

## HPV v Sloveniji: rezultati slovenskih raziskav (2012-2015) in uporaba s HPV-povezane tehnologije

Mario Poljak

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, Ljubljana

### Povzetek

Človeški papilomavirusi (HPV) so raznolika skupina DNA virusov, etiološko povezana z različnimi benignimi, predrakavimi in rakavimi novotvorbami epitelija sluznic in kože pri človeku. Podrobni pregled slovenskih raziskav na področju HPV, ki so bile od leta 1990 do oktobra 2011 objavljene v revijah, ki jih indeksira Science Citation Index (SCI) in/ali PubMed/Medline – skupaj 73 člankov, je bil objavljen konec leta 2011 (*Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2011; 20: 99–112). V tem prispevku predstavljamo 63 raziskovalnih, strokovnih in preglednih člankov slovenskih raziskovalcev, objavljenih od novembra 2011 do septembra 2015 v revijah, ki jih indeksira SCI in/ali PubMed/Medline. Podrobneje so predstavljene predvsem slovenske raziskave novih genotipov HPV, genetske raznolikosti izbranih genotipov HPV, pomembna raziskava »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s HPV v priložnostnem vzorcu žensk, starih od 20 do 64 let,« raziskave bremena in preprečevanja s HPV povezanih novotvorb v državah Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije ter slovenske raziskave benignih in malignih novotvorb v anogenitalnem področju. Na kratko je predstavljen tudi osnovni koncept diagnostike okužbe s HPV v Sloveniji in po svetu

**Ključne besede:** HPV, genotip, rak, karcinom, genitalne bradavice, Slovenija

### Uvod

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomaviruses*, HPV) so raznolika skupina DNA virusov, etiološko povezana z različnimi benignimi, predrakavimi in rakavimi novotvorbami epitelija sluznic in kože pri človeku. HPV so že skoraj četrt stoletja predmet številnih raziskav v Sloveniji. Podrobni pregled slovenskih raziskav na področju HPV od leta 1990 do oktobra 2011 in sicer 73 člankov, objavljenih v revijah, ki jih indeksirajo Science Citation Index (SCI) in/ali PubMed/Medline, je bil objavljen konec leta 2011 in je prosto dostopen na spletu (1). V tem prispevku bomo na kratko predstavili skupaj 63 raziskovalnih, strokovnih in preglednih člankov slovenskih raziskovalcev, objavljenih od novembra 2011 do septembra 2015 v revijah, ki jih indeksirajo SCI in/ali PubMed/Medline (2). Podrobneje so predstavljene predvsem raziskave, ki so bile osredotočene na okužbe s HPV v anogenitalnem področju. Na koncu prispevka smo predstavili tudi osnovni koncept diagnostike okužbe s HPV v Sloveniji in po svetu.

### Novi genotipi HPV

Po podatkih mednarodnega referenčnega centra za HPV (angl. *International Human Papillomavirus Reference Center*), ki deluje pod okriljem inštituta Karolinska (se. *Karolinska Institutet*) v Stockholmu na Švedskem, je bil do 29. septembra 2015 popol-

noma opredeljen in uradno priznan 201 genotip HPV. Nedavno je bilo na podlagi filogenetskih primerjav vseh dostopnih (delnih ali celotnih) nukleotidnih zaporedij genoma HPV v več neodvisnih raziskavah dokazano, da *in vivo* obstaja še več kot 250 možnih novih genotipov HPV. Večje število novoodkritih HPV v zadnjih sedmih letih je posledica uporabe novih, od nukleotidnega zaporedja neodvisnih tehnik pomnoževanja in novih, pogosto rodovno-navzkrižnih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov, ki omogočajo pomnoževanje širšega spektra HPV in/ali metode globokega sekvenciranja. Omenjene molekularne metode in druge tehnike za identifikacijo in opredeljevanje novoodkritih genotipov HPV kot sta verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) in metoda krožnega pomnoževanja (angl. *rolling-circle amplification*, RCA) smo podrobneje opisali v nedavno objavljenem preglednem članku (3). V članku smo skupaj z raziskovalci iz Švedske dodatno predstavili še kratek pregled novih genotipov HPV, ki so bili odkriti v Sloveniji in na Švedskem (3). V Sloveniji smo odkrili in dokončno opredelili deset uradno priznanih genotipov HPV: HPV-120, HPV-125, HPV-150, HPV-151, HPV-159, HPV-174, HPV-179, HPV-184, HPV-199 in HPV-2014. V obdobju 2012–2015 smo v znanstvenih revijah objavili podatke za sedem: HPV-120, HPV-159, HPV-174, HPV-179, HPV-184, HPV-199 in HPV-204 (4–9). Delno smo opredelili tudi več kot 35 kandidatnih izolatov za nove HPV-genotipe. Delna nukleotidna

zaporedja omenjenih genotipov HPV smo odkrili z uporabo PCR in različnih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov. Temu je sledilo pomnoževanje in kloniranje celotnih virusnih genomov in njihova genetska oziroma filogenetska opredelitev. Genotip HPV-120, ki se filogenetsko uvršča v rod *Betapapillomavirus* ( $\beta$ -PV) v vrsto  $\beta$ 2 (najbližji sorodnik je HPV-23), je naša raziskovalna skupina odkrila v brisu zadnjičnega kanala, sočasno z raziskovalci v ZDA, ki so ta genotip odkrili v izpirku ustne votline (4). V nadaljevanju skupne raziskave smo z uporabo HPV-120-tipsko značilne PCR v realnem času (angl. *real time PCR*, RT-PCR) HPV-120 dokazali v večjem številu vzorcev ustne votline, zadnjika, anogenitalnih bradavic in dlačnih mešičkov obrvi, s čimer smo potrdili njegov dvojni tkivni tropizem. Z molekularno analizo gena L1 smo v nadaljevanju dokazali številne podtipske različice tega virusa, ki so tvorile dve možni genetski liniji (4). Genotip HPV-159 smo, podobno kot HPV-120, odkrili v brisu zadnjičnega kanala (5). Filogenetsko ga uvrščamo med  $\beta$ -PV, v vrsto  $\beta$ 2, njegov najbližji sorodnik pa je HPV-9. Genotip HPV-174 smo odkrili v tkivnem vzorcu ploščatoceličnega karcinoma (angl. *squamous cell carcinoma*, SCC) kože, ki je vseboval še HPV-9 in HPV-150 (6). Tudi ta genotip uvrščamo med  $\beta$ -PV oziroma v vrsto  $\beta$ 2, njegov najbližji sorodnik pa je HPV-145. Vloga HPV-174 pri nastanku raka kože za zdaj ostaja neznana (6). Pri 64-letnemu imunsko oslabelemu moškemu smo v dveh različnih tkivnih vzorcih kožnih bradavic odkrili dva nova genotipa, ki smo ju kasneje tudi etiolško povezali z nastankom posameznih bradavic. Genotip HPV-179 in HPV-184 filogenetsko uvrščamo v rod *Gammapapillomavirus* ( $\gamma$ -PV), HPV-179 v vrsto  $\gamma$ 15 in HPV-184 v vrsto  $\gamma$ 25 (7). Genotip HPV-199 smo izolirali iz brisa nosnega dela žrela in brisa analnega kanala, izkazuje dvojni tkivni tropizem in ga filogenetsko uvrščamo v rod  $\gamma$ -PV, v vrsto  $\gamma$ 25 (9). Genotip HPV-204 smo odkrili v analnem brisu 36-letnega moškega s HPV-53 pozitivnimi analnimi bradavicami. Novoodkriti genotip je šele tretji opredeljeni predstavnik rodu  $\mu$ -PV (8).

Vzporedno z naraščanjem števila novih HPV se veča tudi število novoodkritih živalskih papilomavirusov (angl. *Papillomavirus*, PV). Po podatkih zadnjega preglednega članka je bilo popolnoma opredeljenih 131 PV pri 66 različnih živalskih vrstah, ki se taksonomsko razvrščajo v 36 PV-rodov (3). Odkrivanje in potrjevanje novih živalskih PV naj bi spremljali v Referenčnem centru za živalske papilomaviruse (angl. *Animal Papillomavirus Reference Center*) v New Yorku (ZDA), ustanovljenem leta 2010, vendar center še vedno ni polno zaživel. Vsak novi genotip živalskih PV je označen z okrajšavo rodu in vrsto živali, pri kateri je bil osamljen ter z zaporedno številko osamitve (npr. kratici FdPV1

in FdPV2 označujeta PV, odkrita pri domači mački *Felis domesticus*).

