i tipizacija HPV obavljena je metodom PCR u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta »Ruđer Bošković« u Zagrebu.

Statistička, grafička i tekstualna obrada učinjena je softverskim paketom »Microsoft Windows 98«.

Rezultati

Od ukupno 66 bolesnica 37 (56,06%) ih je bilo HPV pozitivno (tablica 1.). Među tim 37 bolesnicama, u 19 njih (51,35%) nađen je HPV-16, u 15 (40,54%) HPV

Tablica 1. Bolesnice prema nalazu HPV
Table 1. The patients according to HPV positivity

	N	%
HPV pozitivne	37	56,06
HPV negativne	29	43,94
Ukupno – Total	66	100,00

neodređenog tipa, u 2 (5,41%) HPV-33, a u 1 (2,70%) bolesnice HPV-6, -11 (tablica 2.). Bilo je 24 (36,36%) nulipare, od kojih je 16 (66,67%) bilo HPV pozitivno (tablica 3.).

Najmlađa bolesnica imala je 19 godina, a najstarija 75. U skupini do 19 godina bile su 2 bolesnice, od kojih je 1 (50,00%) bila HPV pozitivna. U skupini od 20–29

Tablica – Table 4. Bolesnice prema životnoj dobi i tipu HPV – The patients according to the age and HPV type

Dob – Age	HPV neg.		HPV16		HPV 33		HPV neut.		HPV 6, 11	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<20	1	3,45	1	5,26	0	0	0	0,00	0	0
20–29	11	37,93	9	47,37	1	50,00	5	33,33	0	0
30–39	9	31,03	5	26,32	1	50,00	7	46,67	0	0
40–49	5	17,24	3	15,79	0	0	1	6,67	1	100,00
>49	3	10,34	1	5,26	0	0	2	13,33	0	0
Ukupno – Total	29	100,00	19	100,00	2	100,00	15	100,00	1	100,00

Tablica 5. HPV pozitivne i negativne bolesnice u odnosu na mikrobiološki nalaz

Table 5. HPV positive and negative patients in relation to microbiological finding

	Sterilan		Pozitivan	
	N	%	N	%
HPV pozitivne	11	73,33	26	50,98
HPV negativne	4	26,67	25	49,02
Ukupno – Total	15	100,00	51	100,00

godina bilo je 6 bolesnica od kojih je 3 (50,00%) HPV pozitivno (tablica 4.).

Od svih bolesnica, samo ih je 15 (22,73%) imalo mikrobiološki sterilan endocervikalni obrisak, od čega ih je 11 (73,33%) bilo HPV pozitivno (tablica 5.). Sve ostale bolesnice imale su mikrobiološki potvrđenu genitalnu infekciju, koja je ciljano liječena antibioticima. U 3 (5,88%) bolesnice nađena je ponovna infekcija, te je liječenje ponovljeno prikladnijim antibiotikom.

Od ukupno 67 različitih mikrobioloških agensa iz endocervikalnog obriska u 51 bolesnice, najčešće je izoli-

Tablica 2. Bolesnice prema tipu HPV
Table 2. The patients to the HPV type

HPV type	N	%
-16	19	51,35
-33	2	5,41
-6, -11	1	2,70
Neutvrđeno Non-established	15	40,54
Ukupno – Total	37	100,00

Tablica 3. Bolesnice prema paritetu
Table 3. The patients according to parity

	Nulipare		Pluripare	
	N	%	N	%
HPV pozitivne	16	66,67	21	50,00
HPV negativne	8	33,33	21	50,00
Ukupno – Total	24	100,00	42	100,00

godina bilo je 26 bolesnica od kojih je 15 (57,69%) HPV pozitivno. U skupini od 30–39 godina bile su 22 bolesnice, od kojih je 13 (59,09%) bilo HPV pozitivnih. U skupini od 40–49 godina bilo je 10 bolesnica, od kojih je 5 (50,00%) bilo HPV pozitivno. U skupini od 50 i više

ran stafilokok (20; 29,85%), trihomonas (17; 25,37%), te klamidija (7; 10,45%), dok su ostali mikrobiološki uzročnici nađeni u pojedinačnom udjelu ispod 10,0% (tablica 6.). S obzirom na nalaz HPV, mikrobiološki uzročnici bili su gotovo podjednako raspoređeni u obje promatrane skupine bolesnica, osim stafilokoka, koji su

