

Klinička značajnost molekularne analize humanih papilomavirusa

*Adriana VINCE, prof. dr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog i citolog
Snježana ŽIDOVEC LEPEJ, dr. sc.,
dipl. ing., viša znanstvena suradnica*

Klinika za infektivne bolesti
"Dr. Fran Mihaljević"

Ključne riječi

*HPV
molekularne metode
karcinom vrata maternice*

Key words

*HPV
molecular methods
cervical carcinoma*

Primljeno: 2010-07-12

Received: 2010-07-12

Prihvaćeno: 2010-09-30

Accepted: 2010-09-30

Uvod

Humani papilomavirusi (HPV) su heterogena skupina virusa koja se tijekom evolucije izvrsno prilagodila replikaciji u stanicama epitela [1]. Perzistentna infekcija humanim papilomavirusima obvezan je etiološki kofaktor u nastanku benignih i malignih novotvorina pločastog epitela [2-4]. Prepoznavanje različitosti onokogenog potencijala pojedinih genotipova HPV-a potaknulo je brojna istraživanja kliničke značajnosti molekularne heterogenosti ove skupine virusa [5].

Molekularna analiza HPV-a značajno je pridonijela poznavanju prirodne povijesti infekcije, epidemiološkoj klasifikaciji genotipova HPV-a obzirom na rizik od nastanka karcinoma vrata maternice, procjeni povezanosti

Stručni rad

Humani papilomavirusi (HPV) su heterogena skupina virusa koja se tijekom evolucije izvrsno prilagodila replikaciji u stanicama epitela. Perzistentna infekcija humanim papilomavirusima obvezan je etiološki kofaktor u nastanku benignih i malignih novotvorina pločastog epitela. Prepoznavanje različitosti onokogenog potencijala pojedinih genotipova HPV-a potaknulo je brojna istraživanja kliničke značajnosti molekularne heterogenosti ove skupine virusa. Molekularna analiza HPV-a značajna je ne samo u temeljnim virusološkim istraživanjima već i u humanoj medicini s posebnim naglaskom na problematiku povezanosti HPV-a s određenim tipovima tumora, razvoj klinički vrijednih dijagnostičkih testova, procjenu rizika od nastanka malignih lezija, sastavljanje kliničkih postupnika za probir, praćenje i liječenje zaraženih, razvoj cjepiva, analizu "pre-cjepne" distribucije genotipova, procjenu obuhvatnosti i učinkovitosti cjepiva i praćenje distribucije genotipova nakon uvođenja univerzalnog cjepjenja.

Molecular analysis of human papillomaviruses: a clinical significance

Professional paper

Human papillomaviruses (HPV) are a heterogeneous group of viruses that have throughout their evolution adapted to replication in epithelial cells. Persistent infection with human papillomaviruses represents a necessary co-factor for the development of benign and malignant epithelial neoplasia. Different oncogenic potential of individual HPV genotypes encouraged numerous studies on clinical significance of the observed molecular heterogeneity of HPV. Molecular analysis of HPV is relevant not only for basic virological research but for human medicine as well with particular emphasis on association between HPV and various types of human tumors, development of clinically validated diagnostic assays, assessment of risk for progression of cervical lesions, vaccine design and development, analysis of pre-vaccination distribution of HPV genotypes, analysis of vaccine coverage and efficacy as well as monitoring of possible genotype replacement following introduction of universal HPV vaccination.

pojedinih genotipova HPV-a s drugim tipovima karcinoma, proučavanju molekularne epidemiologije HPV infekcije u pojedinim dijelovima svijeta, strukturiranju molekularnih testova za kliničku dijagnostiku HPV infekcije te dizajnu cjepiva.

Klasifikacija humanih papilomavirusa

Papilomavirusi su DNK virusi koji zaražavaju epitel kralježnjaka i ubrajaju se u porodicu *Papillomaviridae*. Opisano je oko 250 genotipova HPV-a od kojih je 115 službeno klasificirano [6]. Usprkos tako značajno molekularnoj heterogenosti, humani papilomavirusi su genetski izrazito stabilni i evolucijski vrlo konzervirani.

Genom papilomavirusa sastoji se od cirkularne dvo-lančane DNA veličine oko 8 kb (kilobaza) koja najčešće sadrži 8 gena. Za potrebe klasifikacije koristi se analiza gena L1 koji kodira sintezu jednog od kapsidnih proteina. Nukleotidna sekvenca L1 gena koristi se u filogenetskoj analizi i klasifikaciji papilomavirusa [7]. Kriterij za klasifikaciju pojedinih izolata HPV-a u zasebne genotipove jest razlika u sekvenci nukleotida L1 regije za najmanje 10 %.