V nedavni raziskavi smo s pomočjo novih širokospektralnih oligonukleotidnih začetnikov za HPV in posebne metode vgnezdene PCR (angl. *single tube nested 'hanging droplet' PCR*) odkrili prvi PV *Phodopus sungorus papillomavirus type 1* (PsvPV1), katerega naravni gostitelj je sibirski hrček (*Phodopus sungorus*). Novi živalski virus, ki izkazuje vse značilnosti organizacije genoma PV, smo uvrstili v rod *Pipapillomavirus*, kamor trenutno uvrščamo še šest PV, ki so bili osamljeni pri različnih glodavcih, vključujoč sirijskega hrčka, različne vrste miši in norveško podgano. PsvPV1 je pričakovano najbolj soroden MaPV1 (*Mesocricetus auratus Papillomavirus Type 1*), ki je bil osamljen iz ustne votline sirijskega hrčka (*Mesocricetus auratus*) (10).

### Genetska raznolikost izbranih genotipov HPV

HPV so eden redkih primerov v humani virologiji, ko genotipe virusa lahko povežemo z določeno boleznijo. Genotipi HPV kažejo tkivno specifičnost in povezanost z razvojem značilnih bolezenskih sprememb v tarčnem epitelu. Ker se bolezen razvije le pri manjšini oseb, okuženih z določenim genotipom HPV, se je izoblikovala domneva, da znotraj posameznega genotipa HPV obstajajo podtipske različice, ki bi lahko prispevale k večji ali manjši patogenosti virusa. Patogenetska različnost podtipskih različic HPV naj bi izvirala iz genetskih sprememb v kodirajočih in/ali nekodirajočih oziroma uravnalnih področjih genoma HPV.

V sodelovanju z raziskovalci iz Univerze Alberta Einsteina (New York, ZDA) smo na podlagi filogenetske analize in izračuna maksimalnih razlik parov nukleotidnih zaporedij med 43 celotnimi genomi HPV-6 in 32 celotnimi genomi HPV-11 predlagali kriterij za določevanje genetskih linij HPV-6/-11 (1 % odstopanje v celotnem genomu od ostalih podtipskih različic istega genotipa HPV) in genetskih podlinij (0,5–1,0 % odstopanje). Po opisanem predlogu imenujemo skupino podtipskih različic HPV, ki vključujejo referenčno različico, linija A in njene podlinije A1, A2 itd. Skupine podtipskih različic, ki ne vključujejo referenčne različice HPV, imenujemo po abecednem vrstnem redu (linija B, C itd.). Podtipske različice HPV-6 smo uvrstili v dve genetski liniji: A in B ter tri podlinije: B1, B2 in B3, medtem ko smo različice HPV-11 uvrstili v dve podliniji: A1 in A2. Postavili smo tudi sistem za poenoteno številčenje nukleotidnih mest v genomskih zaporedjih genotipov HPV iz rodu *Alphapapillomavirus* ( $\alpha$ -PV) (11).

V letu 2014 smo izvedli raziskavo, v kateri smo na podlagi analize celotnih genomov kot prvi raz-

iskali svetovno genomsko raznolikost genotipa HPV-6. V raziskavo smo vključili 530 HPV-6-pozitivnih vzorcev, pridobljenih iz 15 držav iz šestih celin (Evropa, Azija, Severna in Južna Amerika, Avstralija in Afrika). HPV-6-pozitivne vzorce smo pridobili iz različnih anatomskih mest okužbe (anogenitalnih bradavic, papilomov grla in brisov materničnega vratu). Izmed 530 vzorcev smo 492 opredelili nukleotidna zaporedja v genomskih področjih: E5a, E5b, L1 in LCR ter najbolj raznolikim različicam določili celotno nukleotidno zaporedje. Z omenjeno raziskavo smo v gensko banko GenBank prispevali največje število celotnih genomov HPV-6 do sedaj, 130 od 190. Podtipe različice HPV-6 smo filogenetsko uvrstili v genetski liniji A in B ter pet podlinij B1–B5. Z geografsko in klinično povezavo med (pod)linijami HPV-6 smo pokazali, da so različice iz linije B prevladovale globalno, v Aziji različice iz linije A in v Afriki ter Severni in Južni Ameriki različice iz podlinije B3. Različice B3 so bile bolj pogoste pri ženskah in različice B1 in B3 v anogenitalnih okužbah (12).

V naslednji raziskavi, v kateri smo nadaljevali naše delo na področju genetske raznolikosti klinično pomembnih nizkorizičnih genotipov HPV (angl. *low-risk HPV*, LR-HPV), smo opredelili genomsko področja L1, LCR in E6 14 izolatov HPV-40, 49 izolatov HPV-42, 10 izolatov HPV-43 in 35 izolatov HPV-44 (13). Po podatkih iz dosegljive literature je ta raziskava predstavljala prvo opredelitev podtipskih različic HPV-40, HPV-42 in HPV-43 doslej. Pri posameznemu genotipu HPV smo opisali številne različice genomskih področij L1, LCR in E6, opredeljene s številni zamenjavami, vstavki ali izpadi nukleotidov, ki so skupno sestavljale 9 podtipskih različic HPV-40, 30 podtipskih različic HPV-42, tri podtipe različice HPV-43 in 19 podtipskih različic HPV-44. Na osnovi molekularno-filogenetskih analiz združenega zaporedja L1, LCR in E6 smo prvič dokazali, da obstoječe podtipe različice HPV-42 in HPV-43 tvorijo filogenetsko drevo z dvema izrazito ločenima skupinama različic, ki so najverjetneje nastale v procesu evolucijskega ločevanja na dve samostojni taksonomski enoti oziroma dva nova genotipa HPV. Podoben fenomen smo v raziskavi potrdili tudi za HPV-44 (13).

Leta 2008 je bila odkrita nova, domnevno manj patogena različica HPV-16 z značilnim, 63 baznih parov velikim vstavkom v genu E1, ki evolucijsko pripada skupini različic HPV-16 E6-T350G. V raziskavi, v katero smo vključili 390 HPV-16-pozitivnih vzorcev, ki so bili osamljeni pri istemu številu žensk z normalno citologijo, cervikalnimi intraepitelijskimi neoplazijami stopnje 1–3 (angl. *cervical intraepithelial neoplasia* 1–3, CIN 1–CIN 3) in rakom materničnega vratu, smo želeli ugotoviti kolikšen de-

lež okužb s HPV-16 v Sloveniji dejansko povzroča različica z vstavkom v genu E1 HPV-16 E1. Različico HPV-16 E1, ki smo jo dokazovali s pomnoževanjem 146–210 baznih parov velikega dela gena E1 in sekvenciranjem 167 baznih parov velikega dela gena E6, smo dokazali v sedmih od 48 (14,6 %) vzorcev žensk z normalno citologijo, enem od 21 (4,8 %) vzorcev žensk s CIN 1, dveh od 20 (10,0 %) vzorcev žensk s CIN 2, devetih od 131 (6,9 %) vzorcev žensk s CIN 3 in 12 od 170 (7,1 %) vzorcev žensk z rakom materničnega vratu. Čeprav smo zaznali trend upadanja prevalece različice HPV-16 E1 z naraščanjem stopnje cervikalnih sprememb, razlike v njeni prevalenci med ženskami z normalno citologijo, različnimi predrakavimi spremembami ali rakom materničnega vratu niso bile statistično pomembne (14).

### Diagnostika okužbe s HPV

Na povabilo Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organisation*, WHO) smo s priznanimi tujimi raziskovalci na področju HPV napisali dva pregledna članka, ki sta del obsežne HPV-monografije z naslovom »*Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases*«, objavljene kot posebna izdaja revije *Vaccine* konec leta 2012. HPV-monografija 2012 še vedno predstavlja osnovni vir vseh najpomembnejših informacij na področju HPV in z njimi povezanih bolezni. V prvem članku smo naredili podroben pregled vseh komercialno dostopnih metod za dokazovanje okužbe z  $\alpha$ -PV. Aprila 2012 smo s pregledom vseh pomembnejših podatkovnih baz ugotovili, da je na svetovnem tržišču vsaj 125 različnih komercialnih testov HPV in vsaj 84 njihovih različic (15). Do konca septembra 2015 se je to število že povišalo na 193 različnih testov HPV in 127 različic.

V sklopu HPV-monografije 2012 smo napisali tudi povzetek ključnih meta-analiz in preglednih člankov, ki so obravnavali uporabnost testiranja HPV za tri ključne klinične indikacije (16):

- triažo bolnic s citološko diagnozo ASC-US (angl. *atypical squamous cells of undetermined significance*) ali LSIL (angl. *low grade squamous intraepithelial lesion*),
- kontrolo uspešnosti zdravljenja sprememb CIN 2+ in
- primarno presejalno testiranje za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu.