Tablica 6. Učestalost pojedinih uzročnika izoliranih iz endocervikalnog obriska

Table 6. The frequency of single agents isolated from endocervical smear

Uzročnik	N	%
Chlamydia	7	10,45
Mycoplasma	2	2,99
Ureaplasma	4	5,97
Trichomonas vag.	17	25,37
Candida alb.	6	8,95
E. coli	6	8,95
Staphylococcus	20	29,85
Enterococcus	3	4,48
Ostalo – The rest	2	2,99
Ukupno – Total	67	100,00

Tablica 7. Odnos HPV i pojedinih uzročnika izoliranih iz endocervikalnog obrisaka

Table 7. The relation of HPV to single agents isolated from cervical smear

Uzročnik	HPV pozitivne		HPV negativne		χ^2	p
	N	%	N	%		
Chlamydia	4	11,43	3	9,38	0,08	n.s.
Mycoplasma	0	0	2	6,25	2,26	n.s.
Ureaplasma	2	5,71	2	6,25	0,18	n.s.
Trichomonas vag.	8	22,86	9	28,12	0,25	n.s.
Candida alb.	3	8,57	3	9,38	0,10	n.s.
E. coli	3	8,57	3	9,38	0,10	n.s.
Staphylococcus	13	37,14	7	21,87	1,86	n.s.
Enterococcus	1	2,86	2	6,25	0,45	n.s.
Ostalo	1	2,86	1	3,12	0,43	n.s.
Ukupno – Total	35	100,00	32	100,00	4,21	n.s.

češće nađeni među HPV pozitivnim bolesnicama: 13/35 (37,14%) naspram 7/32 (21,87%) u HPV negativnih bolesnica ($\chi^2=1,86$, $p=n.s.$), te mikoplazmi koje su nađene samo u 2/32 (6,25%) HPV negativnih bolesnica ($\chi^2=2,26$, $p=n.s.$) (tablica 7.).

Rasprava

Zaključci velikog broja pretkliničkih, kliničkih i epidemioloških istraživanja diljem svijeta pokazuju da je rizik razvoja ginekoloških novotvorina, posebice raka vrata maternice, u sprezi s učestalošću spolno prenosivih bolesti (SPB) u žena, posebice infekcijama HPV. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije godišnje se u svijetu zabilježi oko 250.000.000 novih slučajeva spolno prenosivih genitalnih infekcija, od čega gotovo 50% čine infekcije trihomonomom (TV), 20% klamidijске infekcije, 8% infekcije herpes simpleks virusom (HSV), te 3% infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV).^{12,57}

Spolno prenosive bolesti zbog svoje rasprostranjenosti i komplikacija predstavljaju svjetski javnozdravstveni problem, a sa stajališta ginekološke struke njihovo je značenje u povezanosti s neplodnošću te premalignim i zloćudnim promjenama ženskog spolnog sustava. U novije vrijeme uočena je stopa porasta pretkliničkih oblika raka vrata maternice u adolescentica i mladih žena. Danas je pojavnost CIS-a u mladih žena gotovo 5 puta veća nego unatrag 20–30 godina, što se dovodi u svezu sa sve poznatijim biološkim karcinogenima koji se prenose spolnim putem, čemu vjerojatno pogoduje i veća spolna sloboda, te primjena kontracepcije.^{3,4,12,61,62}

Niz epidemioloških studija pokazuje da je kronična infekcija *specifičnim HPV*, naročito visoko onkogenim tipovima HPV-16 i -18, neovisan činitelj rizika za nastanak CIN i raka vrata maternice.^{10,20,56,59} Više od 90% cervikalnih kondiloma, svi stupnjevi CIN i invazivni karcinomi sadrže HPV DNA. Povezanost je jaka i tipski specifična, pri čemu su različiti tipovi HPV povezani s bitno različitim patološkim promjenama.