Humani papilomavirusi ne mogu se uspješno uzgojiti u staničnim kulturama in vitro te se klasifikacija humanih papilomavirusa temelji na sličnosti nukleotidnih sekvenci te na važnim biološkim i biomedicinskim obilježjima virusa. Obzirom na ograničenja mogućnosti kultivacije, termin soj (eng. *strain*) se najčešće ne koristi u uobičajenoj stručnoj literaturi u ovom području i zamjenjuje se terminom tip ili genotip. Valja naglasiti da *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) za potrebe službene klasifikacije ipak koristi termin soj (npr. soj HPV-16).

Prva opće prihvaćena klasifikacija objavljena je 2004. g. [8]. Ova klasifikacija rezultat je rada grupe istraživača u Referentnom centru za humane papilomaviruse istraživačkog instituta *Deutsches Krebsforschungszentrum* u Heidelbergu pod voditeljstvom Prof. Ethel-Michele de Villiers. Ovaj referentni centar osnovan je prije 25 g. i od tada potvrđuje nukleotidne sekvence novih genotipova HPV-a, odobrava službenu numeričku klasifikaciju novih genotipova HPV-a i pohranjuje referentne biološke uzorke pojedinih genotipova. U klasifikaciji HPV-a iz 2004. g. opisana je taksonomija genotipova HPV-1 do HPV-96. Genotipovi HPV-46, HPV-55, HPV-64 i HPV-79 nisu ispunili kriterije za neovisne genotipove a njihovi brojevi više nisu korišteni. Klinički najznačajniji genotipovi prema klasifikaciji iz 2004. g. ubrajaju se u rodove alfa, beta, gama, nu i mu.

Ista grupa istraživača objavila je novu i dopunjenu klasifikaciju papilomavirusa 2010. g. [9]. Prema novoj klasifikaciji, porodica *Papillomaviridae* sadrži 29 rodova i 189 izolata humanih papilomavirusa (120 tipova) kao i papilomaviruse izolirane iz sisavaca (64 tipa), ptica (3 tipa) i reptila (1 tip). Humani papilomavirusi klasificiraju se u 5 rodova dok se papilomavirusi sisavaca dijele na 20 rodova.

Prema novoj klasifikaciji, kloniranje novog genotipa papilomavirusa iz PCR produkta dostatan je dokaz za priznavanje statusa novog genotipa i ukida se termin "kandidata" za novi genotip.

U razdoblju od 2004. g. do 2010. g. opisano je 28 novih genotipova HPV-a od kojih se 5 ubraja u alfa-papilomaviruse (HPV-97, -102, -106, -114 i -117), 14 genotipova u beta-papilomaviruse (HPV-98, -99, -100, -104, -105, -107, -110, -111, -113, -115, -118, -120, -122 i -124) i 9 genotipova u gama-papilomaviruse (HPV-101, -103, -108, -109, -112, -116, -119, -121 i -123) [9].

Molekularna heterogenost HPV-a iskazuje se ne samo na razini genotipova već i genomskih varijanti unutar genotipova i subtipova. Obzirom na to da ICTV ne koristi taksonomiju ispod razine vrste, klasifikacija Bernard i sur.

iz 2010. g. ne obuhvaća detaljnu klasifikaciju genomskih varijanti [9]. Međutim, u radu Bernard i i sur. navodi se da je u pripremi nomenklatura varijanti alfa-papilomavirusa koji su povezani s karcinomom vrata maternice koja će se temeljiti na sekvencama kompletnog genoma [9].

Alfa-papilomavirusi i karcinom vrata maternice

Osnovno biološko svojstvo HPV-a je savršena prilagodba stanicama pločastog epitela kože i sluznica. Povezanost između perzistentne infekcije HPV-om i nastanka benignih te malignih novotvorina epitelne stanice prepoznata je 70-ih godina 20. stoljeća u tri povijesne publikacije istraživačke grupe Haralda zur Hausena [10–12]. U radu Durst i sur. iz 1983. g., grupa Prof. zur Hausena dokazala je prisutnost DNK HPV-16 u biopsijskim materijalima žena s karcinomom vrata maternice iz 4 različita zemljopisna područja [12].