Naši izsledki so pokazali, da je triaža žensk z diagnozo ASC-US s klinično validiranim testom HPV statistično značilno občutljivejša metoda za odkrivanje hudih predrakavih sprememb materničnega vratu in enako specifična metoda kot ponavljajoči

se brisi materničnega vratu. V triaži žensk z blago diskariotičnimi celicami se je klinično validiran test HPV izkazal za bolj občutljiv za odkrivanje hudih predrakavih sprememb materničnega vratu kot ponavljajoči se brisi materničnega vratu, vendar je imel znatno manjšo specifičnost. V nadaljevanju smo ugotovili, da je bilo HPV-testiranje statistično značilno občutljivejša in primerljivo specifična metoda za odkrivanje rezidualnega ali recidivnega CIN 2+ kot kontroliranje z brisom materničnega vratu. V primarnem presejalnem testiranju za raka materničnega vratu so klinično validirani testi HPV izkazali večjo občutljivost za odkrivanje CIN 2+ kot citologija toda nekoliko manjšo specifičnost. Slednjo lahko izboljšamo z refleksno citologijo in/ali refleksnim ali sočasnim določanjem HPV-16 in HPV-18 ali nekaterimi drugimi triažnimi testi (npr. imunohistokemično barvanje celične beljakovine p16<sup>INK4a</sup> ali p16/Ki-67). Izsledki naše raziskave podpirajo uporabo testa HPV kot najbolj primerne metode za triažo žensk z atipičnimi ploščatimi celicami materničnega vratu, za spremljanje žensk po zdravljenju CIN 2+ in pri primarnem presejanju za raka materničnega vratu pri ženskah starejših od 30 let (16).

V letos objavljenem prispevku smo opozorili, da je potrebna previdnost pri interpretaciji rezultatov raziskav, ki z retrogradnim sledenjem spremljajo učinkovitost citologije in HPV testiranja pri presejalnih programih za raka materničnega vratu. Ob pristranskih izvedbah takšnih raziskav lahko zaradi neprimerne zasnovne močno precenimo občutljivost citologije (17).

Zaradi velikega odmeva HPV-monografije 2012 se je WHO odločila pripraviti tudi povzetek celotne monografije, ki je bil objavljen v vseh štirih t.i. regionalnih monografijah, objavljenih kot posebna izdaja revije *Vaccine* konec leta 2013. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2008 med 12,7 milijoni novih primerov raka na svetu 4,8 % mogoče pripisati okužbi s HPV, incidenca in umrljivost pa je bila bistveno večja v državah v razvoju kot v razvitih državah. V zadnjih letih se je poznavanje naravnega poteka okužbe s HPV zelo izboljšalo, preizkušane in vpeljane so bile strategije za varno in učinkovito cepljenje proti okužbi s HPV, razvite so bile vedno bolj zanesljive molekularne diagnostične metode za odkrivanje in presejalno testiranje na raka materničnega vratu, svetovna ozaveščenost o HPV in o boleznih, povezanih z okužbo s HPV, se je občutno izboljšala. Hkrati s tem napredkom so se pojavili novi pereči izzivi: cena preprečevanja okužbe s HPV in zdravstvene obravnave, tehnične omejitve pri uvajanju preventivnih programov, družbeni in politični odpor do različnih možnosti preprečevanja okužb in zelo velike razlike v ekonomskih zmo-

žnostih in zdravstvenih sistemih v različnih državah. Preoblikovanje paradigme preprečevanja raka materničnega vratu in ostalih bolezni, povezanih s HPV, zahteva vključitev strateške kombinacije vsaj štirih pomembnih komponent: (i) rutinske uvedbe cepljenja proti HPV za ženske v vseh državah, (ii) povečanja in poenostavitve obstoječih programov presejanja z uporabo novih tehnologij, (iii) povečanja in prilagoditve presejalnih programov za izvajanje v državah v razvoju in (iv) obravnave širšega spektra rakov in ostalih bolezni, ki jih je možno preprečiti s cepljenjem proti HPV pri ženskah in moških (18).

RealTime High Risk HPV (RealTime, Abbott Molecular, Des Plaines, IL ZDA) je test HPV, ki temelji na metodi RT-PCR in je sposoben ločiti med okužbo s HPV-16, HPV-18 in 12 HR-HPV (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 in HPV-68) (19–22). Nemški raziskovalci so v sodelovanju z našim laboratorijem primerjali analitično in klinično občutljivost in specifičnost testa RealTime s testom hc2 pri 545 ženskah, ki so bile napotene na nadaljnjo kolposkopsko obravnavo. Raziskava je pokazala primerljive klinične in analitične rezultate med obema testoma, z izjemo višje analitične specifičnosti testa RealTime v primerjavi s HC2 (21). V nizozemski raziskavi, izvedeni v sodelovanju z našim laboratorijem, so neodvisno potrdili, da RealTime izpolnjuje vse kriterije mednarodnih priporočil za presejalni test za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu (klinično občutljivost, klinično specifičnost in znotraj- in med-laboratorijsko ponovljivost) (20). V pregledu literature, ki je zajemala vse objave analitičnih in kliničnih evalvacij testa RealTime med leti 2009 in 2013, smo ugotovili, da ima test RealTime zelo visoko klinično občutljivost za detekcijo CIN 2+ in CIN 3+ in primerljivo klinično specifičnost s testom HC2. Glede na objavljene rezultate lahko zaključimo, da se test RealTime lahko uporablja v klinični praksi kot validiran triažni test HPV za nadaljnjo obravnavo žensk s nejasnim oziroma mejnim citološkim izvidom ter kot presejalni test za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu (19).

V raziskavi, izvedeni leta 2012, smo primerjali učinkovitost testa RealTime z učinkovitostjo diagnostičnega kompleta INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (INNO-LiPA, Fujirebio, Malvern, PA, ZDA) za dokazovanje in identifikacijo HPV v 60 arhivskih tkivnih vzorcih karcinoma ustne votline in ustnega dela žrela, fiksiranih v formalinu. Z obema metodama smo HPV DNA oziroma HPV-16 dokazali v petih (8,3 %) primerih, s čimer smo dokazali, da je RealTime v kombinaciji s kompletom QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) hitra, zanesljiva, občutljivi-



va in specifična metoda za dokazovanje in delno genotipizacijo tarčnih genotipov HPV v arhivskih tkivnih vzorcih raka glave in vratu (22).

Najbolj pogosto uporabljan test za genotipizacijo HPV, Linear Array HPV Genotyping test (Linear Array, Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ, ZDA) zazna prisotnost 37 genotipov HPV, med drugimi tudi vseh 12 HR-HPV. Zaradi navzkrižno reaktivne HPV-33/35/52/58 lovke v vzorcih, kjer dokažemo prisotnost HPV-33, HPV-35 in/ali HPV-58, ne moremo potrditi okužbe s HPV-52. Z uporabo HPV-52 tipsko-značilnega RT-PCR smo dokazali, da ima Linear Array izjemno visoko analitično občutljivost (100 %) za dokazovanje okužbe s HPV-52 v vzorcih, kjer ni dokazane okužbe s HPV-33, HPV-35 in/ali HPV-58, vendar je dodatno testiranje nujno pri vzorcih, kjer dokažemo sočasno okužbo s HPV-33, HPV-35 ali HPV-58 (23).

V nedavno objavljenem preglednem članku smo opredelili, kateri testi HPV, ki se uporabljajo za dokazovanje visokorizičnih genotipov, izpolnjujejo mednarodne kriterije za uporabo v primarnem presejalnem testiranju za raka materničnega vratu. Med teste HPV, ki izpolnjujejo vse kriterije za klinično validacijo lahko uvrstimo Hybrid Capture 2 (hc2) HPV DNA Test (Qiagen Gaithersburg, Inc., MD, ZDA), EIA kit HPV GP HR (Diassay, Rijswijk, Nizozemska), RealTime High Risk HPV test (Abbott Molecular, Des Plaines, IL), cobas 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, ZDA), PapilloCheck High-risk Test (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemčija), BD Onclarity HPV Assay (BD Diagnostics, Sparks, MD), HPV-Risk assay (Self-Screen BV, Amsterdam, Nizozemska) in APTIMA HPV assay (Hologic, Madison, WI), ko bodo na voljo podatki z vsaj 5 letnim sledenjem (24).