Najčešći je HPV-16 (50%), HPV-18 (14%), -45 (8%), -31 (5%), a zatim slijede HPV-6, -11, -26, -33, -35, -51, -52, -55, -56, -58, -64 i -68. Infekcija s HPV-18 karakteristična je za adenokarcinome i adenoskvamozne tumo-

re. Tipovi HPV-6, -11, -42, -43 i -44 rijetko se nalaze u pravim novotvorinama, dok se tipovi -16, -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52, -56 i -58 najčešće nalaze kod raka i neupitno premalignih promjena. Lezije su uglavnom određene tipom HPV i životnom dobi. CIN 1 i CIN 2 promjene javljaju se najčešće u bolesnica u ranim 20-tim godinama, CIN 3 i CIS u kasnim 20-tim i ranim 30-tim, dok se invazivni rak najčešće javlja u dobi između 40 do 49 godina.^{12,34,37,44,61,62}

Sukladno tome, u skupini od 250 ispitanica citološki i kolposkopski sumnjivih na infekciju HPV, Singer i sur.²³ bilježe njih 33,6% s HPV DNA, od čega je 9,5% ispitanica bilo s tipovima HPV niskog rizika (6/11), 47,9% s tipovima HPV visokog rizika (6/11), 35,7% s tipovima HPV srednjeg rizika (31/33/35) dok su njih 11,9% bile s raznim kombinacijama navedenih tipova HPV.

Primjenom metode točkaste hibridizacije, Sorić i sur.²⁶ našli su među 30 ispitanica njih 40% pozitivnih na HPV DNA, od čega je u polovici njih nađen HPV 16/18; također je potvrđena povezanost HPV 16/18 s višim stupnjevima cervikalne displazije.

Istraživanjem povezanosti HPV infekcije i atipije vrata maternice, Dexeus i sur.⁶³ utvrdili su na velikom uzorku da je od infekcije do pojave CIN potrebno 3–18 mjeseci, spontana regresija javlja se u 40% bolesnica, nalaz perzistira u njih 45%, a progredira u 15% bolesnica.

Prema istraživanju Audy-Jurković^{47,48} i Ovanin-Rakić,⁵⁰ s obzirom na težinu promjena pločastog epitela, ukupna pozitivnost infekcije HPV raste od Papa-nalaza bez atipije (42,8%) i blažih displazija (69,2%), preko teških displazija (81,2%) i CIS (74,2%) do mikroinvazivnog karcinoma (100%). Tipovi HPV visokog rizika (16/18) bili su najčešće zastupljeni kod CIS (82,6%), potom kod teških displazija (69,2%), te kod blažih displazija (44,5%). Tipovi HPV niskog rizika (6/11) najčešće su nađeni kod HPV infekcije bez atipije (66,6%), potom kod blažih displazija (33,3%), teških displazija (15,4%), te CIS (4,3%). Tipovi HPV srednjeg rizika (31/33/51) bili su podjednako zastupljeni u intraepitelnim promjenama stupnja 1 i 2 (22; 33,3%), dok su kod mikroinvazivnog karcinoma bili podjednako zastupljeni tipovi HPV srednjeg rizika (31/33/51) i visokog rizika (16/18).

Prema podacima Hellberga i sur.⁶⁴ tipovi HPV visokog rizika (16/18) najčešće se nalaze kod CIN 3 (78,3%), potom kod CIN 2 (63%) i CIN 1 (15,7%), a tipovi HPV niskog rizika najčešće se nalaze kod Papa-nalaza bez atipije (37,5%), te CIN 1 (25,5%), CIN 2 (18,7%) i CIN 3 (21,7%). Također je potvrđen visok udio regresija pločastih lezija povezanih s infekcijom HPV (56% slučajeva CIN 1, 53% CIN 2, te 14% CIN 3). Štoviše, udio regresije povećava se nakon dvije, četiri i sedam godina praćenja u 28%, 56% i 63,8% slučajeva, što pokazuje da su neke infekcije HPV vjerojatno prolazne zbog uspješnog imunološkog odgovora.³³

Sukladno tome, Singer i Šooš²⁴ izvijestili su o povoljnim rezultatima lokalnog liječenja humanim leukocitnim interferonom, posebice u bolesnica sa SIL-om nižeg stupnja. Od 176 bolesnica s displazijama vrata maternice, eradikacija nalaza zabilježena je u njih 41,5%, regresija

u niži stupanj CIN-a u 31,3%, a perzistencija nalaza u 27,3%, što se pokazalo značajno povoljnijim nego u poredbenoj skupini od 240 bolesnica koje nisu liječene interferonom. U bolesnica liječenih interferonom, za razliku od poredbene skupine neliječenih, nije bolest progredirala. Navedene rezultate, međutim, valja razmotriti objektivno i kritički, te ih ispitati prospektivnim kontroliranim randomiziranim studijama.