Prof. zur Hausen je 2008. g. za otkriće povezanosti HPV-a i karcinoma vrata maternice dobio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju. Nastanak karcinoma vrata maternice i drugih karcinoma genitalne regije (npr. vulve) povezan je s infekcijom papilomavirusima iz roda alfa-papilomavirusa.

Životni ciklus HPV-a je jedinstven upravo zbog povezanosti s diferencijacijom epitelne stanice. Johnson i sur. su 2010. g. po prvi puta detaljno analizirali ranu fazu infekcije HPV-om i dokazali da se virioni HPV-a vežu na molekule heparan sulfat proteoglikana (HSPG) na površini cervikovaginalne bazalne membrane (na mjestu oštećenja sluznice) [13]. Nakon kontakta s bazalnim stanicama, slijede dvije konformacijske promjene kapside viriona i osobađenje L2 epitopa 17–36 što omogućuje vezanje virusne kapside na non-HSPG molekule tj. infekciju bazalnih stanica koje migriraju preko bazalne membrane tijekom procesa cijeljenja rane. HPV se u bazalnim stanicama nalazi u jezgri u obliku episoma a replicira se ekspresijom E1 i E2 (ranih) virusnih proteina. Tijekom diferencijacije bazalnih stanica (intermedijarna i površinska zona), HPV-om zaražene stanice ulaze u S fazu, ekspimiraju se kasni L1 i L2 geni, sintetiziraju se strukturalni proteini i dolazi do oslobađanja infektivnih viriona u ekstracelularni prostor tijekom ekfolijacije vanjskog sloja epitela.

Središnji događaj u životnom ciklusu HPV-a u kontekstu nastanka karcinoma vrata maternice je integracija virusa u genom i aktivacija transkripcije E6 i E7 gena čiji proteinski produkti iskazuju onkogeni potencijal. Onkoproteini E6 i E7 tijekom interakcije s tumor-supresorskim proteinima (p53, pRB) u stanici onemogućavaju biološku kontrolu staničnog ciklusa, posebice pri prijelazu iz G1 u S i iz G2 u M fazu životnog ciklusa. U konačnici, navedene interakcije dovode do nestabilnosti kromosoma, pojave drugih mutacija koje se povezuju s malignim transformacijama stanice, gubitka kontrole staničnog ciklusa te transformacije stanica koja se citološki karakter-

iziraju kao cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN) lakšeg i težeg stupnja odnosno karcinom vrata maternice.

Imunoreakcija na HPV iskazuje određene specifičnosti zbog afiniteta za epitelne stanice i izostanka viremije. HPV vrlo učinkovito izbjegavaju efektorske mehanizme urođene (interferonska imunost) i specifične imunosti (prezentacija antigena). Tijekom infekcije HPV-om ne dolazi do lize keratinocita tj. nema nekroze i upale te se ne aktivira upalni imunološki odgovor. Serološki odgovor tijekom infekcije HPV-om javlja se u 54–64 % zaraženih žena a do serokonverzije najčešće dolazi unutar 18 mjeseci od infekcije [14].

Molekularna karakterizacija HPV-a i klinička primjenjivost molekularnih analiza

Obzirom na nemogućnost uspješne kultivacije HPV-a u staničnim kulturama *in vitro*, istraživanje ove skupine virusa od početka se povezuje s molekularnim metodama čije su ciljne strukture HPV DNK ili HPV RNK. U istraživanju HPV-a i kliničkoj dijagnostici HPV infekcije najčešće se primjenjuju metode klasičnog PCR-a, PCR-a u realnom vremenu, hibridizacije nukleinskih kiselina, sekvenciranje pojedinih regija genoma kao i tehnologija mikročipovi [15].

Identifikacija pojedinih genotipova HPV-a u biološkim uzrocima najčešće se temelji na PCR-u pri čemu se koriste tri tipa početnica: My09/11 (fragment 450 parova baza, bp), GP5+/6+ (150 bp) i SPF₁₀ (65 bp).

Primjena PCR metoda za identifikaciju pojedinih genotipova HPV-a omogućila je prepoznavanje povezanosti pojedinih genotipova HPV-a i nastanka određenih tipova proliferativnih lezija.