### **Presečna raziskava »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s HPV v priložnostnem vzorcu žensk, starih od 20 do 64 let«**

V presečno raziskavo »Opozorilno epidemiološko spremljanje okužb s HPV v priložnostnem vzorcu žensk, starih od 20 do 64 let,« ki je potekala med decembrom 2009 in avgustom 2010, je bilo vključenih več kot 4.400 žensk, ki so v 16 izbranih ginekoloških ambulantah po vsej Sloveniji prišle na ginekološki pregled v okviru nacionalnega presejalnega programa za raka materničnega vratu (25, 26). Ginekologi so odvzeli bris materničnega vratu za citološko preiskavo in bris za testiranje na HR-HPV s testom hc2 in RealTime. Prevalenca okužb z vsaj enim od 14 HR-HPV je bila 12,9 %. Prevalenca okužb z HR-HPV je bila najvišja v starostni skupini 20–24 let in se je zniževala s starostjo in najnižja med ženskami z normalnim izvidom citološke pre-

iskave brisa materničnega vratu in se je zviševala s stopnjo cervikalne patologije. Najbolj pogosta je bila okužba s HPV-16 (3,5 %), ki ji je sledila okužba s HPV-31 (2,6 %), HPV-51 (1,8 %) in HPV-52 (1,8 %) (25).

Naključno izbranih 1.000 brisov materničnega vratu je bilo dodatno testiranih na prisotnost 37 genotipov HPV s testom Linear Array v namen določitve prevalence 25 ne-visokorizičnih genotipov HPV. Prevalenca okužbe s temi 25 genotipi HPV je bila 10,0 %, brez sočasne okužbe s HR-HPV pa 4,0 %. Najbolj pogost genotip je bil HPV-53 (2,0 %), ki so mu sledili HPV-54 (1,7 %), HPV-42 (1,6 %) in HPV-89 (1,6 %) (26).

Pri 3.259 ženskah, ki so sodelovale v presečni raziskavi, smo poleg brisa materničnega vratu, ki smo ga testirali na HPV DNA, pridobili tudi serumski vzorec. S testiranjem izbranih genotip-specifičnih anti-HPV protiteles smo ocenili seroprevalenco 11 HR-HPV in 4 LR-HPV in sicer HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68 in HPV-73. Kumulativna seropozitivnost na enega izmed 15 testiranih genotipov HPV je bila 56 %, na enega od 11 HR-HPV 59,2 % in na enega od 4 LR-HPV 33,1 %. Protitelesa, usmerjena proti kate-remkoli od štirih genotipov HPV, ki so vključeni v štirivalentno cepivo proti HPV, so bila prisotna pri 40,8 % žensk. Seropozitivnost za posamezne cepilne genotipe HPV je bila: HPV-16 (25,2 %), HPV-18 (9,4 %), HPV-6 (19,1 %) in HPV-11 (5,8 %). Starostno-specifična seropozitivnost je bila najvišja pri ženskah, starih 30–39 let (29,6 %) in je upadala s starostjo (14 % pri ženskah, starih 60–64 let) (27). Istočasno s to raziskavo smo opisali tudi validacijo uporabljene serološke metode, ki temelji na tehnologiji Luminex, pri kateri se HPV-specifična protitelesa iz bolnikovega seruma vežejo na HPV-specifične-virusom-podobne delce. Validacija serološke metode je temeljila na primerjavi prisotnosti DNA 15 izbranih genotipov HPV v brisih materničnega vratu in prisotnosti HPV-specifičnih protiteles v serumu. Statistično pomembno povezavo med prisotnostjo anti-HPV genotip-specifičnih protiteles in prisotnostjo HPV DNA smo dokazali pri 13 genotipih HPV. Statistična povezava je bila močnejša pri ženskah, ki so bile okužene samo z enim genotipom HPV, v primerjavi z ženskami, okuženimi z več genotipi HPV (28).

V podraziskavi, ki je vključevala 195 žensk iz osnovne presečne raziskave, okužba s HR-HPV ni imela vpliva na število ali odstotek zrelih jajčnih celic, odstotek oplojenih jajčnih celic, kakovost zarodka ali na stopnjo zanositve in tako ni bila povezana z uspehom postopkov zunajtelesne oploditve (29).

### **Breme in preprečevanje s HPV povezanih novotvorb v državah Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije**

Na povabilo WHO smo koordinirali nastanek obsežne regionalne HPV-monografije z naslovom »*Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases in the Central and Eastern Europe and Central Asia Region*,« objavljene kot posebna izdaja revije *Vaccine* konec leta 2013. Monografija, ki vsebuje 6 člankov, je prvi in najpopolnejši pregled bremena in trenutnega stanja programov za preprečevanje s HPV povezanih novotvorb v državah Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije (30–33). Podatki za izdelavo monografije so bili poleg natančnega pregleda objav (večinoma objave v lokalnih jezikih) pridobljeni tudi s pomočjo dveh podrobnih vprašalnikov, ki smo jih pripravili ter njihovo izpolnjevanje in analizo koordinirali v našem laboratoriju. Zaradi omejenega prostora v regionalni HPV-monografiji smo del pridobljenih rezultatov objavili tudi v reviji *Acta Dermatovenerologica APA* (34–37).

V Srednji in Vzhodni Evropi z visoko incidenco raka materničnega vratu izstopata predvsem Romunija in Makedonija pred Bolgarijo, Litvo in Srbijo, v Srednji Aziji pa Kirgizistan, Kazahstan in Armenija (33, 38). Visoko breme raka materničnega vratu še poslabšuje pomanjkanje učinkovitega presejanja in vedno višja umrljivost med mlajšimi ženskami. V nekaterih državah je opazen »efekt starostne kohorte«, kjer je tveganje za raka materničnega vratu povečano v zaporednih generacijah žensk, rojenih okrog let 1940–1950, kar je splošni pojav, ki kaže na spremembe spolnega vedenja v teh generacijah in povečano tveganje dolgotrajne okužbe s HPV (33). Možnosti za zmanjšanje bremena s HPV povezanih bolezni so odvisne od sredstev, ki so na razpolago. Zagotovo bi univerzalno cepljenje proti HPV z izboljšanjem presejanja bistveno zmanjšalo breme v teh dveh regijah Evrope in Azije (33, 38).

Objavljeni podatki o bremenu okužb s HPV, presejalnih programih za odkrivanje raka materničnega vratu in uvajanju cepljenja proti HPV v 16 državah Srednje in Vzhodne Evrope so zelo omejeni (31, 38). Analiza 28 najpomembnejših raziskav, narejenih na tkivnih vzorcih raka materničnega vratu, zadnjika in vulve v 16 državah Vzhodne in Srednje Evrope, je pokazala prisotnost HPV DNA v 86,6 % od 2.531 primerov raka materničnega vratu; 87,5 % HPV-pozitivnih rakov je vsebovalo HPV-16 in/ali HPV-18 (31, 37). Prevalenca HPV DNA pri raku zadnjika je bila 90,7 %, HPV-16 je bil prisoten v 86 %. Pri 164 primerih raka vulve je bila HPV DNA ugotovljena pri 32,9 %, delež HPV-16 pozitivnih rakov je znašal od 10,9 % do 27,5 % (37). Prevalenca HPV DNA v ra-

kah materničnega vratu, zadnjika in vulve in distribucija genotipov v Vzhodni in Srednji Evropi je bila primerljiva z ostalimi evropskimi regijami (31, 37). V Vzhodni in Srednji Evropi se oportunistično presejanje na raka materničnega vratu izvaja v devetih od 16 in organizirano presejanje v sedmih od 16 držav. Presejalni programi večinoma temeljijo na uporabi citologije, pregledanost žensk pa niha med nekaj odstotkov do 70 % (31). Breme raka materničnega vratu v državah Vzhodne in Srednje Evrope je praviloma višje v primerjavi z Zahodno in Severno Evropo, predvsem zaradi dolgoletne prakse oportunističnega presejanja, pa tudi zaradi močnega vpliva političnih in ekonomskih sprememb v obdobju prehoda iz komunizma (36). Dober primer vpliva teh sprememb je Latvija, kjer je bilo presejalno testiranje na raka materničnega vratu od začetka 60-ih let prejšnjega stoletja pomemben del preventivne dejavnosti s posledično pomembnim znižanjem incidence do leta 1989, vendar je bilo po letu 1991 prekinjeno. Po ponovni uvedbi presejalnega testiranja, ki je ostalo oportunistično, se je Latvija morala soočiti s številnimi problemi, ki so vplivali na nizko stopnjo presejanja tarčne populacije žensk, in šele uvedba organiziranega presejalnega testiranja leta 2009 je povzročila spremembo v trendu ter spodbudne rezultate (34). Večina držav v regiji se še vedno bori s težavami, ki ovirajo uspešno uvedbo programa, spodbudno dejstvo pa je, da se tudi države, ki so do zdaj imele le oportunistični program presejanja, pospešeno pripravljajo na prenovo programov, ki bodo zagotavljali organizirano nacionalno presejanje na raka materničnega vratu (36).