Povezanost **vaginalne trihomonijaze** i razvitka cervikalne neoplazije istražuje se već 30-tak godina. U žena inficiranih s trichomonas vaginalisom (TV) tako je nađeno 10 puta više suspektnih kolposkopskih nalaza nego u neinficiranih žena, te čak 3% suspektnih i pozitivnih citoloških nalaza, što je gotovo dvostruko češće nego u neinficiranih žena. S obzirom da TV izaziva upalu i ulceraciju pločastog epitela, smatra se da se time olakšava infekcija svim tipovima humanog papilloma virusa (HPV), pri čemu je infekcija specifičnim tipovima HPV-a dodatan nepovoljni činitelj, a postoji i pozitivna korelacija između TV i Papa-nalaza i pojave cervikalne displazije. Primjera radi, čak 30% žena s CIS-om ima trihomonozu, za razliku od samo 7,4% bez CIS-a; učestalost TV u žena s cervikalnom neoplazijom je 3,8%, odnosno 2,3% u onih s normalnim citološkim nalazom.^{12,57}

Dražančić i Ivić⁶⁵ su u 223 žene s trihomonasnom infekcijom našli značajno više kolposkopski suspektnih nalaza (32,7%), nego u 176 žena bez trihomonasne infekcije (3,4%). U citološkim razmazima trihomonas pozitivnih žena našli su 3,1% suspektnih ili pozitivnih nalaza (IIIa–IV), a niti jedan u trihomonas negativnih žena. Prateći histološke promjene u 75 bolesnica s atipijom vrata maternice, isti autori⁶⁶ zabilježili su nakon izlječenja infekcije regresiju promjena u svim slučajevima lake i teške displazije.

Od kada je **klamidija trahomatis** prvi put izolirana iz cerviksa, raspravlja se o njenoj mogućoj povezanosti s cervikalnom neoplazijom, uglavnom na temelju citoepidemioloških i seroepidemioloških istraživanja, izolacije klamidije kultivacijom, te kolposkopskih i patohistoloških nalaza. Pretpostavka da klamidija započinje metaplastički proces, odnosno mutagenim djelovanjem metabolita u kronično upaljenom tkivu djeluje kao inicijator neoplazije do sada još nije potvrđena ni »in vitro«, niti »in vivo«. Štoviše, analizom nekih kliničkih, citoloških, kolposkopskih, mikrobioloških i epidemioloških pokazatelja može se zaključiti da klamidija sama za sebe nije uzročno povezana s razvojem cervikalne neoplazije, nego je ona samo biljeg spolnog ponašanja dijela ženske populacije, odnosno njihovih partnera, koji ima povišen rizik za razvoj cervikalne neoplazije.^{11,12}

Moguća povezanost **bakterijske vaginoze** i CIN-a uglavnom se temelji na pretpostavci da anaerobne bakterije iz bakterijske vaginoze proizvode nitrozamine koji mogu djelovati kao kancerogeni, bilo samostalno, bilo u sinergističkoj interakciji s HPV. Tako se, primjerice, Gardnerella vaginalis može izolirati u 47% žena s CIN-om i 33% kontrola, dok se klinički znaci bakterijske vaginoze javljaju u 45% žena s CIN-om i 29% kontrola. Stoga je za razmotriti postoji li mogućnost sinergističke

reakcije abnormalne cervikovaginalne mikroflora i HPV u razvitku cervikalne neoplazije, posebice stoga što žene s neoplazijom imaju veću površinu prijelazne zone – metaplazije kao i česte koegzistirajuće spolno prenosive infekcije.

Povezanost bakterijske vaginoze i promiskuitetnog ponašanja statistički je značajna, kao i pozitivna korelacija između bakterijske vaginoze i cervikalne neoplazije, što podupire pretpostavku da metaboliti u kronično upaljenom tkivu mogu imati ulogu inicijatora u razvitku cervikalne neoplazije. Kako, međutim, nije razjašnjeno jesu li bakterijska vaginoza i cervikalna neoplazija povezane uzročno ili samo epidemiološki, a u većine spolno aktivnih žena rijetko se dobiva sterilan mikrobiološki nalaz endocervikalnog brisa, valja objektivno procijeniti može li se dijagnostikom bakterijskih vaginoza barem prepoznati subpopulacija žena s povišenim rizikom za cervikalne neoplazije. Tu, naime, skupinu valja kontinuirano kontrolirati klinički i citološki, jer imaju 2 puta veći rizik za razvoj cervikalne neoplazije od onih bez vaginoze.^{5,9,10,44,57}