Genotipizacija HPV-a kao temelj epidemiološke klasifikacije HPV-a obzirom na rizik od nastanka karcinoma vrata maternice i razvoj kliničke dijagnostike HPV infekcije

Razvoj molekularnih metoda za individualnu genotipizaciju HPV-a u biološkim uzorcima potaknuo je provođenje kliničkih istraživanja s ciljem procjene onkogenog potencijala pojedinih genotipova HPV-a.

Munoz i sur. su 2003. g. objavili rad koji je temelj epidemiološke klasifikacije HPV-a obzirom na rizik od nastanka karcinoma vrata maternice [5]. Rad se temelji na metanalizi rezultata 11 studija iz devet zemalja u kojima je sudjelovalo 1918 žena s histološki potvrđenim karcinomom vrata maternice i 1 928 kontrola. Temeljem rezultata ovog rada genotipovi HPV-a identificirano je 15 genotipova (HPV- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82) koji su povezani s visokim rizikom od nastanka karcinoma vrata maternice kao i 3 genotipa koji su klasificirani kao vjerojatno visokorizični genotipovi (HPV-26, 53 i 66). Niskorizični genotipovi (HPV-6, 11,

40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108) su također važni u medicini jer su odgovorni za nastanak više od 95 % genitalnih bradavica i laringealnih papiloma.

Rezultati ove studije potaknuli su razvoj prvog kliničkog testa za dijagnostiku HPV infekcije *hybrid capture 2* (hc2, Digene HPV test, distribucija Qiagen, Njemačka) koji se temelji na grupnoj genotipizaciji 13 visokorizičnih genotipova HPV-a [15]. Test se temelji na principu tekućinske hibridizacije i koristi koktel komplementarnih RNA proba koje hibridiziraju DNK HPV-a (episom i integrirani provirus). *Hybrid capture 2* omogućuje detekciju 13 visokorizičnih genotipova HPV-a (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) ali daje i mogućnost detekcije niskorizičnih genotipova (6, 11, 42, 43, 44) a u pripremi je i nova verzija testa koja će omogućiti potpunu automatizaciju testiranja i individualnu genotipizaciju HPV-16/18 i -45 [16–17].

Američka uprava za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je 2003. g. primjenu *hybrid capture 2* testa za dvije indikacije:

1. primarni skrining žena u dobi od ≥ 30 u kombinaciji s citologijom u svrhu detekcije infekcije visokorizičnim genotipovima HPV-a
2. trijaža žena s ASC-US-om u svrhu procjene potrebe dodatne kliničke obrade (kolposkopije) [17].

Studije kliničke validacije ovog testa pokazale su da zajednička interpretacija rezultata citologije i *hybrid capture 2* testa ima negativnu prediktivnu vrijednost >99 % tj. da je rizik od nastanka karcinoma vrata maternice u žena s normalnom citologijom i negativnim rezultatom *hybrid capture 2* testa iznimno nizak. Jedan od prvih radova koji je dokazao kliničku vrijednost *hybrid capture 2* testa objavili su znanstvenici iz Hrvatske [18].

Klinička značajnost HPV-16/18 u nastanku karcinoma vrata maternice

Perzistentna infekcija visokorizičnim genotipovima HPV-a neophodna je za nastanak karcinoma vrata maternice. Danas je poznato da HPV-negativan karcinom vrata maternice ne postoji. Nemogućnost detekcije HPV-a u biopstatima karcinoma vrata maternice najčešće se povezuje s neadekvatnim uzorkovanjem ili pohranjivanjem uzorka odnosno greškama u molekularnim metodama koje se primjenjuju za dokazivanje HPV-a. Jedno od istraživanja koji potvrđuju ove navode je studija Bohemer i sur. u kojoj je analizirano 511 uzoraka žena s CIN3 i karcinomom vrata maternice i dokazana HPV DNK u svim uzorcima [19].

Munoz i sur. su 2004. g. pokazali da su genotipovi HPV-a 16,18 i 45 odgovorni za 77,4 % karcinoma vrata maternice u svijetu, a zatim po učestalosti slijede HPV-31, HPV-33, HPV-52, HPV-58, HPV-35 i drugi [20]. Analiza distribucije genotipova HPV-a na pojedinim kontinentima pokazala je određene razlike od kojih valja izdvojiti visoku

prevalenciju HPV-18 u afriki (22,4 %) i neuobičajeno nisku prevalenciju HPV-45 u Aziji (3,1 %) [20].