Pregled trenutnega stanja uvedbe cepljenja proti HPV v 16 državah Vzhodne in Srednje Evrope je pokazal, da je vsaj eno izmed obeh cepiv, ki sta trenutno na tržišču, registrirano v vseh državah z izjemo Črne Gore. Do sedaj je le šest držav (Bolgarija, Češka, Latvija, Romunija, Slovenija in Makedonija) cepivo proti HPV uvedlo tudi v nacionalni program cepljenja in zagotovilo brezplačno rutinsko cepljenje tarčne populacije. Glavno oviro za uvedbo cepiva proti HPV v nacionalni program cepljenja pri ostalih 10 državah predstavlja predvsem visoka cena in negativno mnenje širše javnosti (31, 35). Cepljenje moških trenutno ni vključeno v nacionalni program cepljenja v nobeni izmed 16-tih držav v regiji (35).

Podatki o bremenu s HPV povezanih okužb v Rusiji, zahodnih državah nekdanje Sovjetske zveze, Kavkaški regiji in Centralni Aziji so zelo omejeni, incidenca in umrljivost zaradi raka materničnega vratu pa sta v tej regiji višji kot v večini zahodnoevropskih držav. Ocenjena prevalenca okužb s HPV pri ženskah z normalno citologijo na podlagi zelo

omejenega števila raziskav je znašala od 0 % do 48 %, pri ženskah s predrakavimi spremembami višje stopnje od 77,2 % do 100 % in v rakah materničnega vratu od 89,9 % do 100 %. Programi presejanja so dokaj neuspešni zaradi oportunističnega značaja, problemi z odzivom žensk in pomanjkanja zanesljive citologije s centralnim registrom. Cepivo proti HPV je registrirano v desetih od 12 držav v regiji, vendar nikjer ni zares implementirano, predvsem zaradi visoke cene, slabe dostopnosti in pomanjkanja ozaveščenosti tako širše javnosti kot tudi zdravstvenih delavcev (32).

Na osnovi pridobljenih podatkov smo pripravili tudi prva uradna priporočila za preprečevanje raka materničnega vratu za države Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije. Zaključili smo, da je potrebno takojšnje ukrepanje, ki bo vključevalo neprekinjene, usklajene in stopenjske programe preprečevanja raka materničnega vratu s kombiniranim pristopom cepljenja proti HPV (primarna preventiva) in presejanja na raka materničnega vratu (sekundarna preventiva). Priporočene so tri različne strategije preprečevanja raka materničnega vratu za države Vzhodne in Srednje Evrope ter Srednje Azije, katerih uvajanje je odvisno od obstoječih možnosti in trenutnega stanja v posameznih državah (30):

- Države z organiziranim presejalnim programom si morajo prizadevati za povečanje preglednosti žensk, ki se ne udeležujejo presejanja, za uvedbo testiranja na HPV v obstoječe programe in uvedbo cepljenja proti HPV v nacionalni program cepljenja.
- Države z oportunističnim programom z dobro delujočo mrežo citoloških laboratorijev naj poskušajo postopno spremeniti trenutni program v organizirano presejanje bodisi s testiranjem na HPV ali s citologijo in si hkrati prizadevati za uvedbo cepljenja proti HPV v nacionalni program.
- Države z nedelujočim oportunističnim presejanjem se morajo zavedati, da je uvedba presejalnega programa s citologijo lahko predraga ali celo nedosegljiva zaradi pomanjkanja znanja, usposobljenega kadra, infrastrukture in nadzora kvalitete, zato se v teh državah kot najprimernejša strategija priporoča uvedba cepljenja proti HPV v nacionalni program cepljenja in *de novo* uvedba presejanja s testiranjem na HPV v podaljšanih časovnih intervalih.

Zaradi odmevnosti regionalne HPV-monografije smo bili povabljeni k pisanju dveh preglednih člankov in sicer o bremenu in preprečevanju raka materničnega vratu v Evropi ter cepljenju proti HPV (39, 40). Ugotovili smo, da kljub stabilnemu trendu incidence rak materničnega vratu ostaja

pomemben javnozdravstveni problem v celi Evropi. Incidenčne stopnje se med evropskimi regijami pomembno razlikujejo in so najnižje v Zahodni Evropi, kjer so preventivni programi bistveno bolj razviti, medtem ko so incidenčne in umrljivostne stopnje v Vzhodni in Srednji Evropi bistveno višje in so tesno povezane z intenzivnostjo organiziranega presejanja (39). V evropskih državah z visoko precepljenostjo tarčne populacije s cepivom proti HPV se že kažejo prvi učinki v obliki zmanjšanja prevalece tarčnih genotipov HPV in tudi bolezni, povezanih z okužbo s HPV (40).

S presejanjem in cepljenjem proti HPV imamo izjemno priložnost, znatno zmanjšati pojavnosti raka materničnega vratu, vendar je učinkovitost pogojena z vzpostavitvijo organiziranih presejalnih programov in cepljenjem večjih generacij žensk. Letos smo v ta namen izdali razširjenja priporočila za cepljenje proti HPV, kjer predlagamo, da se cepi vse ženske do starosti 30. let in v nekaterih državah tudi starejše ženske (41). Dodatno bi vsem ženskam po 30. letu omogočili vsaj en presejalni test na HPV. Takšen kombiniran pristop bi bil zlasti primeren v državah Srednje in Vzhodne Evrope, Latinske Amerike, Azije in nekatere delih Afrike (41). Predlagana razširitev programa cepljenja bi lahko pripomogla k opaznemu upadu incidence s HPV povezanih novotvorb (41). Trenutno je rak materničnega vratu eden izmed redkih malignih obolenj, kjer bi z učinkovitim presejanjem in cepljenjem lahko drastično zmanjšali incidenco in umrljivost, če ne celo dosegli eradikacije bolezni (42).

### HPV in benigni in maligni tumorji v anogenitalnem področju

Profilaktično štirivalentno cepivo, ki ščiti pred okužbo z genotipi HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18, se je v svetu že izkazalo za učinkovito pri nadzoru širjenja okužb in bolezni, povezanih s tarčnimi genotipi. Štirivalentno cepivo HPV je bilo v Sloveniji uvedeno brez predhodnih zanesljivih podatkov o prevalenci HPV in razporeditvi genotipov HPV v malignih in benignih tumorjih (razen pri raku materničnega vratu) pred uvedbo cepljenja, na podlagi katerih bi lahko ocenili učinek cepljenja s štirivalentnim cepivom.

V raziskavi, opravljeni na 422 histološko potrjenih tkivnih vzorcev anogenitalnih bradavic, odvzetih 315 imunokompetentim bolnikom obeh spolov, smo DNA HPV dokazali pri 306 izmed 315 (97,1 %) bolnikov z anogenitalnimi bradavicami, od tega sta bila HPV-6 in/ali HPV-11 prisotna pri 92,4 % bolnikov, kar nakazuje, da bi nastanek večine teh tumorjev lahko preprečili s profilaktičnim štirivalentnim HPV cepivom. Prevalenca HPV-6 se v anogenitalnih

bradavicah med spoloma statistično ni razlikovala, nasprotno je bil HPV-11 trikrat pogostejši pri moških z anogenitalnimi bradavicami. Več bradavic sočasno prisotnih na različnih anatomskih mestih smo našli pri 90 izmed 315 (29 %) bolnikov z anogenitalnimi bradavicami. Pri vseh 90 bolnikih smo v vseh bradavicah posameznega bolnika dokazali prisotnost istega genotipa HPV (43).

V raziskavi, ki je sledila, smo na 45 izolatih HPV-6, osamljenih iz svežih tkivnih vzorcev anogenitalnih bradavic, odvzetih 18 naključno izbranim bolnikom s HPV-6 povzročeni sočasni bradavicami, s sekvenčno analizo štirih genomskih področij HPV-6 (L1, E5a, E5b in LCR) dodatno potrdili našo domnevo, da je nastanek multiplih bradavic pri posameznem bolniku posledica okužbe z eno samo genomsko različico HPV-6 in ne posledica okužbe z več različicami istega genotipa (44).

V mednarodni raziskavi, ki je vključevala tkivne vzorce iz 24 držav, in v kateri je sodeloval tudi naš laboratorij, smo med 43 histološko potrjenimi intraepitelijskimi neoplazijami zadnjika stopnje 2 in 3 (angl. *anal intraepithelial neoplasia*, AIN) dokazali prisotnost HPV v 95,3 % ter med 496 vzorci raka zadnjika v 88,3 %. Najbolj pogosto zaznan genotip HPV, tako v AIN 2 oziroma AIN 3 kot v raku zadnjika je bil HPV-16, ki je bil dokazan v 75,4 % in 80,7 % vzorcev, v invazivnim raku zadnjika mu je sledil HPV-18 (3,6 %). V pod-vzorcu 116 rakov zadnjika smo dokazali tudi povečano izražanje p16<sup>INK4A</sup> v 95 % vseh HPV pozitivnih rakov, kar kaže na zelo podobno patogenetsko povezavo med okužbo s HPV in rakom zadnjika kot z rakom materničnega vratu (45).

V raziskavi, objavljeni leta 2011, v katero je bilo vključenih 21 vzorcev raka zadnjika, odvzetih istemu številu bolnikov iz Slovenije, smo prisotnost HPV DNA dokazali v vseh 21 preiskanih vzorcih. Pričakovano je bil najpogosteje najden genotip HPV-16 (v 19 izmed 21 vzorcev) (46).

V Sloveniji mikroinvazivni SCC predstavlja pomemben delež novoodkritih rakov materničnega vratu. V nedavno objavljeni raziskavi so želeli ugotoviti zanesljivost histopatološke ocene mikroinvazivnega SCC pri bolnicah, diagnosticiranih v naši državi v obdobju let od 2001 do 2007. Za ponoven histopatološki pregled je bilo primernih 250 primarnih biopsij, od tega je bilo 73,6 % ponovno ocenjenih kot mikroinvazivni SCC z izrazito prevladujočim FIGO-stadijem IA1 in velikim deležem zgodnje stromalne invazije znotraj tega stadija. Avtorji so zaključili, da je ponovni pregled biopsij pokazal znaten delež precenjenih diagnoz, najpogostejša histopatološka sprememba v precenjenih vzorcih pa je bil ob-

sežen CIN 3 z vraščanjem v kripte endocervikalnih žlez (47).

Vpliv HPV na lastnosti semenske tekočine pri neplodni populaciji še ni dokončno opredeljen. V nedavni raziskavi smo želeli določiti prevalenco HPV v parnih vzorcih: brisih zunanega spolovila in vzorcih semenske tekočine, odvzetih 340 slovenskim moškim iz neplodnih parov ter opredeliti ali okužba s HPV vpliva na lastnosti semenske tekočine. Prisotnost HPV DNA je bila dokazana v 37,1 % brisov zunanega spolovila in 13,6 % vzorcev semenske tekočine, z visoko skladnostjo HPV genotipov prisotnih na obeh mestih vzorčenja. Najpogosteje dokazana genotipa v vzorcih zunanega spolovila sta bila HPV-CP6108 in HPV-84, v vzorcih semenske tekočine pa HPV-53 in HPV-CP6108. Prevalenca HPV v semenski tekočini z normalnimi in patološkimi lastnostmi se ni pomembneje razlikovala, prav tako okužba s HPV ni vplivala na kakovost semenske tekočine, zato sklepamo, da okužba s HPV ne vpliva bistveno na zmanjšanje plodnosti moških (48).

#### Ostale raziskave na področju HPV

Od novembra 2011 smo slovenski raziskovalci objavili 11 raziskav na temo okužb s HPV v povezavi z različnimi benignimi in malignimi tumorji glave in vratu. Največ raziskav je proučevalo pomen okužbe z nizkorizičnimi genotipi HPV v nastanku papilomov grla ter njihovim preprečevanjem in zdravljenjem (43, 49–58).

$\beta$ -PV so predvsem pri imunsko oslabilih osebah povezani z nastankom predrakavih sprememb in raka kože. V nedavni raziskavi smo dokazali, da je 65,2% moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, okuženih z vsaj enim genotipom  $\beta$ -PV (59). V raziskavi, objavljeni konec leta 2011, smo pokazali, da so  $\beta$ -PV neenakomerno razporejeni v obrveh in da celo vzorci, v katerih je združenih več dlačnih mešičkov, ne zagotavljajo popolne informacije o celotnem spektru genotipov HPV prisotnih v obrveh (60).

Slovenski raziskovalci so med drugim objavili tudi več člankov iz področja bazičnih raziskav, kjer so preučevali uravnavanje izražanja virusnih genov, vstop in prenos virusa v jedro celice ter vlogo različnih beljakovin v naravnem poteku okužbe (61–64).

#### Osnovni koncept diagnostike okužbe s HPV

HPV dokazujemo skorajda izključno z molekularnimi metodami. Okužbo s HPV je sicer mogoče dokazati tudi z opazovanjem značilnih citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom,



z opazovanjem virusnih delcev s pomočjo elektronskega mikroskopa ali z dokazovanjem virusnih strukturnih beljakovin z uporabo poliklonskih protiteles z imunohistokemično metodo, vendar se zaradi nizke občutljivosti in nezmožnosti določanja genotipa HPV te metode ne uporabljajo v rutinski diagnostiki okužb s HPV.

HPV-testiranje se v številnih državah, vključno s Slovenijo, rutinsko uporablja za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za rak materničnega vratu. V Sloveniji se triažni test HPV (hc2) rutinsko uporablja od leta 2010 kot pomoč pri odločitvi, ali ženska potrebuje kolposkopski pregled ali ne. Indikacije za uporabo triažnega testa HPV pri ženskah so:

- atipične ploščate celice, neopredeljene (APC-N),
- ploščatocelična intraepitelijska neoplazija nizke stopnje (PIL-NS), pri ženskah starih 35 let ali več,
- atipične žlezne celice, neopredeljene (AŽC-N),
- spremljanje žensk s CIN 1,
- CIN – po zdravljenju.

Klinični pomen izvida testa HPV v kolposkopski ambulanti ter problemi povezani z nekritično uporabo ali neuporabo testa HPV so podrobno opisani v prispevku Ivanuš U. in Primic Žakelj M. z naslovom Pomen izvida testa HPV v kolposkopski ambulanti, objavljenem v Zborniku kolposkopskega tečaja 2013. V nadaljevanju bomo le na kratko predstavili osnovni koncept HPV-testiranja v primerjavi z drugimi mikrobiološkimi testi, ki jih uporabljamo v medicini.

Smernice, ki narekujejo uporabo testov HPV, temeljijo izključno na uporabi klinično preverjenih testov. Kljub zelo velikemu številu HPV testov, smo po nedavnem natančnem pregledu objav v medicinskih revijah ugotovili, da le zelo omejeno število testov HPV na tržišču (manj kot desetina) zadovoljuje minimalnim kriterijem za varno uporabo v klinične namene za vsaj eno od dogovorjenih kliničnih indikacij. Poleg tega za več kot 65 % testov HPV, ki so trenutno komercialno dostopni, kljub obsežnemu pregledu literature, nismo našli niti ene same objave o evalvaciji v recenziranih znanstvenih revijah. Enotni zaključek vseh strokovnjakov je, da tako komercialno dostopnih testov HPV kot tistih razvitih v laboratoriju (angl. *in-house tests*), ki niso bili ustrezno klinično preverjeni, ne smemo uporabljati v klinični praksi. Zaradi pomanjkanja predpisov in šibke kontrole na tem področju, se na žalost po vsem svetu v vsakdanji praksi uporabljajo številni testi HPV, ki niso klinično preverjeni. To se na srečo v Sloveniji zaenkrat ne dogaja in močno upamo, da bo tako ostalo tudi v prihodnje.

Podobno kot drugi mikrobiološki testi, ki jih uporabljamo v medicini, mora vsak nov test HPV, ki naj bi ga uporabljali v klinični praksi, izpolnjevati dogovorjene standarde za klinično specifičnost in občutljivost. Da bi olajšali uvedbo novih komercialno dostopnih testov HPV, so nedavno objavili mednarodna strokovna priporočila o tem, kako ustrezno ovrednotiti novo razvite teste HPV predvsem za varno uporabo v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu ter za druge klinične indikacije. Mednarodna priporočila temeljijo na tem, da morajo testi HPV izpolnjevati vse dogovorjene standarde za klinično občutljivost, klinično specifičnost in znotraj- in med- laboratorijsko ponovljivost, medtem ko se lahko razlikujejo glede na tehnologijo testiranja, stopnjo avtomatizacije, materialne stroške testiranja in sposobnost analize različno velikega števila vzorcev.

HPV-testiranje za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za rak materničnega vratu se bistveno razlikuje od molekularnega testiranja na druge medicinsko pomembne viruse, ker visoka analitična občutljivost testa ni glavni kriterij za njegovo dobro klinično uporabnost. Kljub temu dejstvu, ima več kot tri četrtine komercialno dostopnih testov HPV, ki se trenutno uporabljajo po svetu, previsoko analitično občutljivost, ki vodi v prekomerno odkrivanje prehodnih klinično nemih in produktivnih okužb, s čimer narašča število nepotrebnih kolposkopij in biopsij, slabo korelacijo testa HPV s histologijo, nepotrebno zdravljenje in posledično v zdravnikovo nezaupanje pozitivnim rezultatom testa HPV.

Druga posebnost testov HPV, v primerjavi z drugimi mikrobiološkimi testi, je ta, da je za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za rak materničnega vratu, potrebno uravnovesiti in zmanjšati število tarčnih genotipov HPV v testu. Tako je pri načrtovanju novega testa HPV, ki naj bi se uporabljal za dogovorjene klinične indikacije, potrebno zelo dobro pretehtati, kako uskladiti klinično občutljivost s klinično specifičnostjo za odkrivanje predrakavih sprememb. Z vključitvijo genotipov HPV, ki so pogosti pri nemih okužbah ali predrakavih spremembah nizke stopnje in le redko ali izjemoma povezani z rakom materničnega vratu (npr. HPV-53 ali HPV-66), tvegamo zelo velik padec klinične specifičnosti testa HPV ob zanemarljivi izboljšavi občutljivosti. Prav tako je potrebno imeti v mislih, da ne glede na najvišjo možno analitično občutljivost testa HPV, s katerim izvedemo presejalno testiranje na rak materničnega vratu, negativni izvid ni nikoli popolno zagotovilo za odsotnost bolezni, zaradi mnogih drugih od testa HPV neodvisnih dejavnikov, kot so npr. nekvalitetno odvzet

bris, za bris nedostopna sprememba, zamenjan vzorec, neprimeren transport vzorca, prisotnost bioloških in nebioloških zaviralcev v vzorcu, napaka izvajalca testiranja, zamenjava izvida, neprimerno razumevanje rezultata testa.

Glavni cilji za nadaljnje izboljšave testov HPV so avtomatizacija, boljša klinična občutljivost in višja klinična specifičnost. Raziskave razumevanja mehanizmov patogeneze napredovanja predrakavih sprememb do raka materničnega vratu, ostajajo prednostna naloga, saj bi lahko rezultati takšnih raziskav privedli k odkritju novih biomarkerjev za CIN 3/rak materničnega vratu, ki bi jih lahko uporabili kot nove tarče v obstoječih triažnih testih ali presejalnih programih.

Za razliko od uveljavljene uporabe testa HPV pri ženskah, trenutno vsa vodilna svetovna strokovna združenja odločno odsvetujejo uporabo testa HPV pri moških. Tako ameriški Center for Disease Control and Prevention (CDC) v svojih zadnjih smernicah iz leta 2015 nedvomno navaja, da se test HPV ne priporoča za testiranje moških in testiranje partnerjev HPV-pozitivnih žensk. Za razliko od žensk so namreč pri moških koristi testiranja HPV nejasne. Tudi če pri moškem dokažemo okužbo s HPV, ga ne moremo zdraviti, preden lezija ne postane klinično vidna in če sploh zahteva zdravljenje. To pomeni, da klinično pomembnih lezij pri moškem v naravnem poteku bolezni s testiranjem na HPV ne odkrijemo nič prej, kot bi jo tudi sicer. Tudi ni jasno, kako naj HPV-pozitivne moške brez klinično vidnih lezij spremljamo, še posebej, ker so okužbe s HPV tudi pri moških izjemno pogoste, a večinoma klinično nepomembne.

## Literatura

- Poljak M. A review of 20 years of human papillomavirus research in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 99–112.
- Poljak M, Kocjan BJ, Maver PJ, Seme K, Fujs Komloš K, Jelen MM, et al. Pregled raziskav človeških papilomavirusov v Sloveniji 2012–2014. *Med Razgl.* 2014; 53 (Suppl. 6): 183–199.
- Kocjan BJ, Bzhalava D, Forslund O, Dillner J, Poljak M. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (9): 808–16.
- Bottalico D, Chen Z, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M, Burk RD. Characterization of human papillomavirus type 120: a novel betapapillomavirus with tropism for multiple anatomic niches. *J Gen Virol.* 2012; 93 (Pt 8): 1774–9.
- Kocjan BJ, Hošnjak L, Seme K, Poljak M. Complete genome sequence of a novel human betapapillomavirus HPV-159. *Genome Announc.* 2013; 1 (3): e00298–13.
- Kocjan BJ, Steyer A, Sagadin M, Hošnjak L, Poljak M. Novel human papillomavirus type 174 from a cutaneous squamous cell carcinoma. *Genome Announc.* 2013; 1 (4): e00445–13.
- Hošnjak L, Kocjan BJ, Pirš B, Seme K, Poljak M. Characterization of two novel gammapapillomaviruses, HPV179 and HPV184, isolated from common warts of a renal-transplant recipient. *PLoS One.* 2015; 10 (3): e0119154.
- Kocjan BJ, Šterbenc A, Hošnjak L, Chouhy D, Bolatti E, Giri AA, et al. Genome announcement: complete genome sequence of a novel Mupapillomavirus, HPV204. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2015; 24 (2): 21–3.
- Oštrbenk A, Kocjan BJ, Hošnjak L, Li J, Deng Q, Šterbenc A, et al. Identification of a Novel Human Papillomavirus, Type HPV199, Isolated from a Nasopharynx and Anal Canal, and Complete Genomic Characterization of Papillomavirus Species Gamma-12. *PLoS One.* 2015; 10 (9): e0138628.
- Kocjan BJ, Hošnjak L, Račnik J, Zdravec M, Poljak M. Complete genome sequence of Phodopus sungorus Papillomavirus Type 1 (PsPV1) isolated from a Siberian hamster - a novel member of the Pipapillomavirus genus. *Genome Announc.* 2014; 2 (2): e00311–14.
- Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, et al. Classification and nomenclature system for human alphapapillomavirus variants: General features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 113–23.
- Jelen MM, Chen Z, Kocjan BJ, Burt FJ, Chan PK, Chouhy D, et al. Global genomic diversity of human papillomavirus type 6 (HPV6) based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *J Virol.* 2014; 88 (13): 7307–16.
- Maver PJ, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Genomic diversity of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 40, HPV 42, HPV 43 and HPV 44. *J Med Virol.* 2014; 86 (2): 272–82.
- Bogovac Ž, Lunar MM, Kocjan BJ, Seme K, Jančar N, Poljak M. Prevalence of HPV-16 genomic variant carrying a 63 bp duplicated sequence within the E1 Gene in Slovenian women. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 135–9.
- Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5: F100–6.
- Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5: F88–99.
- Giorgi Rossi P, Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Why follow-back studies should be interpreted cautiously: The case of an HPV-negative cervical lesion. *Cancer Cytopathol.* V tisku 2015.
- Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 8: H1–31.

19. Poljak M, Oštrbenk A. The AbbottHigh Risk HPV test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older: a review of validation studies. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (2): 43–7.
20. Hesselink AT, Meijer CJ, Poljak M, Berkhof J, van Kemenade FJ, van der Salm ML, et al. Clinical validation of the Abbott RealTime High Risk (HR) HPV assay according to the guidelines for HPV DNA test requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (7): 2409–10.
21. Jentschke M, Soergel P, Lange V, Kocjan B, Doerk T, Luyten A, et al. Evaluation of a new multiplex real time PCR assay for the detection of human papillomavirus infections in a referral population. *Int J Gynecol Cancer.* 2012; 22 (6): 1050–6.
22. Kocjan BJ, Maver PJ, Hošnjak L, Zidar N, Odar K, Gale N, et al. Comparative evaluation of the Abbott Real-Time High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for detecting and identifying human papillomaviruses in archival tissue specimens of head and neck cancers. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2012; 21 (4): 73–5.
23. Oštrbenk A, Kocjan BJ, Poljak M. Specificity of the Linear Array HPV Genotyping Test for detecting human papillomavirus genotype 52 (HPV-52). *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2014; 23 (3): 53–6.
24. Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, et al. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (9): 817–26.
25. Učakar V, Poljak M, Klavs I. Pre-vaccination prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in Slovenian women: a cervical cancer screening based study. *Vaccine.* 2012; 30 (2): 116–20.
26. Učakar V, Poljak M, Oštrbenk A, Klavs I. Pre-vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus (HPV) types among 1000 Slovenian women in cervical cancer screening. *J Med Virol.* 2014; 86 (10): 1772–9.
27. Učakar V, Jelen MM, Faust H, Poljak M, Dillner J, Klavs I. Pre-vaccination seroprevalence of 15 human papillomavirus (HPV) types among women in the population-based Slovenian cervical screening program. *Vaccine.* 2013; 31 (43): 4935–9.
28. Faust H, Jelen MM, Poljak M, Klavs I, Učakar V, Dillner J. Serum antibodies to human papillomaviruses (HPV) pseudovirions correlate with natural infection for 13 genital HPV types. *J Clin Virol.* 2013; 56 (4): 336–41.
29. Jančar N, Vrtačnik Bokal E, Poljak M, Oštrbenk A. High-risk human papillomavirus (HPV) infection in women undergoing in vitro fertilization. *Zdrav Var.* 2013; 52 (3): 157–61.
30. Poljak M, Rogovskaya SI, Kesić V, Bray F, Berkhof J, Seme K, et al. Recommendations for cervical cancer prevention in Central and Eastern Europe and Central Asia. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7: H80–2.
31. Poljak M, Seme K, Maver PJ, Kocjan BJ, Cuschieri KS, Rogovskaya SI, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7: H59–70.
32. Rogovskaya SI, Shabalova IP, Mikheeva IV, Minkina GN, Podzolkova NM, Shipulina OY, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western countries of the former Soviet Union, Caucasus region and Central Asia. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7: H46–58.
33. Bray F, Lortet-Tieulent J, Znaor A, Brotons M, Poljak M, Arbyn M. Patterns and trends in human papillomavirus-related diseases in Central and Eastern Europe and Central Asia. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7: H32–45.
34. Vibergera I, Poljak M. Cervical cancer screening in Latvia: A brief history and recent improvements (2009–2011). *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (1): 27–30.
35. Seme K, Maver PJ, Korać T, Canton A, Částková J, Dimitrov G, et al. Current status of human papillomavirus vaccination implementation in central and eastern Europe. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (1): 21–5.
36. Maver PJ, Seme K, Korać T, Dimitrov G, Döbrössy L, Engele L, et al. Cervical cancer screening practices in central and eastern Europe in 2012. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (1): 7–19.
37. Škamperle M, Kocjan BJ, Maver PJ, Seme K, Poljak M. Human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV type distribution in cervical, vulvar, and anal cancers in central and Eastern Europe. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (1): 1–5.
38. Znaor A, van den Hurk C, Primic-Zakelj M, Agius D, Coza D, Demetriou A, et al. Cancer incidence and mortality patterns in South Eastern Europe in the last decade: gaps persist compared with the rest of Europe. *Eur J Cancer.* 2013; 49 (7): 1683–91.
39. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in Europe. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21 (9): 1423–33.
40. Poljak M. Prophylactic human papillomavirus (HPV) vaccination and primary prevention of cervical cancer: issues and challenges. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 Suppl 5: 64–9.
41. Bosch FX, Robles C, Díaz M, Arbyn M, Baussano I, Clavel C, et al. HPV-FASTER: broadening the scope for prevention of HPV-related cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* V tisku 2015.
42. Poljak M. Towards cervical cancer eradication: joint force of HPV vaccination and HPV-based cervical cancer screening. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (9): 806–7.
43. Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, Luzar B, Meglič L, Potočnik M, et al. Tumour-specific and gender-specific pre-vaccination distribution of human papillomavirus types 6 and 11 in anogenital warts and laryngeal papillomas: A study on 574 tissue specimens. *J Med Virol.* 2012; 84 (8): 1233–41.

44. Fujs Komloš K, Košorok P, Kocjan BJ, Poljak M. Genetic diversity of HPV-6 in concurrent multiple anogenital warts. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013; 22 (1): 31–3.
45. Alemany L, Saunier M, Alvarado I, Quirós B, Salmieron J, Shin HR, et al. HPV DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer.* 2015; 136 (1): 98–107.
46. Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, Rus T, Toplak J, Bunič M, et al. Distribution of HPV genotypes in Slovenian patients with anal carcinoma: preliminary results. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 141–3.
47. Gutnik H, Matisic JP, Zakelj MP, Flezar MS. Microinvasive cervical squamous cell carcinoma in Slovenia during the period 2001-2007. *Radiol Oncol.* 2014; 48 (3): 282–8.
48. Golob B, Poljak M, Verdenik I, Kolbezen Simoniti M, Vrtačnik Bokal E, Zorn B. High HPV infection prevalence in men from infertile couples and lack of relationship between seminal HPV infection and sperm quality. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 956901.
49. Kocjan BJ, Gale N, Hočevnar-Boltežar I, Seme K, Fujs Komloš K, Hošnjak L, et al. Identical human papillomavirus (HPV) genomic variants persist in recurrent respiratory papillomatosis for up to 22 years. *J Infect Dis.* 2013; 207 (4): 583–7.
50. Hočevnar-Boltežar I, Matičič M, Šereg-Bahar, Gale N, Poljak M, Kocjan BJ, et al. Human papilloma virus vaccination in patients with an aggressive course of recurrent respiratory papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014; 271 (12): 3255–62.
51. Boltežar IH, Bahar MS, Žargi M, Gale N, Matičič M, Poljak M. Adjuvant therapy of laryngeal papillomatosis. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 175–80.
52. But-Hadzic J, Jenko K, Poljak M, Kocjan BJ, Gale N, Strojjan P. Sinonasal inverted papilloma associated with squamous cell carcinoma. *Radiol Oncol.* 2011; 45 (4): 267–72.
53. Gale N, Zidar N, Poljak M, Cardesa A. Current views and perspectives on classification of squamous intraepithelial lesions of the head and neck. *Head Neck Pathol.* 2014; 8 (1): 16–23.
54. Strojjan P, Kuhar CG, Žumer B, Kadivec M, Karner K, Fajdiga I, et al. TPF induction chemotherapy and concomitant irradiation with cisplatin and cetuximab in unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2014; 36 (11): 1555–61.
55. Odar K, Kocjan BJ, Hošnjak L, Gale N, Poljak M, Zidar N. Verrucous carcinoma of the head and neck - not a human papillomavirus-related tumour? *J Cell Mol Med.* 2014; 18 (4): 635–45.
56. Poljak M, Kocjan BJ, Hošnjak L. Role of human papillomaviruses in esophageal carcinoma: an updated systematic review from 1982 to 2013. *Future Virol.* 2014; 9 (1): 69–86.
57. Strojjan P, Zadnik V, Šifrer R, Lanišnik B, Didanović V, Jereb S, et al. Incidence trends in head and neck squamous cell carcinoma in Slovenia, 1983-2009: role of human papillomavirus infection. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* V tisku 2014.
58. Mlakar J, Kocjan BJ, Hošnjak L, Pižem J, Beltram M, Gale N, et al. Morphological characteristics of conjunctival squamous papillomas in relation to human papillomavirus infection. *Br J Ophthalmol.* 2015; 99 (3): 431–6.
59. Mlakar B, Kocjan BJ, Hošnjak L, Fujs Komloš K, Milošević M, Poljak M. Betapapillomaviruses in the anal canal of HIV positive and HIV negative men who have sex with men. *J Clin Virol.* 2014; 61 (2): 237–41.
60. Komloš KF, Kocjan BJ, Šterbenc A, Jelen MM, Seme K, Košorok P, et al. Genomic distribution of beta papillomaviruses in single eyebrow hair samples and pools of eyebrow hair samples. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011; 20 (3): 155–60.
61. Tlučková K, Marušič M, Tóthová P, Bauer L, Šket P, Plavec J, et al. Human papillomavirus G-quadruplexes. *Biochemistry.* 2013; 52 (41): 7207–16.
62. Broniarczyk J, Bergant M, Goździcka-Józefiak A, Banks L. Human papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery. *Virology.* 2014; 460-461: 83–90.
63. Pim D, Broniarczyk J, Bergant M, Playford MP, Banks L. A Novel PDZ Domain Interaction Mediates the Binding between Human Papillomavirus 16 L2 and Sorting Nexin 27 and Modulates Virion Trafficking. *J Virol.* 2015; 89 (20): 10145–55.
64. Broniarczyk J, Massimi P, Bergant M, Banks L. Human Papillomavirus Infectious Entry and Trafficking Is a Rapid Process. *J Virol.* 2015; 89 (17): 8727–32.