Zaključak

Infekcija HPV, posebice onkogenim tipovima, povezana je s izrazito visokim rizikom razvoja neoplazije vrata maternice. U novije vrijeme bilježi se porast pojavnosti HPV infekcija u sve mlađih dobnih skupina, te drugih pridruženih genitalnih infekcija u žena, posebice *Chlamydia trachomatis* i *Trichomonas vaginalis*.

HPV se ne može posve iskorijeniti niti jednim poznatim liječenjem, ali se redovitim nadzorom tih bolesnica, liječenjem pridruženih infekcija, te eventualnom lokalnom primjenom antivirusnih agensa (humani leukocitni interferon) može smanjiti pojavnost neoplazije vrata maternice.

Tipizacija HPV u probiru raka vrata maternice je korisna kao:

1. nadopuna Papa-testu u primarnom probiru – povećanje osjetljivosti,
2. probir žena s graničnim nalazima Papa testa (CIN 1 i ASCUS): HPV-negativne žene s CIN 1 i ASCUS su pod minimalnim rizikom od progresije u invazivni oblik bolesti,
3. praćenje žena nakon terapije CIN-a: nalaz onkogenih HPV-a upućuje na nepotpuno odstranjenje displastičnih promjena, naročito u slučajevima kad je rezidua smještena visoko u cerviksu, te je na taj način teže dostupna otkrivanju Papa testom.

Literatura

1. Dražančić A, Strnad M, Audy-Jurković S i sur. Pojavnost i prevencija raka ženskih spolnih organa u Hrvatskoj. U: Eljuga D, Dražančić A (ur). Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1998;13–49.
2. Eljuga D, Navratil R, Hodžić D. Važnost sprječavanja i ranog otkrivanja raka vrata maternice. U: Eljuga D, Dražančić A (ur). Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1998;61–4.