Incidencija raka vrata maternice u Hrvatskoj je 13,7 na 100 000 žena reproduktivne dobi (15–44 godine), i na drugom je mjestu odmah iza karcinoma dojke. Godišnje se u Hrvatskoj dijagnosticira 431 novooboljela i 209 smrti uzrokovanih rakom vrata maternice [21].

Distribucija genotipova HPV-a u žena s cervikalnim displazijama težeg i lakšeg stupnja iz Hrvatske analizirana je u studiji Hađisejdić i sur. iz 2007. g. [22]. Prema tim podacima prevalencija HPV tipova kod invazivnog adenokarcinoma vrata maternice je: HPV-16 (45 %), HPV-18 (36,9 %), HPV-51 (17,6 %), te genotipovi HPV-31 i HPV-33 (11,7 %) (31,32) [22]. Podatci o prevalenciji pojedinih genotipova HPV-a u žena s planocelularnim karcinomom vrata maternice iz Hrvatske nisu dostupni.

Preliminarni podatci prve prospektivne studije distribucije genotipova HPV-a u žena s karcinomom vrata maternice iz Hrvatske (Vince i sur., unpublished) pokazuju visoku prevalenciju infekcije s HPV-om 16 ali i značajnu zastupljenost dvojnih (oko 20 %) infekcija te čak 10 % infekcija s po 3 visokorizična genotipa HPV-a. Analiza distribucije genotipova HPV-a u žena s karcinomom vrata maternice iz Slovenije također je pokazala visoku zastupljenost infekcije s HPV-16 (64,9 %) i HPV-18 (12,2 %) te čak 18 % dvojnih infekcija [23].

Najznačajnija prospektivna klinička studija koja je nedvojbeno pokazala iznimno snažan onkogeni potencijal HPV-16 bila je studija Khan i sur. (2005) koja je obuhvatila 20 810 žena s normalnom citologijom u Portlandu, SAD [24]. Tijekom desetogodišnjeg praćenja CIN3 je otkriven u 21 % žena zaraženih s HPV-16, 18 % žena zaraženih s HPV-18 dok je 1,5 % žena koje su bile zaražene s jednim ili više od 11 drugih visokorizičnih genotipova HPV-a razvio CIN3 tijekom perioda praćenja. Ova je studija pružila prve znanstveno-utemeljene dokaze o mogućoj korisnosti uvođenja skrininga koji bi se temeljio na razlikovanju infekcije s HPV-16/18 od infekcije drugim visokorizičnim genotipovima HPV-a u svrhu identifikacije upravo onih žena s najvećim rizikom od nastanka karcinoma vrata maternice.

Grupa stručnjaka Svjetske zdravstvene organizacije *Working group of the WHO International Agency for Research on Cancer* (IARC) je 2009. g. predložila novu sistematizaciju kliničke značajnosti pojedinih genotipova HPV-a:

- HPV-16 – iznimno značajan humani karcinogen
- HPV-18 – onkogeni potencijal manji od HPV-16, posebno značajan za nastanak adenokarcinoma
- šest genotipova (HPV-45, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52 i HPV-58) koji se zajedno s HPV-16 i HPV-18 ubrajaju u globalno najčešće genotipove značajne za nastanak karcinoma vrata maternice i drugih karcinoma

d) genotipovi koji su manje zastupljeni u etiologiji humanih karcinoma (HPV-51, HPV-56, HPV-39 i HPV-59)

e) HPV-68 i HPV-73 – klinička značajnost nije u potpunosti jasna

f) HPV-66 i HPV-53 – uključivanje ovih genotipova u skrining testova za prevenciju karcinoma vrata maternice smanjilo bi kliničku specifičnost i pozitivnu prediktivnu vrijednost ovih testova a istovremeno ne bi povećalo osjetljivosti i negativnu prediktivnu vrijednost testova.

Upravo ove znanstvene spoznaje potaknule su razvoj nove generacije molekularnih testova za kliničku dijagnostiku HPV-infekcije koja se temelji na kombinaciji individualne genotipizacije HPV-16 i HPV-18 te grupne genotipizacije 12 drugih visokorizičnih genotipova HPV-a [15]. U Europi se najčešće koriste *Abbott RealTime High Risk HPV test* (Abbott Molecular, USA) i *Cobas 4800 HPV test* (Roche Molecular Systems) koji su dostupni od 2009. g [25]. U SAD-u se u svrhu identifikacije žena s HPV-16/18 infekcijom koristi kombinacija *Cervista HPV HR testa* (detekcija 14 visokorizičnih genotipova) i *Cervista HPV16/18 testa* (individualna genotipizacija HPV-16/18) (*Third Wave Technologies Inc./Hologic Inc.*, Madison, WI, USA) koje je FDA odobrila 2009. g. [26].