3. Eljuga D, Rudan I. Pojavnost i prevencija raka vrata maternice. U: Eljuga D, Dražančić A (ur). *Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1998; 50–8.
4. Eljuga D, Šerman A, Hodžić D, Chylak V. Pojavnost i mortalitet od raka vrata maternice u Hrvatskoj; Važnost primarne i sekundarne prevencije. Značenje kolposkopije u ranoj dijagnozi i prevenciji neoplastičnih promjena vrata maternice i donjeg genitalnog trakta. (II. tečaj stalnog usavršavanja I. kategorije), Hrvatski Liječnički Zbor, Zagreb 2001.
5. Dražančić A, Audy-Jurković S, Ljubojević N, Babić D. Preinvazivne promjene vrata maternice u proteklom stoljeću. *Gynaecol Perinatol* 2001;10:183–9.
6. Pernoll ML. Cervical neoplasia. In: Benson RC, Pernoll ML. *Handbook of Obstetrics and Gynaecology*, 9th ed., New York: McGraw-Hill, Inc., 1994;519–32.
7. Grce M, Magdić L, Kocijan I, Pavelić K. Increase of genital papillomavirus infection among men and women in Croatia. *Anticancer Res* 1996;16:1039–42.
8. Hrgović Z, Thaci D, Hrgović I et al. Prevention of cervical cancer. *Libri Oncol* 1998;27:77–84.
9. Kent HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;155:1168–73.
10. Mardh PA. The vaginal ecosystem. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1163–8.
11. Žele-Starčević L, Kalenić S. Mikrobiološka dijagnostika *C. trachomatis* i HPV virusa. U: Eljuga D, Dražančić A (ur). *Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1998;95–8.
12. Buković D, Hodžić D, Grah J, Zudenigo J. Spolno prenosive bolesti i tumori ženskog spolnog sustava. U: Šimunić V (ur). *Humana reprodukcija, ginekološka endokrinologija, klimakterij i menopauza*, Poliklinika IVF, Zagreb 1999;233–44.
13. Delač J. Važnost dijagnostike papiloma virusa kao jednog od čimbenika u nastanku raka vrata maternice. U: Eljuga D, Dražančić A (ur). *Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*, Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1998;87–94.
14. Grce M. Critical view on human papillomavirus detection methods. U: Šamija M, Juretić A (ur). *1. Kongres Hrvatskog onkološkog društva*, Zagreb 2001, Zbornik radova. Zagreb: Medicinska naklada, 2001;104.
15. Grce M, Husnjak K. Role of human papillomaviruses detection and typing in cervical cancer prevention. *Period Biol* 2001; 103:135–8.
16. Grce M, Husnjak K, Božikov J et al. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* 2001;21:579–84.
17. Grce M, Husnjak K, Magdić L et al. Detection and typing of human papillomavirus by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *Eur J Epidemiol* 1997;13:645–51.
18. Grce M, Husnjak K, Skerlev M et al. Detection and typing of human papillomavirus by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res* 2000;20:2097–102.
19. Grce M, Krušić J, Magdić L, Brdar B. Detection of human papillomavirus related to carcinoma, condyloma accuminatum and dysplasia of the uterine cervix. *Period Biol* 1991;93:165–8.
20. 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. *J Virol Methods* 2000;88:125–34.
21. Hrgović Z, Salihagić A, Kušan M. HPV-infekcije genitalnog sustava: nove spoznaje. *Liječ Vjesn* 1999;121:198–203.
22. Krušić J, Dobrovšek-Šourek V, Pirkić A i sur. Značenje humanih papiloma virusa (HPV) u epidemiologiji prekanceroznih lezija grlića maternice. U: Borčić B, Aleraj B (ur). *1. kongres epidemiologa Jugoslavije, Zadar 1986*, Zbornik radova. Udruženje epidemiologa Jugoslavije, Zagreb 1987;184–56.
23. Singer Z, Đorđijevski E, Feichter G, Vrabc B. Istraživanje tipova deoksiribonukleinske kiseline humanih papilomavirusa u populaciji Zagreba. *Gynaecol Perinatol* 1992;1(suppl):40–2.
24. Singer Z, Šooš E. Follow up of cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus treated by human leucocyte interferon vaginalettes. *Gynaecol Perinatol* 1997;6:67–70.
25. Sorić J, Ban J. Primjena rekombinantnih DNA tehnika u otkrivanju HPV infekcija. U: Pavelić K, Spaventi R (ur). *Molekularna onkologija*. Zagreb: HAZU, 1992;97–118.
26. Sorić J, Matulić M, Ban J i sur. Tipizacija humanih papiloma virusa (HPV) u citološkim uzorcima vrata maternice metodom točkaste DNA hibridizacije: rano otkrivanje lezija visokog rizika. *Gynaecol Perinatol* 1992;1:193–6.
27. Zur Hausen H. Condylomata accuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36:794.
28. Zur Hausen H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977;78:1–30.
29. Zur Hausen H. Papillomaviruses as cancer viruses. *Adv Virol Oncol* 1989;8:1–26.
30. Zur Hausen H. Papilloma virus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989;49:4677–81.
31. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The HPV-6 and HPV-16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16 kD pore-forming protein. *J Virol* 1993;67:6170–4.
32. Ferris DG, Wright TC, Lilaker MS et al. Comparison of two tests for detecting carcinogenic HPV in women with Papanicolaou smear reports of ASCUS and LSIL. *J Fam Pract* 1998;46: 136–41.
33. Gorišek B, Takač I, Marin J. Humani papiloma virus 16 i 18 u žena s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom. *Gynaecol Perinatol* 1998;1:1–4.
34. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4549–53.
35. von Knebel Doeberitz M. Aspects of molecular pathogenesis of cervical cancer in establishing new tumor markers for early detection and diagnosis. *Zentralbl Gynäkol* 2001;123:186–91.
36. Syrjanen KJ. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papilloma virus (HPV). *Eur J Obstet Gynaecol Rep Biol* 1996;65: 45–53.
37. Balbi C, Di Grazia F, Piscitelli V et al. Retrospective study of cervical papillomavirus lesions: early Herpes simplex virus proteins as markers of risk for progression. *Minerva Ginecol* 1996;48: 175–9.
38. Vassilakos P, de Marval F, Munoz M et al. Human papillomavirus (HPV) DNA assay as an adjunct to liquid-based Pap test

in the diagnostic triage of women with an abnormal Pap smear. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;61:45–9.

39. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1994;186:1–12.

40. Munger K, Yee CL, Phelps WC et al. Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high and low risk HPV types are determined by aminoterminal sequences. *J Virol* 1991;65:3943–8.