Preporuke stručnog društva *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP) iz 2006. g. navode da se testovi koji uključuju individualnu genotipizaciju HPV-16 i HPV-18 trebaju koristiti u dijagnostičkoj obradi žena s normalnom citologijom i pozitivnim nalazom HPV DNK testa za visokorizične genotipove [27]. Ukoliko se testiranjem dokaže prisutnost HPV-16/-18, žena se upućuje na koloposkopiju dok se u žena koje su zaražene drugim visokorizičnim genotipovima HPV-a preporučuje kontrola za 12 mjeseci i ponavljanje citologije i HPV testa.

Dvanaest genotipova iz skupine alfa-papilomavirusa povezano je s niskim rizikom od nastanka karcinoma vrata maternice. No, klinički vrlo značajni i najbolje proučeni niskorizični genotipovi su HPV-6 i HPV-11 koji su odgovorni za nastanak >95 % genitalnih bradavica (*condylomata acuminata*) i laringealnih papiloma.

Beta- i gama-papilomavirusi

Genotipovi HPV-a iz roda beta-papilomavirusa povezuju se s pojavom epidermodisplazije veruciformis (EV) [28]. EV je rijetka autosomalna recesivna bolest uzrokovana mutacijama u *EVER1/EVER2* genima koja se povezuje s visokim rizikom od nastanka karcinoma kože. Beta-papilomavirusi koji su u imunokompetentnim osobama niskovirulentni, iskazuju snažan onkogeni potencijal u bolesnika s EV.

Proširenost infekcije beta-papilomavirusima potvrđuju i rezultati rada Poljak i sur. koji su pokazali prisutnost ovih virusa u korijenima dlaka iz područja skrotuma, pubisa i perianalnog područja oko 30 % imunokompetentnih osoba [29]. Najčešći genotipovi HPV-a u 150 uzoraka dlaka bili su HPV-36, HPV-15 i HPV-14D.

Mu i no-papilomavirusi

Grimmel i sur. su 1998. g. otkrili i karakterizirali HPV-41 iz roda Nu [30]. Genotip HPV-1 iz roda Mu su otkrili Orth i sur. (1977.g.) dok su genotip HPV-63 po prvi puta karakterizirali Egawa i sur. (1993. g.) [31–32]. Genotipovi HPV-a iz rodova Mu i Nu odgovorni su za nastanak kožnih bradavica. Wang i sur. su 2007. g. opisali klinički teže slučajeve kožnih promjena uzorkovani HPV-2 iz roda Mu [33].

Klinička značajnosti genomskih varijanti HPV-a

Izolate određenog genotipa HPV-a koji se međusobno razlikuju za <2 % na razini nukleotidne sekvence L1 regije i za < od 5 % na razini LCR regije genoma nazivamo genomskim variantama [8–9]. Genomske varijante se analiziraju sekvenciranjem (najčešće MY09/11 ili GP55/6+ PCR produkata) i filogenetskom analizom sekvenci. Analiza genomskih varijanti pojedinih genotipova HPV-a iznimno je značajno područje istraživanja u molekularnoj virusologiji HPV infekcije no biomedicinsko značenje genomskih varijanti za sada nije u potpunosti razjašnjeno. Osnovna pitanja koja se postavljaju u kontekstu kliničke značajnosti genomskih varijanti HPV-a su:

1. da li je postojanje pojedinih genomskih varijanti povezano s povećanim rizikom od uspostave perzistentne infekcije pojedinim genotipovima HPV-a
2. da li su pojedine genomske varijante visokorizičnih genotipova povezane s većim rizikom od nastanka karcinoma vrata maternice
3. da li postojanje genomskih varijanti utječe na dijagnostičku točnost pojedinih molekularnih testova
4. da li je postojanje genomskih varijanti povezano s učinkovitosti cjepiva protiv HPV-a?

Analiza distribucije pojedinih genomskih varijanti HPV-a u žena s perzistentnom infekcijom i progresijom cervikalnih lezija pokazala je povećanu prevalenciju genomske varijante 350G HPV-16 (gen E6) u usporedbi s prototipom 350T. Lee i sur (2008) su također pokazali da je procjena rizika od progresije cervikalnih lezija povezana s polimorfizmom E6 regije HPV-16 [34]. Sighero i sur. (2007) su također pokazali povećani rizik od nastanka skvamoznih intraepitelijalnih lezija težeg stupnja (HSIL) u žena s non-Europskim genomskim varijantama HPV-16

[35]. Stoga možemo zaključiti da postoje određeni dokazi o povećanom onkogenom potencijalu nekih genomskih varijanti HPV-16 te da je ovo područje potrebno detaljnije istražiti.

Utjecaj genomskih varijanti na dijagnostičku točnost pojedinih molekularnih testova istražili su Jiang i sur. (2009) usporedbom rezultata testa integracije genoma HPV-16 (određivanje omjera broja kopija gena za E2 i E7) u Euroskim, Azijsko-Američkim te dvije Afričke genomske varijante HPV-16 [26]. Rezultati ovog rada su pokazali da su rezultati ovog testa integracije za Afričke varijante HPV-16 lažno snižene zbog promjene slijeda nukleotida u blizini 3' kraja veznog mjesta početnice za E2. Ovaj je rad pokazao da je pri validaciji novih molekularnih testova važno analizirati sposobnost ekvivalentne detekcije svih genomskih varijanti pojedinih genotipova HPV-a.

Dokazi o kliničkoj značajnosti genomskih varijanti potaknuli su raspravu o potrebi prikupljanja izolata pojedinih genotipova iz cijelog svijeta kako bi se pripremio svojevrsan "katalog" genomskih varijanti pojedinih genotipova. Prado i sur. su 2009. g objavili rad o genomskim varijantama genotipova HPV-53, -56 i -66 i pokazali da npr. HPV-58 ima 17 genomskih varijanti koje formiraju 3 filogenetska stabla obzirom na zemljopisno porijeklo (Europske, Azijske i Afričke varijante) [37]. Kocjan i sur. su opisali genomske varijante HPV-38, beta-papilomavirusa koji je povezan s karcinomima kože [37]. Temeljem sekvenci L1, E6 i E7 regija genoma otkriveno je 17 genomskih varijanti od kojih je čak 12 po prvi puta bilo opisano u ovom radu [38]. Stoga je jasno da se heterogenost genomskih varijanti pojedinih genotipova HPV-a kao i njihova biomedicinska značajnost tek treba istražiti.

Zaključak

Molekularna analiza HPV-a značajna je ne samo u temeljnim virusološkim istraživanjima već i u humanoj medicini s posebnim naglaskom na:

1. problematiku povezanosti HPV-a s određenim tipovima tumora
2. razvoj klinički vrijednih dijagnostičkih testova
3. procjenu rizika od nastanka malignih lezija
4. sastavljanje kliničkih postupnika za probir, praćenje i liječenje zaraženih
5. razvoj cjepiva
6. analizu "pre-cjepne" distribucije genotipova
7. procjenu obuhvatnosti i učinkovitosti cjepiva
8. praćenje distribucije genotipova nakon uvođenja univerzalnog cijepjenja (genotype replacement).

Rad je prezentiran na 2. hrvatskom kongresu o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama, s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, 14.–16.5.2010.