41. Stürdivant SM, Huber HE, Patrick DR et al. Human papillomavirus type 16 E7 protein inhibits DNA binding by the retinoblastoma gene product. *Mol Cell Biol* 1992;12:1905–9.

42. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76–80.

43. Conrad M, Goldstein D, Andersson T et al. The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology* 1994;200:796–800.

44. Mahovlić V. Citološka dijagnostika spolno prenosivih bolesti. U: Šimunić V (ur). *Humana reprodukcija, ginekološka endokrinologija, klimakterij i menopauza*, Poliklinika IVF, Zagreb 1999; 245–50.

45. Vassilakos P. Screening for cervical cancer – a pathologist's view. In: *Meeting Report of European HPV Clinical Summit Meeting*. Vienna, 1998;10–11.

46. Hanselaar AG, Bocking A, Gundlach H et al. Summary statement on quantitative cytochemistry (DNA and molecular biology): Task Force 8. *Acta Cytol* 2001;45:499–501.

47. Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Mahovlić V et al. HPV DNA *in situ* hybridization in uterine cervical smears – I. Materials and methods. *Gynaecol Perinatol* 1993;2:45–50.

48. Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Mahovlić V et al. HPV DNA *in situ* hybridization in uterine cervical smears – II. Results. *Gynaecol Perinatol* 1993;2:51–3.

49. Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I et al. Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation Hybrid Capture® microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol* 1998; 10:49–54.

50. Ovanin-Rakić A, Audy-Jurković S, Mahovlić V. Tipizacija humanog papiloma virusa u uzorcima vrata maternice *in situ* hibridizacijom. Prvi hrvatski kongres kliničke citologije. Knjiga sažetaka. Hrvatsko društvo za kliničku citologiju, Zagreb 1995;5.

51. Poljak M. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomavirus associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1999;37:796–801.

52. Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ et al. Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993;53:919–23.

53. Peyton CL. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998;36:3248–52.

54. Morrison EAB. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 1991;49:6–10.

55. Mougín C, Dalstein V, Pretet JL et al. Epidemiology of cervical papillomavirus infections. Recent knowledge. *Presse Med* 2001;30:1017–23.

56. Olsen AO, Orstavik I, Dillner J et al. Herpes simplex virus and human papillomavirus in a population-based case-control study of cervical intraepithelial neoplasia grade II-III. *APMIS* 1998;106:417–21.

57. Tomljanović M. Spolno prenosive infekcije kao čimbenici rizika i mogući uzroci raka vrata maternice. U: Eljuga D, Dražančić A (ur). *Prevenција i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1998;65–86.

58. Ljubojević N, Babić D, Audy-Jurković S i sur. Dijagnostičko terapijski postupnik za premaligne promjena vrata maternice. *Gynaecol Perinatol* 2001;10:85–90.

59. Kjaer SK. HPV testing offers a predictive value for present or future cervical disease. In: *Meeting Report of European HPV Clinical Summit Meeting*. Vienna, 1998;6–7.

60. Audy-Jurković S, Singer Z, Pajtler M et al. Jedinstvena klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice u Hrvatskoj. *Gynaecol Perinatol* 1992;1:185–8.

61. Chaouki N, Bosch FX, Munoz N et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer* 1998;75:546–50.

62. Chichareon S, Herrero R, Munoz N et al. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:50–4.

63. Dexeus S, Rubio R, Bassols G et al. Papilloma infection. Precancer and epidermoid cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 1992;13: 167–76.

64. Hellberg D, Nilsson S, Grad A et al. Behavior of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with various human papilloma virus (HPV) types. *Arch Gynaecol Obstet* 1993;252: 119–28.

65. Dražančić A, Ivić J. Kolposkopske i citološke promjene u toku vaginalne trihomonijaze. *Liječ Vjesn* 1965;87:969–79.

66. Dražančić A, Krstulović B, Ivić J. *Trichomonas vaginalis* und Portioveränderungen. *Geburtshilfe Frauenh* 1969;29:914–9.

Članak primljen: 11. 10. 2002.; prihvaćen: 20. 10. 2002.

Adresa autora: Mr. sci. dr. Damir Hodžić, Opća županijska bolnica Požega, Služba za ginekologiju i porodništvo, Osječka bb, 34000 Požega