Literatura

- [1] Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *AMPIS* 2010; 118: 422–49.
- [2] zur Hausen, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol* 1981; 12: S124–8.
- [3] Bosch X, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shak KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244–65.
- [4] Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286: 3106–14.
- [5] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–27.
- [6] Chouhy D, Gorosito M, Sánchez A, Serra EC, Bergero A, Fernandez Bussy R, Giri AA. New generic primer system targeting mucosal/genital and cutaneous human papillomaviruses leads to the characterization of HPV 115, a novel beta-papillomavirus species 3. *Virology* 2010; 5: 205–16.
- [7] Cornut G, Gagnon S, Hankins C, Money D, Pourreaux K, Franco EL, Coutlée F; Canadian Women's HIV Study Group. Polymorphism of the capsid L1 gene of human papillomavirus types 31, 33, and 35. *J Med Virol* 2010; 82: 1168–78.
- [8] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
- [9] Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401: 70–9.
- [10] Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridisation with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974; 13: 650–656.
- [11] Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 1977; 76: 569–580.
- [12] Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3812–5.
- [13] Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 2009; 83: 2067–74.
- [14] Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000; 181: 1911–9.
- [15] Vince A, Lepej SZ. Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection. *Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona* 2010; 7: 18–25.
- [16] Elder PS, Lou J, Huff J, Macioszek J. The next-generation Hybrid Capture High-Risk HPV DNA assay on a fully automated platform. *J Clin Virol* 2009; 51: 585–592.
- [17] Židovec Lepej S, Grgić I, Poljak M, Iščić-Beš J, Škerk V, Vince DB, Dušek D, Vince A. Detection of human papillomavirus genotypes 16/18/45 by hybrid capture hybridisation genotyping probe in clinical specimens. The first report. *J Clin Virol* 2007; 40: 171–2.
- [18] Vince A, Kutela N, Iscic-Bes J, Harni V, Ivanisevic M, Sonicki Z, Culig Z, Poljak M. Clinical utility of molecular detection of human papillomavirus in cervical samples by hybrid capture technology. *J Clin Virol* 2002; 25: S109–12.
- [19] Bohmer G, van den Brule AJ, Brummer O, Meijer CL, Petry KU. No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 118–20.
- [20] Munoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111: 278–285.
- [21] WHO. Human papillomavirus and related cancers. Summary Report 2009, Croatia.
- [22] Hadzisejčić I, Krasević M, Haller H, Grahovac B. Distribution of human papillomavirus types in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Coll Antropol* 2007; 31: 97–102.
- [23] Kovanda A, Juvan U, Sterbenc A, Kocjan BJ, Seme K, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Poljak M. Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2009; 18: 47–52.
- [24] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Scherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2008; 97: 1072–9.
- [25] Kaliterna V, Židovec Lepej S, Vince A. Comparison between Abbott RealTime High Risk HPV assay and Hybrid Capture II assay for detecting high risk HPV DNA in cervical specimens. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1662–3.
- [26] Einstein MH, Martens MG, Garcia FA, et al. Clinical validation of the Cervista HPV HR and 16/18 genotyping tests for use in women with ASC-US cytology. *Gynecol Oncol* 2010; 118: 116–22.
- [27] Wright Jr TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening test. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 346–55.
- [28] Orth G. Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 321: 59–83.
- [29] Poljak M, Kocjan BJ, Potocnik M, Seme K. Anogenital hairs are an important reservoir of alpha-papillomaviruses in patients with genital warts. *J Infect Dis* 2009; 199: 1270–4.
- [30] Grimm M, de Villiers EM, Neumann C, Pawlita M, zur Hausen H. Characterization of a new human papillomavirus (HPV 41) from disseminated warts and detection of its DNA in some skin carcinomas. *Int J Cancer* 1988; 41: 5–9.
- [31] Orth G, Favre M, Croissant Q. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 1977; 24: 108–20.
- [32] Egawa K, Delius H, Matsukura T, Kawashima M, de Villiers EM. Two novel types of human papillomavirus, HPV 63 and HPV 65:

- comparisons of their clinical and histological features and DNA sequences to other HPV types. *Virology* 1993; 194: 789–99.
- [33] Wang W, Wang C, Xu S, Chen C, Tong X, Liang Y, Dong X, Lei Y, Zheng X, Yu J, Wang J. Detection of HPV-2 and identification of novel mutations by whole genome sequencing from biopsies of two patients with multiple cutaneous horns. *J Clin Virol* 2007; 39: 34–42.
- [34] Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Briolat J, Birembaut P, Tommasino M, Zhebe I. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res* 2008; 131: 106–10.
- [35] Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer* 2007; 120: 1763–8.
- [36] Jiang M, Baseman JG, Koutsky LA, Feng Q, Mao C, Kviat NB, Xi LF. Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 521–6.
- [37] Prado JC, Calleja-Macias IE, Bernard HU, et al. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology* 2005; 340: 95–104.
- [38] Kocjan BJ, Seme K, Cimerman M, Kovanda A, Potocnik M, Poljak M. Genomic diversity of human papillomavirus (HPV) genotype 38. *J Med Virol* 2009; 81: 288–95.

**HRVATSKI LJEČNIČKI ZBOR
HRVATSKO DRUŠTVO ZA INFEKTIVNE BOLESTI
KLINIKA ZA INFEKTIVNE BOLESTI "DR. FRAN MIHALJEVIĆ" ZAGREB
HRVATSKA AKADEMIJA MEDICINSKIH ZNANOSTI**



Dan prof.dr. Frana Mihaljevića

**BRZA DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNIH
BOLESTI**

Zagreb, 10. prosinca 2010.
Klinika „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb