

# Humani papiloma virus i karcinom cerviksa: mehanizmi karcinogeneze, epidemiologija, dijagnostika i profilaksa

## Human papillomavirus and cervical cancer: mechanisms of carcinogenesis, epidemiology, diagnostics and prophylaxis

Ita Hadžisejdić<sup>1</sup>, Magdalena Grce<sup>2</sup>, Blaženka Grahovac<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zavod za patologiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

<sup>2</sup>Zavod za molekularnu medicinu,  
Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Primljeno: 19. 2. 2010.

Prihvaćeno: 23. 4. 2010.

Adresa za dopisivanje:

\*Prof. dr. sc. Blaženka Grahovac

Zavod za patologiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,  
Braće Branchetta 20,  
51 000 Rijeka  
e-mail: [blazenka.grahovac@medri.hr](mailto:blazenka.grahovac@medri.hr)

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

**Sažetak.** Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) najčešća je spolno prenosiva bolest i pretpostavlja se da genitalnu infekciju ovim virusom tijekom života stekne 75 – 80 % spolno aktivnih žena i muškaraca. Od ranih osamdesetih kada je Harald zur Hausen (dobitnik Nobelove nagrade za fiziologiju ili medicinu 2008. godine) dokazao humani papiloma virus (HPV) genotipa 16 i 18 u karcinomu cerviksa, u velikom broju studija potvrđeno je i znanstvenim činjenicama dokazano da je infekcija HPV-om ključni čimbenik u razvoju karcinoma cerviksa. Maligne promjene cerviksa nastaju ako su ispunjeni višestruki uvjeti koji su definirani virusnim značajkama, staničnim protuvirusnim mehanizmima i imunim odgovorom domaćina. Virusnu komponentu čine genotip virusa, perzistencija i intenzitet infekcije, a imunogenetička konstitucija pojedinca, stanično posredovani imuni odgovor i utjecaj vanjskih čimbenika kao što su lijekovi i bolesti, definiraju imunopatogenetski doprinos domaćina. Ključni proteini uključeni u nastanak karcinoma cerviksa su virusni onkogeni, E6 i E7, koji interferiraju s nizom staničnih procesa te dovode do nekontrolirane proliferacije i stanične immortalizacije, stoga je značaj molekularnih studija koje se bave problematikom HPV-a upravo u boljem razumijevanju patogeneze HPV-a te primjeni stečenih spoznaja u prevenciji virusne infekcije, razvoju profilaktičkog cjepiva i uvođenju molekularne dijagnostike kao standarda u procjeni rizika za žene izložene kroničnoj infekciji HPV-om.

**Ključne riječi:** HPV cjepivo, humani papiloma virusi, karcinogeneza, karcinom cerviksa, molekularna dijagnostika

**Abstract.** Human papillomavirus (HPV) infection is estimated to be the most common sexually transmitted disease and about 75-80% of sexually active men and women will be infected with HPV at some point in their lifetime. Since the early 1980s when Harald zur Hausen (winner of the Nobel Prize in 2008 for Physiology or Medicine) detected the HPV genotypes 16 and 18 in cervical cancer, a large number of studies have provided scientific evidence that HPV infection is a key factor in the development of cervical carcinoma. Malignant changes of the cervix occur if multiple conditions are met and they are defined by virus characteristics, antiviral mechanisms and by the cellular immune response of the host. Viral components important in carcinogenesis are viral genotype, intensity and persistence of the infection, while immunogenetic constitution of the individual, cell mediated immune responses and influence of the external factors such as drugs and diseases define immunopathogenetic contribution of the host. Key proteins involved in the development of cervical cancer are viral oncogenes, E6 and E7, which interfere with a variety of cellular processes and lead to uncontrolled cell proliferation and immortalisation. Therefore, the importance of molecular studies dealing with HPV lies in the fact that they enable us to better understand the HPV pathogenesis and facilitate application of the acquired knowledge in the prevention of HPV infections, development of prophylactic vaccines and introduction of molecular diagnostics as a standard in the risk assessment for women exposed to the chronic HPV infection.

**Keywords:** carcinogenesis, cervical cancer, HPV vaccine, Human papillomavirus, molecular diagnostics

## UVOD

Danas je opće prihvaćeno da je infekcija humanim papiloma virusom (HPV) spolno prenosiva bolest, a ujedno i etiopatogenetski čimbenik karcinoma cerviksa (raka vrata maternice)<sup>1</sup>. Porodica HPV-a sadrži više od 130 genotipova (tipova) virusa, od kojih je za oko 80 u potpunosti poznat slijed nukleotida. Oko 40 tipova HPV-a zarazit će anogenitalnu sluznicu. Najnovije studije pokazale su da se u više od 99,7 % pločastih karcinoma cerviksa može dokazati HPV DNA<sup>2</sup>. HPV pripada porodici Papillomaviridae. To je mali DNA virus, promjera oko 50 nm, sastoji se od dvolančane, kružne DNA (episoma), dužine oko 8.000 parova baza, kodirajući samo 8 do 9 gena i u potpunosti je ovisan o mehanizmima replikacije stanice domaćina<sup>3</sup> (slika 2). Na temelju slijeda nukleotida, HPV se dijeli u genotipove i varijante. Ako se pojedini izolat HPV razlikuje za više od 10 % u L1 regiji, svrstava se u zaseban genotip, a ako se razlikuju za 2 do 10 %, svrstava se u varijantu istog genotipa. Do danas je izolirano više od 130 HPV genotipova, od kojih je za oko 80 u potpunosti poznat slijed nukleotida. Prema tipu lezija koje uzrokuju, HPV-i se dijele u tipove visokog rizika (engl. *High Risk*; HR) s karcinogenim potencijalom i tipove niskog rizika (engl. *Low Risk*; LR) koji uzrokuju dobroćudne genitalne bradavice. U više od 90 % HPV pozitivnih karcinoma cerviksa dokazano je 5 HPV genotipova: HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 i HPV 45, što ih svrstava u visokorizične genotipove. Ostali tipovi kao što su HPV 35, 52, 56, 59, 68 i 72, koji se nalaze u karcinomu cerviksa sporadično, također se ubrajaju u HPV visokog rizika, ali epidemiološki ne predstavljaju značajan čimbenik<sup>4,5</sup>.

Genom virusa sastoji se od tri skupine gena: geni kontrolne regije (engl. *Long Controlling Region*; LCR), strukturni, kasni geni L1 i L2 (engl. *Late*; L) koji kodiraju proteinsku ovojniciu oko virusnog genoma i regulatorni, rani geni (engl. *Early*; E) koji kodiraju proteine uključene u kontrolu replikacije virusa, ekspresije gena i interakcije sa staničnim proteinima domaćina. Dva rana proteina, E6 i E7, su virusni onkogeni uključeni u niz staničnih procesa, među kojima su najznačajniji održavanje stanične proliferacije i immortalizacije, ključni koraci u karcinogenezi cerviksa<sup>6</sup>.



**Slika 1.** Harald zur Hausen (1936.)  
*Professor emeritus German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*

Nobelova skupština na Karolinska institutu (*The Nobel Assembly at Karolinska Institut*), 6. listopada 2008. godine.

**Harald zur Hausen** dobitnik je Nobelove nagrade za fiziologiju ili medicinu 2008. godine za otkriće “da je humani papiloma virus uzročnik karcinoma cerviksa”.

“Harald zur Hausen išao je protiv ustaljenih dogmi tijekom sedamdesetih godina prošlog stoljeća i tvrdio da humani papiloma virus uzrokuje karcinom cerviksa, u svijetu drugi najčešći karcinom u žena. On je pretpostavio i dokazao da je HPV-DNA ugrađena u genom tumorske stanice, te se može dokazati specifičnim metodama detekcije virusne DNA. Također je utvrdio da je HPV heterogena virusna porodica, a samo neki od HPV genotipova mogu uzrokovati tumor. Njegova otkrića omogućila su razumijevanje prirodnog tijeka HPV infekcije, molekularnih mehanizama HPV-om posredovane karcinogeneze i razvoj profilaktičkog cjepiva protiv HPV infekcije.”

(Tekst prenesen iz objave Nobelove skupštine)

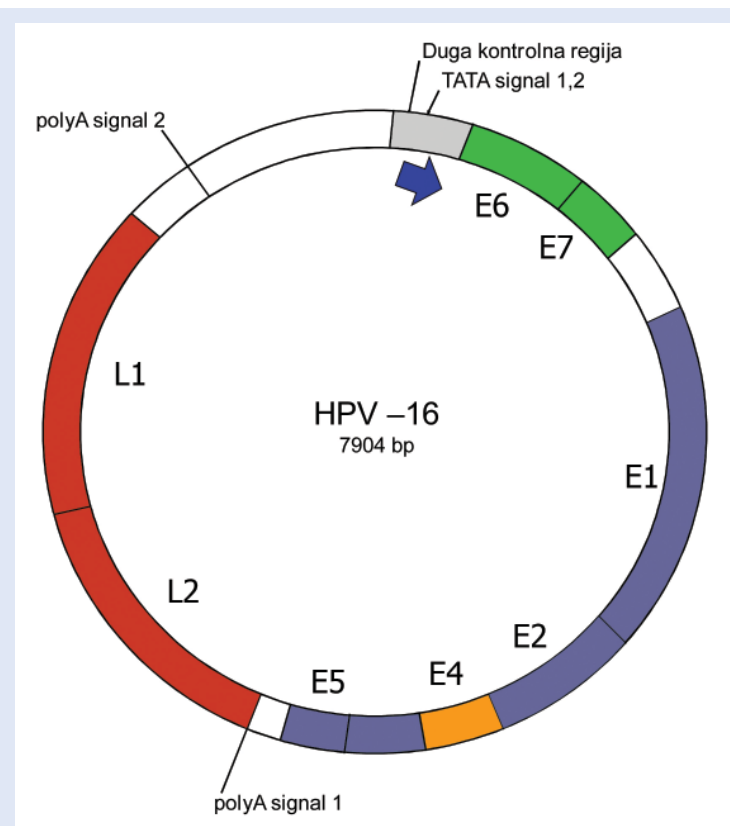
## ŽIVOTNI CIKLUS HUMANOG PAPILOMA VIRUSA

HPV se prilagodio životnom ciklusu epitelnih stanica, dinamici diferencijacije i obnavljanja staničnih populacija, inficirajući bazalne epitelne stanice. Infekcija se najčešće zbiva putem mikrotraume epitela, a dijelom i putem do sada neidentificiranih receptora, među kojima je prepoznat alfa-6 integrin za HPV 16<sup>7</sup>. Jednom u bazalnim stanicama, HPV genom biva prenesen u jezgru mehanizmima koji nisu poznati. Unutar jezgre HPV genom je smješten ekstrakromosomski, u formi episoma. Koristeći re-

plikacijske mehanizme stanice domaćina, broj genomskih kopija se povećava na oko 50 do 100, replikirajući se jednom po staničnoj diobi. Za vrijeme dok se zadržava u bazalnom sloju, HPV održava produkciju proteina na minimumu. Uglavnom se ispoljavaju onkoproteini E6 i E7, uz zanemarivu količinu drugih ranih gena. Pomoću proteina E6 i E7 modificira se stanični okoliš s ciljem da pogoduje daljnjoj replikaciji virusa tijekom diferenciranja inficirane stanice u keratinocite. Rani protein E5 povisuje razinu mitogenih čimbenika povećavajući proliferaciju bazalnih stanica čime se odgađa stanična diferencijacija. Svrha je ovog procesa povećanje broja inficiranih stanica<sup>3,3</sup>. Kada je infekcija sigurno uspostavljena, HPV se širi na površinu epitela gdje se formiraju virioni i otpuštaju u okolinu. Ova zbivanja potaknuta su ispoljavanjem proteina E1 i E2. Protein E2 smanjuje ispoljavanje onkogenih proteina E6 i E7, što zaustavlja proliferaciju stanica domaćina, omogućava njihovu diferencijaciju u keratinocite i premještanje u suprabazalne epitelne slojeve. Budući da je ispoljavanje E6 i E7 proteina reducirano, E1 se veže na dugu kontrolnu regiju (LCR) i pobuđuje DNA replikacijske mehanizme u stanici domaćina koji replikiraju HPV genom. Kada inficirani keratinociti dosegnu gornje slojeve epitela, HPV počinje ispoljavati proteine E4, L1 i L2 koji su potrebni za formiranje viriona. Virusne čestice proizvode se u tisućama kopija i šire neposrednim kontaktom epitela i sluznica na novog domaćina<sup>8</sup>.

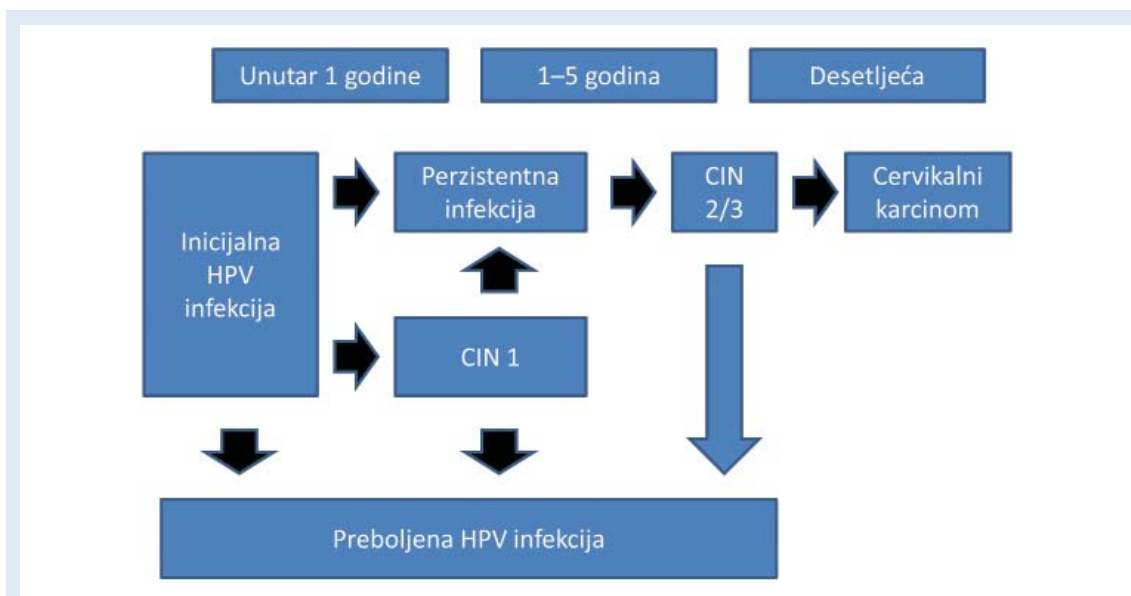
## MOLEKULARNE OSNOVE HPV INDUCIRANE KARCINOGENEZE

HPV tipovi visokog rizika (HR-HPV) snažno potiču staničnu proliferaciju i imaju sposobnost imortalizacije humanih stanica, čine ih neosjetljivim na mehanizme ograničenja životnog vijeka. Najznačajniji mehanizmi indukcije karcinogeneze su interakcija virusnih onkogenih proteina E6 i E7 s tumor supresorskim proteinima p53 i pRB (protein retinoblastoma). Protein E6 HR-HPV-a stvara kompleks sa p53 proteinom i posreduje u njegovoj razgradnji u proteolitičkom ubikvitinskom ciklusu. Protein p53 je središnji kontrolor procesa staničnog rasta i diobe. Ispoljavanje p53 aktiviraju procesi stresni za stanice, kao što su oštećenje DNA, hipoksija, niska razina ribonukleozid trifosfata. Povećana ekspresija p53 proteina u stanici dovodi



**Slika 2.** Organizacija genoma humanog papiloma virusa (HPV); genom HPV-a je kružna dvolančana DNA, dužine oko 8.000 parova baza; genska mapa sadrži 6 ranih (*Early*) gena, E1 do E7 – regulatorni geni izraženi u različitim fazama diferencijacije epitelnih stanica, 2 kasna (*Late*) gena, L1 i L2 – strukturni geni, koji su izraženi u stanicama gornjeg epitela, u kojima se replicira virusna DNA i LCR (*Long Controlling Region*) – duga kontrolna regija

**Figure 2.** Genome organization of human papillomaviruses (HPV); the HPV genome is a circular double-stranded DNA of 8000 base pairs; the gene map contains 6 early genes, E1 to E7 – regulatory genes expressed in different stages of differentiation of the epithelial cells, 2 late genes, L1 and L2 – structural genes that are expressed in upper layer of epithelial cells, in which viral DNA replicate, and the long controlling region (LCR)



**Slika 3.** Prirodni tijek infekcije humanim papiloma virusom (HPV); CIN (engl. *Cervical intraepithelial neoplasia*) – cervikalna intraepitelna neoplazija

**Figure 3.** Natural course of human papilloma virus (HPV) infection; CIN – Cervical intraepithelial neoplasia

do dva glavna događanja: zaustavljanje staničnog rasta u G1-fazi staničnog ciklusa (kontrolna točka za popravak DNA) i indukciju programirane stanične smrti (apoptoze). Smanjena ekspresija proteina p53 čini stanicu neosjetljivom na DNA oštećenja i omogućava takvim stanicama izbjegavanje apoptoze. U velikom broju tumora p53 se nalazi u mutiranom obliku što ukazuje da promjene u ekspresiji i gubitak funkcije p53 omogućuju replikaciju oštećene DNA, uzrokuju gensku nestabilnost i ispoljavanje neoplastičnog fenotipa stanica.

Protein E7 HPV-a visokog rizika čini komplekse s pRB i u tom obliku ometa put djelovanja ovog proteina. Gen RB je član genske porodice koja uključuje P107 i P130. Zajedničko djelovanje proteina ove genske porodice očituje se u supresiji gena koji reguliraju progresiju staničnog ciklusa, staničnu diferencijaciju i apoptozu. Proteini RB porodice su u interakciji s transkripcijskim čimbenikom E2F koji ima ključnu ulogu u aktivaciji gena potrebnih u replikaciji DNA i stimuliranju ulaza stanice u S-fazu staničnog ciklusa (sinteza DNA). Vežući se na promotore koji imaju afinitet za E2F, RB blokira ekspresiju gena. Kada je RB inaktiviran, na primjer kada čini kompleks s proteinom E7, stanice su sklonije ulasku i zaostajanju u S-fazi, što stimulira replikaciju DNA, a posredno i proli-

feraciju stanica<sup>9</sup>. Pogađajući glavni protutumorski put, E6 i E7 stvaraju nove stanične fenotipove sklone akumulaciji mutacija, otporne na protuproliferacijske signale i sigurnosne stanične mehanizme koji u normalnim uvjetima čuvaju staničnu diobu u precizno određenom redu<sup>1,6</sup>.

Neće sve žene inficirane HPV tipovima visokog rizika razviti karcinom cerviksa, nego će se to desiti u oko 1 % zaraženih. Očigledno su potrebni i drugi mehanizmi da bi se u potpunosti razvio zloćudni fenotip (slika 3). Brojne epidemiološke i znanstvene studije pokazale su da ti procesi uključuju virusnu perzistenciju i intenzitet virusne infekcije, destabilizaciju genoma stanice domaćina, imunološke značajke domaćina, druge bolesti, te utjecaj rizičnog ponašanja i okoline kao općih čimbenika rizika<sup>1,4</sup>.

Molekularne analize HPV pozitivnih karcinoma (infekcija s HPV visokog rizika) i benignih genitalnih bradavica (HPV niskog rizika) pokazale su razlike koje potječu od transformirajućih sposobnosti ovih skupina virusa. U benignim bradavicama i preneoplastičnim lezijama HPV genom održava se u episomalnoj formi, dok se u karcinomima virusne DNA nalazi uglavnom ugrađen u stanični genom domaćina. Ovi nalazi pokazuju da je za zloćudnu transformaciju važna ugradnja virusne

DNA pri čemu značajnu ulogu imaju HPV tipovi visokog rizika. Integracija u kromosome domaćina zbiva se slučajno (virusna DNA pronađena je na različitim kromosomima i regijama u različitim karcinomima), ali način integracije je klonalan, što znači da je mjesto integracije virusne DNA u svim stanicama istog tumora identično. To dokazuje da integracija virusne DNA nije slučajni događaj, nego jedan od osnovnih pokretača zloćudne transformacije stanice. Molekularne analize HPV pozitivnih karcinoma pokazale su da je virusni ge-

Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) ključni je čimbenik u razvoju karcinoma cerviksa. Mehanizmi karcinogeneze su interakcija virusnih onkoproteina, E6 i E7, s tumor supresorskim proteinima p53 i pRB. E6 i E7 podržavaju nekontroliranu proliferaciju i sprječavaju apoptozu inficiranih stanica. Spoznaje o molekularnoj patogenezi HPV-a našle su primjenu u razvoju profilaktičkog cjepiva i molekularne dijagnostike kao standarda u dijagnostici infekcije HPV-om.

nom uvijek prekinut na istom mjestu – između E1 i E2 gena. S obzirom na to da je regija E2 gena odgovorna za represiju transkripcije onkogeno E6 i E7, prekidanje regije dovodi do gubitka funkcije E2 gena i nekontrolirane ekspresije E6 i E7 proteina u mitotski aktivnim stanicama domaćina koje dobivaju selektivnu prednost u preživljavanju i podržavaju virusnu integraciju kao uzročni mehanizam karcinogeneze<sup>8</sup>.

#### HPV I IMUNOLOŠKI ODGOVOR

Imunološki odgovor može se podijeliti na specifični (stečeni) i nespecifični (prirođeni). Prirođeni imunitet osigurava prvi i brzi odgovor na pojavu infekcije, a osiguravaju ga postojeći mehanizmi imunološke zaštite. Osnovne komponente prirođenog imuniteta su prirodne zapreke poput epitelnog tkiva, fagocita, proteina komplementa, koagulacijskog sustava i citokina. Stečeni imunitet sastoji se od humoralnog i stanično posredovanog imuniteta. Ukratko, B stanice stvaranjem protutijela posreduju humoralni imunitet, a T stanice su odgovorne za stanično posredovani imunitet<sup>6</sup>. Sustav tkivne podudarnosti (engl. *Human Leukocyte Antigen*; HLA) ima glavnu ulogu u os-

postavljanju imunog odgovora na infekciju. Geni HLA razreda I i II kodiraju proteine-receptore, odgovorne za predstavljanje stranih peptida T staničnim receptorima u procesu imunološkog prepoznavanja. Receptori HLA razreda I nalaze se na stanicama s jezgrom i predstavljaju unutarstanične peptide CD8+T stanicama, dok se receptori HLA razreda II nalaze na specijaliziranim stanicama imunološkog sustava, antigen prezentirajućim stanicama (engl. *Antigen Presenting Cells*; APC), makrofagima, dendritičnim stanicama i Langerhansovim stanicama. Ove stanice fagocitiraju proteine, razgrađuju ih do peptida i predstavljaju CD4+T stanicama putem molekula HLA razreda II. I prirođeni i stečeni imunološki odgovor općenito se uspostavljaju kao odgovor na virusnu infekciju. Spolno prenosivi virusi poput anogenitalnih HPV-a, da bi se širili i napredovali, trebaju ostati u domaćinu tako dugo dok, tijekom spolnog kontakta, ne inficiraju novog domaćina. U cilju opstajanja, HPV je razvio strategiju izbjegavanja imunološkog sustava koja se očituje u dva osnovna principa: 1.) cijeli životni ciklus HPV provodi u epitelu te na taj način nije izložen imunološkim nadzornim stanicama u cirkulaciji i izbjegava humoralni imunološki odgovor; 2.) niski stupanj stimulacije imunološkog sustava održava se niskom razinom sinteze virusnih proteina. Dok boravi u donjim slojevima epitela, HPV ograničava ispoljavanje gena koji kodiraju rane proteine E1, E2, E5, E6 i E7. Ovi proteini uglavnom su smješteni u jezgri i na taj način zaštićeni od nadzora antigen prezentirajućih stanica. Dokazano je da E7 smanjuje stvaranje interferona  $\alpha$  i  $\beta$ , što ima za posljedicu smanjenje ispoljavanja molekula HLA razreda I. Smatra se također da protein E5 ometa sazrijevanje molekula HLA razreda II djelujući na procese razgradnje proteina u peptide i njihovo vezanje s HLA molekulom. Budući da se HPV uklanja lizom stanica u donjim slojevima epitela, kontakt između HPV proteina i antigen prezentirajućih stanica uglavnom je ograničen na fagocitozu umirućih keratinocita<sup>10</sup>.

#### EPIDEMIOLOŠKI PODACI VEZANI UZ HPV INFEKCIJU

Infekcija HPV-om najčešća je spolno prenosiva bolest i pretpostavlja se da genitalnu infekciju

ovim virusom tijekom života stekne 75 – 80 % spolno aktivnih žena i muškaraca<sup>11,12</sup>. Podaci za SAD ukazuju da više od 80 % žena do 50. godine života dođe u kontakt i zarazi se barem jednim HPV tipom<sup>13</sup>. Čimbenici rizika povezani s HPV infekcijom usko su povezani sa seksualnim ponašanjem te su rano stupanje u spolne odnose, velik broj spolnih partnera i visoko rizični spolni partner najvažniji čimbenici u prijenosu virusa. Obrezivanje (cirkumcizija) muškaraca i upotreba barijernih sredstva zaštite (kondoma, femidona) mogu umanjiti rizik od nastanka infekcije, ali ne pružaju potpunu zaštitu od infekcije HPV-om. Postoje različiti genotipovi HPV-a koji pokazuju tropizam prema koži, a drugi prema sluznicama. Tako su HPV genotipovi 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 i 65 češće identificirani u kožnim lezijama (bradavice na ruci, plantarne bradavice, epitelni tumori kože itd.) dok se HPV genotipovi 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 44, 45, 55, 52 i 58 češće nalaze u lezijama anogenitalne regije<sup>14</sup>. Najrizičnija mjesta za nastanak neoplastičnih promjena uzrokovanih HPV-om su transformacijska zona cerviksa i pektinealna linija analnog kanala.

U svijetu se godišnje otkrije više od pola milijuna novih slučajeva karcinoma cerviksa. Ovaj se karcinom nalazi na drugom mjestu po učestalosti u zemljama u razvoju, dok je na sedmom mjestu u razvijenim zemljama<sup>15</sup>. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2007. godinu, karcinom cerviksa nalazi se na 8. mjestu po učestalosti s 387 novooboljelih žena (stopa 16,8/100.000 žena godišnje)<sup>16</sup>. Najveći broj novo-

oboljelih žena u Hrvatskoj je u dobi od 35 do 59 godina života, a stopa pojavnosti karcinoma cerviksa je u padu od 1970-ih godina, premda se od prošlog desetljeća ne bilježi daljnji pad<sup>16</sup>.

Najnoviji epidemiološki podaci dobiveni globalnom metastudijom Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), pokazali su da prevalencija HPV-a kod žena s normalnom citologijom u bilo kojem trenutku života iznosi 10.4 %<sup>12,17</sup>. HPV prevalencija veća je u manje razvijenim dijelovima svijeta (31.6 % istočna Afrika), dok je najniža u jugoistočnoj Aziji (6.2 %)<sup>12</sup>. Prema podacima studija, prevalencija subkliničke HPV infekcije može biti čak i do 40 % u dobnoj skupini od 18 do 30 godina, dok nakon 30. godine života prevalencija pada na 5 – 10 %<sup>18,19</sup>. Pad u prevalenciji HPV infekcije genitalne regije s porastom životne dobi vjerojatno je posljedica razvoja specifičnog imuniteta. U Hrvatskoj, prema podacima studije Grahovac i sur., prevalencija visoko rizične HPV infekcije u skupini žena u dobi od 21 do 37 godina s normalnim citološkim nalazom iznosi 35.6 %<sup>20</sup>. HPV 16 je visoko rizični HPV genotip koji se najčešće nalazi u normalnim citološkim brisovima, displastičnim promjenama epitela cerviksa i invazivnom karcinomu cerviksa (tablica 1)<sup>19,21</sup>. Činjenica da se HPV 16 nalazi u više od polovice (~55%) invazivnog karcinoma cerviksa upućuje na određenu biološku prednost ovog genotipa pri transmisiji i perzistenciji infekcije te transformiranju stanica. Po zastupljenosti u invazivnom karcinomu genotip HPV 16 slijede HPV 18 i HPV 45, dok je kod adenokarcinoma cerviksa HPV 18 predominirajući geno-

**Tablica 1.** Prevalencija HPV genotipova u različitim citološkim i patohistološkim entitetima (prema podacima Bosch i sur., 2008.<sup>12</sup>)

**Table 1.** The prevalence of HPV genotypes in various cytological and pathohistological entities (from Bosch et al., 2008<sup>12</sup>)

	Normalna citologija	HSIL	SCC	ADC
HPV 16	2,6 %	45,3 %	55,2 %	48,4 %
HPV 18	0,9 %	6,9 %	12,8 %	36,3 %
HPV 31	0,6 %	8,6 %	3,8 %	0,7 %
HPV 45	0,4 %	2,3 %	4,6 %	5,8 %
HPV 33	0,5 %	7,3 %	3,7 %	2,0 %
HPV 52	0,9 %	5,1 %	2,9 %	0,0 %
HPV 58	0,9 %	7,0 %	2,8 %	0,7 %
Ostali HPV genotipovi	6,8 %	23,9 %	7,6 %	7,7 %

HSIL (*High Squamous Intraepithelial Lesions*), pločaste intaeptelne lezije visokog stupnja; SCC (*Squamous Cervical Cancer*), pločasti karcinom cerviksa; ADC (*Adenocarcinoma of cervix*), adenokarcinoma cerviksa

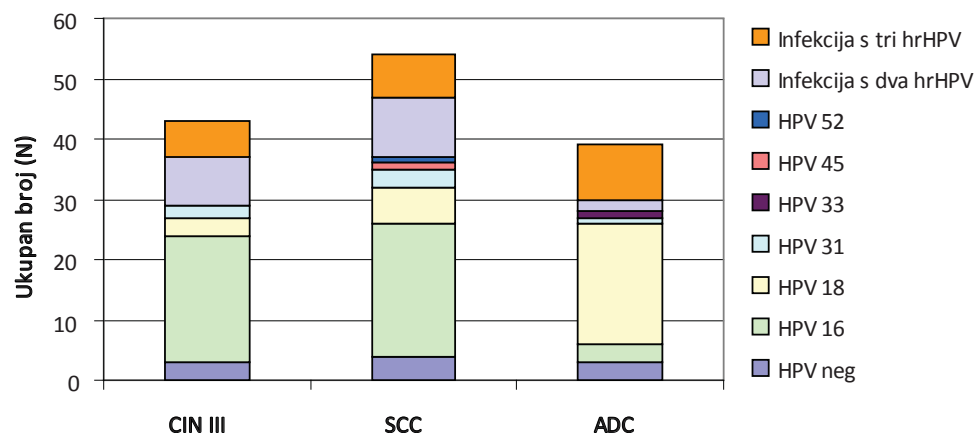
tip<sup>22</sup>. Prema podacima dobivenim iz arhivskog materijala tkiva invazivnog karcinoma cerviksa uklopljenog u parafin, slični nalazi su i u malignim promjenama bolesnica u Hrvatskoj, budući da je HPV 16 utvrđen kao predominirajući genotip u pločastom karcinomu cerviksa, a HPV 18 u adenokarcinomima cerviksa<sup>23,24</sup> (slika 4). I studija Grce i sur. provedena na patološki izmijenjenim staničnim brisovima ukazuje da je prevalencija HPV infekcije u Hrvatskoj visoka (85.3 %) i da je upravo infekcija HPV 16, genotipom visokog rizika najučestalija (35.5 %) <sup>25,26</sup>.

#### DIJAGNOSTIKA – DOKAZIVANJE HPV INFEKCIJE

##### CITOLOŠKA DIJAGNOSTIKA – PAPA TEST

Dokazivanje HPV infekcije zasniva se na pregledu vidljivih lezija, mikroskopskoj evaluaciji staničnih promjena iz brisa cerviksa – Papa test (citološka analiza), te detekciji HPV DNA iz staničnog materijala (molekularna analiza). Standardna procedura probira za karcinom cerviksa je citološki razmaz, Papa test, no u slučaju nejasnih te displastičnih promjena niskog stupnja, dokazivanje HPV DNA pomaže u postavljanju točnije dijagnoze i omogu-

ćava odabir tipa i intenziteta terapije za bolesnice. Papa test predstavlja efektivnu strategiju za smanjenje rizika od nastanka invazivnog karcinoma cerviksa. Otkako je ovaj test razvijen i primijenjen u sklopu organiziranog programa probira, došlo je do više od 80 % smanjenja smrtnosti od karcinoma cerviksa u posljednjih 50 godina, čime je Papa test postao jedan od najučinkovitijih testova probira u povijesti medicine<sup>27,28</sup>. Pomoću ovog relativno jeftinog testa stanice epitela cerviksa razmazuje se na predmetno stakalce te se nakon bojenja po Papanicolaou mikroskopski evaluiraju. Osjetljivost Papa testa je oko 50 – 70 %, te se ovom metodom može prepoznati do 70 % staničnih promjena uzrokovanih HPV-om. Neke studije upućuju na to da je osjetljivija analiza Papa test temeljen na tekućinskoj citologiji (engl. LBC, *Liquid Based Cytology*) u kojoj se stanice brisa cerviksa ne nanose direktno na staklo nego se prethodno fiksiraju u metanolu. Uređaj za LBC automatski priprema razmazu za citološku analizu, čime se postiže standardizacija pripreme uzorka i povećava se broj stanica po razmazu, što povećava razinu osjetljivosti detekcije promjena na stanicama cerviksa uzrokovanih HPV-om na 85 – 95 %<sup>29</sup>. Prednost LBC-a u odnosu na klasični Papa test jest u tome što jednom uzet uzo-



**Slika 4.** Distribucija HPV genotipova u različitim patohistološkim entitetima (prema podacima Hadžisejdić, I. i sur. Coll Antropol 2006; 30(4):879-883).

hrHPV (*high risk HPV genotype*) – visokorizični HPV genotip; CIN (*Cervical intraepithelial neoplasia*) – cervikalna intraepitelna neoplazija; SCC (*Squamous Cervical Cancer*), pločasti karcinom cerviksa; ADC (*Adenocarcinoma of cervix*), adenokarcinoma cerviksa

**Figure 4.** Distribution of the high risk HPV genotypes (hrHPV) in different histopathological entities (according to Hadžisejdić I et al Coll Antropol 2006; 30(4):879-883).

hrHPV – high risk HPV genotype; CIN – *Cervical intraepithelial neoplasia*; SCC – *Squamous cervical cancer*; ADC – *Adenocarcinoma of cervix*

rak ostaje stabilan do 6 mjeseci, te se iz istog uzorka može napraviti više razmaza za detaljniju analizu, a također se iz njega mogu raditi daljnje imunohistokemijske analize te molekularne pretrage dokazivanja i genotipizacije HPV-a<sup>29</sup>.

Patognomonični nalaz staničnih promjena koje ukazuju na promjene uzrokovane HPV-om jesu koilociti. Koilociti su tipične displastične pločaste stanice koje imaju sljedeće karakteristike: povećanu jezgru (2 – 3 puta veća od normalne jezgre), perinuklearni halo, hiperkromaziju i nepravilne konture jezgre. Prema preporukama Centra za kontrolu bolesti (engl. *Centre for Disease Control*; CDC) SAD-a svaka bi žena trebala otići na prvi Papa test ne kasnije od 3 godine nakon prvog spolnog kontakta i ne kasnije od 21. godine života<sup>30</sup>. Kako često će se provoditi Papa test nakon 30. godine života ovisi o rizičnim čimbenicima i rezultatima prethodnih Papa testova. Ako su rizični čimbenici zanemarivi i ako je nalaz prethodnih Papa testova bio uredan, većini žena se preporučuje ponovno Papa testiranje svake 2 – 3 godine do navršene 65. godine života<sup>30</sup>.

Glavni nedostatak Papa testa je niska osjetljivost koja se kreće od 50 – 70 %, čime se dijelom objašnjava uočena stagnacija smanjenja incidencije i mortaliteta od karcinoma cerviksa posljednjih godina. Citološki testovi nažalost otkrivaju samo stanične promjene koje su u stvari posljedica perzistentne infekcije i prekursori karcinoma cerviksa, a ne samog uzročnika bolesti, HPV-a. Studije pokazuju da HPV DNA testiranje ima veću osjetljivost (84 – 100 %) nego konvencionalni Papa test i to uz visoku negativnu prediktivnu vrijednost (~100 % NPV) omogućava manje učestalo ponavljanje Papa testa, te dulje vremenske intervale bez probira, a da se istovremeno ne ugrožava zdravlje i sigurnost bolesnice<sup>31,32</sup>. Stoga je sve ujednačeniji stav u svijetu da se uz citološku dijagnostiku, dokazivanje HPV DNA, treba uključiti u preventivu i dijagnostiku karcinoma cerviksa.

#### MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA HPV INFEKCIJE

Da bi se određeni test mogao koristiti u dijagnostičke svrhe, mora imati visoku specifičnost i osjetljivost. Trenutno se na tržištu nalazi nekoliko testova za dokazivanje HPV DNA i/ili genotipizaci-

ju i svi imaju ili FDA odobrenje ili europski CE (*Conformité Européenne*) certifikat za laboratorijsku upotrebu u dijagnostičke svrhe (IVD, *In Vitro Diagnostic*). Neki od testova za dokazivanje HPV DNA su Hybrid Capture 2 (Digene Corp, Gaithersburg, SAD), AmpliCor HPV test (Roche Molecular Systems, Basel, Švicarska), Linear Array HPV genotyping test (Roche) i PapilloCheck (Grainer Bio-One GmbH, Frickenhausen, Njemačka). Većina komercijalnih testova za dokazivanje HPV DNA bazira se na dvjema osnovnim molekularno biološkim metodama: 1) polimeraznoj lančanoj reakciji (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) i 2) hibridizaciji.

PCR metoda temelji se na umnožavanju dijela DNA molekule pomoću enzima DNA polimeraze, a ciljni dio molekule koji će se umnožavati određuje se izborom početnica (engl. *primer*) koji omeđuju umnoženi fragment. Izborom početnica osigurava se specifičnost testa, a osjetljivost se postiže cikličkim umnožavanjem istog fragmenta u prosjeku od 35 ciklusa. Najčešće se u molekularno dijagnostičke svrhe koriste početnice koje umnožavaju L1, E6 i E7 regiju virusne DNA. Također, određivanje prisutnosti specifične HPV DNA ili određivanje genotipa HPV virusa (s prethodnim PCR umnožavanjem ili bez njega, ovisno o metodi) može se vršiti nekom od hibridizacijskih metoda i to najčešće na trakicama obilježenim HPV oligonukleotidima.

*Hybrid Capture II* (HC II) test primarno je razvijen za rutinski probir i dokazivanje HPV DNA u brisu cerviksa, a sam test je 2003. godine dobio i licencu FDA-a. Princip ovog standardiziranog testa je da se pomoću citočerkice uzme stanični materijal iz cervikalnog kanala te se virusna DNA hibridizira s RNA probom. Nastali DNA:RNA hibrid veže se za specifično DNA:RNA protutijelo kojim su obložene jažice mikrotitar pločica (*hybrid capture*). DNA:RNA protutijelo obilježeno je alkalnom fosfatazom koja aktivira kemiluminiscentni supstrat čiji intenzitet se određuje pomoću luminometra i koji odgovara količini virusne DNA u uzorku. Na temelju korištenog koktela RNA proba utvrđuje se radi li se o HPV-u visokog ili niskog rizika. Ovaj test pokriva nisko rizične genotipove HPV-a 6, 11, 42, 43 i 44 te visoko rizične genotipove HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 i 56. Prednost ove meto-



de je u tome što se relativno lako izvodi te ne zahtijeva osoblje specijalizirano i educirano za molekularno-biološke metode. Glavni nedostaci su u tome što ima 100 do 1.000 puta nižu osjetljivost od metode PCR s početnicima MY09/MY11 ili GP5/GP6 koji teoretski mogu umnožiti sve genitalne HPV genotipove. HC II testom nije moguće određivanje HPV genotipova, njime se dobije samo odgovor radi li se o visoko ili nisko rizičnom genotipu HPV-a.

*Amplicor, Linear Array HPV genotyping test i PapilloCheck* komercijalni su testovi koji omogućavaju dokazivanje i genotipizaciju HPV virusa, a razlikuju se u broju i genotipu HPV virusa koji detektiraju. *Amplicor* test može detektirati 13 različitih HPV genotipova (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68), dok se *Linear Array HPV genotyping* testom može odrediti 37 HPV genotipova (HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, CP6108 i IS39). *PapilloCheck* je također kvalitativni test za dokazivanja i genotipizaciju 24 različita HPV genotipa (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 i 82). Sva tri testa zasnivaju se na specifičnom umnažanju ciljane regije HPV DNA pomoću PCR-a te potom hibridizacije, kojom se određuje genotip HPV-a, i sva tri pokazala su se jednako efikasnim i pouzdanim u dijagnostici<sup>33</sup>.

#### PRIMARNA PREVENCIJA KARCINOMA CERVIKSA PROFILAKTIČKIM CIJEPLJENJEM PROTIV HPV-a

Otkriće uzročno-posljedične veze između visokorizičnih (kancerogenih) tipova HPV-a i karcinoma cerviksa dovelo je do razvoja cjepiva protiv HPV-a, i to dvaju najčešćih, HPV tip 16 i 18, koji zajedno uzrokuju karcinom gotovo u 70 % slučajeva. Proizvodnja cjepiva protiv karcinoma cerviksa, koji je drugi po učestalosti u svijetu nakon karcinoma dojke i treći po redu po smrtnosti nakon raka pluća kod žena, iznimno je važan i velik korak u humanoj medicini<sup>15</sup>.

Komercijalno su dostupna dva cjepiva, Cervarix™, dvovalentno cjepivo tvrtke GlaxoSmithKline (GSK Biologicals, Rixensart, Belgija) i Gardasil®, četve-

rovalentno cjepivo tvrtke Merck & Co (Whitehouse Station, NJ USA) (tablica 2)<sup>34-36</sup>. Oba cjepiva su profilaktička, a namijenjena su prvenstveno sprječavanju najučestalije infekcije visokorizičnim tipovima HPV-a koji uzrokuju zloćudne promjene i karcinome anogenitalne regije, poglavito karcinoma cerviksa. Oba sadrže virusu slične čestice (engl. *Virus Like Particles*; VLP) sačinjene od L1 proteina omotača HPV 16 i HPV 18, s time da Gardasil® dodatno sadrži VLP-e HPV 6 i HPV 11, koji zajedno uzrokuju 90 % dobroćudnih genitalnih bradavica. VLP-i pokazuju morfološka i antigena svojstva identična nativnoj virusnoj čestici, s time da ne sadrže genomski materijal, pa time nisu zarazne. Oba cjepiva su se stoga pokazala vrlo sigurna i općenito se dobro podnose. Osim vrste i količine VLP-a u cjepivima, cjepiva sadrže različite adjuvane koji su namijenjeni za poticanje jačeg imunološkog odgovora (tablica 2). Najbolji imunološki odgovor (visoki i trajni titar protutijela) protiv HPV 16 i HPV 18 zabilježen je s cjepivom koje je sadržavalo adjuvans AS04 (Cervarix™) u usporedbi s istim antigenom čiji je adjuvans bio aluminijev hidroksid.

HPV cjepiva su najučinkovitija ako se primjenjuju kod djevojčica ili mladih žena prije izlaganja HPV infekciji, odnosno prije stupanja u nezaštićene spolne odnose. Oba cjepiva pokazuju visoku imunogenost (100 %) i efikasnost (> 90 %) protiv trajne infekcije onih HPV tipova koje sadrži cjepivo, te protiv teških cervikalnih lezija (CIN 2+ [cervikalna intraepitelna neoplazija stupnja 2 i više] i adenokarcinoma *in situ*) uzrokovane HPV tipovima 16 i 18 u žena koje su prije cijepjenja bile serološki i HPV DNA-negativne i pogotovo u onih koje su dobile sve tri doze cjepiva<sup>34</sup>. Ujedno je zabilježena visoka efikasnost (> 90 %) sprječavanja intraepitelne lezije vulve i rodnice četverovalentnim cjepivom (nije praćeno za bivalentno cijepivo) u žena koje su prije cijepjenja bile serološki i HPV DNA-negativne i koje su primile sve tri doze. Zaštita s oba cjepiva traje dugi niz godina nakon primanja prve doze (tablica 2).

Za oba cjepiva opažen je neočekivani rezultat višegodišnjih kliničkih istraživanja, a to je križna zaštita protiv trajne HPV infekcije i povezane bolesti protiv visokorizičnih tipova HPV-a koji nisu zastupljeni u cjepivu (HPV 31, 33, 45, 52 i 58) (tablica

**Tablica 2.** Karakteristike komercijalno dostupnih profilaktičkih cjepiva protiv HPV-a i povezanih oštećenja vrata maternice  
**Table 2.** Characteristics of commercially available prophylactic vaccines against HPV and related cervical lesions

Ime	Cervarix™ (GlaxoSmithKline)	Gardasil® (Merck & Co.)
Vrsta cjepiva	virusno slične čestice sačinjene od L1 proteina omotača <b>HPV 16 i 18</b> : 20 µg HPV 16 i 20 µg HPV 18	virusno slične čestice sačinjene od L1 proteina omotača <b>HPV 6, 11, 16 i 18</b> : 20 µg HPV 6, 40 µg HPV 11, 40 µg HPV 16 i 20 µg HPV 18
Adjuvans cjepiva	<b>ASO4</b> : 225 µg aluminijski hidroksid, 50 µg 3-deacilat monofosforil lipid A	<b>Aluminij</b> : 225 µg aluminijski hidroksifosfat sulfat
Tehnologija proizvodnje cjepiva	Bakulovirusni-ekspresijski sustav u kulturi stanica insekta <i>Tricholpusia</i>	Ekspresijski sustav u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Efikasnost zaštite protiv CIN 2+ uzrokovano HPV 16 i 18 u žena, neovisno o citologiji i HPV statusu prije cijepjenja, koje su primile najmanje 1 dozu	N = 16.120 <b>98 %</b> (96.1 % CI: 91-100 %) 35 mjeseci praćenja	N = 12.167 <b>44 %</b> (95 % CI: 26 – 58 %) 44 mjeseci praćenja
Efikasnost zaštite protiv CIN 2+ uzrokovano HPV 16 i 18 u žena koje su bile serološki i DNK HPV negativne prije cijepjenja i koje su primile sve 3 doze	N = 14.656 <b>98 %</b> (96.1 % CI: 88 – 100 %) 35 mjeseci praćenja	N = 11.728 <b>95 %</b> (95 % CI: 85 – 99 %) 36 mjeseci praćenja
Duljina zaštite protiv CIN 1-3 uzrokovano HPV 16 i 18 u žena koje su bile serološki i DNK HPV negativne prije cijepjenja i koje su primile sve 3 doze	N = 951 <b>100 %</b> (95 % CI: 73 – 100 %) <b>6,4 godina</b>	N = 241 <b>100 %</b> (95 % CI: 31 – 100 %) <b>5 godina</b>
Križna zaštita protiv HPV 31 (šestomjesečne trajne infekcije i CIN2+) u žena DNK negativnih na taj tip prije cijepjenja koje su primile sve 3 doze	6 – mj. trajne inf.: <b>79 %</b> (96.1 % CI: 70 – 85 %) CIN2+: <b>92 %</b> (96.1 % CI: 66 – 99 %)	6 – mj. trajne inf.: <b>46 %</b> (95 % CI: 15 – 66 %) CIN2+: <b>70 %</b> (95 % CI: 32 – 88 %)
Križna zaštita protiv HPV 33 u žena DNK negativnih na taj tip prije cijepjenja koje su primile sve 3 doze	6 – mj. trajne inf.: <b>46 %</b> (96.1 % CI: 25 – 61 %) CIN2+: 52 % (96.1 % CI: – 3 – 79 %); NZ	6 – mj. trajne inf.: <b>28 %</b> (95 % CI: – 45 – 66 %); NZ CIN2+: 24 % (95 % CI: – 71 – 67 %); NZ
Križna zaštita protiv HPV 45 u žena DNK negativnih na taj tip prije cijepjenja koje su primile sve 3 doze	6 – mj. trajne inf.: <b>76 %</b> (96.1 % CI: 60 – 86 %) CIN2+: 100 % (96.1 % CI: – 68 – 100 %); NZ	6 – mj. trajne inf.: <b>8 %</b> (95 % CI: – 67 – 49 %); NZ CIN2+: – 52 % (95 % CI: – 1718 – 83 %); NZ
Križna zaštita protiv HPV 31/33/45/52/58 u žena DNK negativnih na te tipove prije cijepjenja koje su primile sve 3 doze	6 – mj. trajne inf.: <b>30 %</b> (96.1 % CI: 22 – 38 %) CIN2+: <b>53 %</b> (96.1 % CI: 22 – 71 %)	6 – mj. trajne inf.: <b>25 %</b> (95 % CI: 5 – 41 %) CIN2+: 33 % (95 % CI: – 0,3 – 55 %); NZ

HPV, humani papiloma virus, CIN, cervikalna intraepitelna neoplazija, CI (*Confidence interval*), interval pouzdanosti; NZ, nije značajno

2), što dodatno povećava efikasnost cjepiva. Četverovalentno cjepivo (Gardasil®) daje najbolju (statistički značajnu) križnu zaštitu protiv HPV 31 (filogenetski blizak HPV 16), dok dvovalentno (Cervarix™) daje najbolju (statistički značajnu) križnu zaštitu protiv HPV 31, HPV 45 i zatim HPV 33. HPV 45 filogenetski je blizak HPV 18 i drugi po redu uzročnik adenokarcinoma cerviksa koji se teško rano otkriva citologijom, stoga ova križna zaštita ima iznimnu važnost u odabiru cjepiva za prevenciju karcinoma cerviksa.

Nedavno je objavljena prva studija koja izravno uspoređuje oba cjepiva u zdravih žena (N = 1.106) u dobi od 18 do 45 godina<sup>37</sup>. Sedam mjeseci nakon cijepjenja, titar neutralizirajućih protutijela bio je značajno veći ( $p < 0.0001$ ), 2,3 do 4,8 puta

za HPV 16, te 6,8 do 9,1 puta veći za HPV 18, nakon cijepjenja s Cervarixom™ u usporedbi s Gardasilom® u svim dobnim skupinama. Osim toga, titar neutralizirajućih protutijela za HPV 16 i 18 u cervikovaginalnom sekretu, te količina memorijskih B stanica za HPV 16 i 18 također su bili viši nakon cijepjenja s Cervarixom™ u usporedbi s Gardasilom®. Odgovor na pitanje koji je značaj imunološkog odgovora za zaštitu protiv HPV-povezanih bolesti dobit će se nakon daljnjeg praćenja cijepjenih žena iz ove studije.

Cijepjenje četverovalentnim cjepivom (Gardasil®) ima također visoku efikasnost sprječavanja infekcije niskorizičnih HPV tipova 6 i 11 i pridružene bolesti (genitalne bradavice). Dosadašnje preporuke nisu u prilog cijepjenja muškaraca, s obzi-

rom na to da su cjepiva prvenstveno namijenjena sprječavanju karcinoma cerviksa, a sva matematička modeliranja ukazuju na to da cijepljenje dječaka unutar programa imunizacije nije isplativo. Nedavno je, međutim, u svojoj izjavi prof. Harald zur Hausen istaknuo da bi se dječaci i muškarci također trebali cijepiti<sup>38</sup>. S obzirom na to da su HPV 6 i 11 vrlo prošireni u spolno aktivnih žena i muškaraca, četverovalentno cjepivo bilo bi idealno za cijepljenje muškaraca kod kojih genitalne bradavice predstavljaju značajan obol, dok bi bivalentno bilo primjerenije za žene. Osim toga, cijepljenje muškaraca može neizravno povećati zaštitu i protiv s HPV-om povezanih bolesti kod žena.

Trenutno ograničenje cijepljenja pojedinaca ili šireg stanovništva protiv HPV-a njegova je vrlo visoka cijena, stoga sekundarna prevencija (probir ili rano otkrivanje karcinoma cerviksa) ostaje prioritet nad primarnom prevencijom cijepljenjem, koliko god ona bila učinkovita i obećavajuća<sup>35</sup>.

#### ZAHVALA

Autori zahvaljuju Ivanu Dašeku, inženjeru laboratorijske dijagnostike, za pomoć u izradi slika br. 2 i 3. Rad je dio projekta Bilateralne znanstveno-istraživačke suradnje Hrvatska – Austrija 2008. – 2009. "Human Papillomavirus in Cervical Neoplasia: Are Methods Based on Detection of mRNA Superior to Those Based on Detection of DNA?" uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske i Saveznog ministarstva za znanost i istraživanja Republike Austrije.

#### LITERATURA

- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690-8.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. N Engl J Med* 2003;348:518-27.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
- Grahovac B, Šimat M, Krašević M. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa – imunopatogeneza i molekularna dijagnostika. *Medix* 2005;58:67-71.
- Yoon CS, Kim Park SN, Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:668-73.
- Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009;19:97-113.
- Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004;50:9-19.
- O'Brien PM, Campo MS. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? *Trends Microbiol* 2003;11:300-5.
- Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004;36:6-10.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjosé S, Bruni L et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10:K1-16.
- Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007;297:813-9.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2007. Bilten br. 32. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2007.
- Castellsague X, de Sanjosé S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Muñoz J et al. HPV and Cervical Cancer in the World. 2007 Report. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). *Vaccine* 2007; 25 (Suppl 3). Available at [www.who.int/hpvcentre/en](http://www.who.int/hpvcentre/en). Accessed March 8, 2010.
- Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
- de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:453-9.
- Grahovac M, Racić I, Hadžisejdić I, Dorić A, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus among Croatian women attending regular gynecological visit. *Coll Antropol* 2007;31 Suppl 2:73-7.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621-32.

22. Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:303-15.
23. Hadžisejdić I, Šimat M, Bosak A, Krašević M, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cervical cancer and precursor lesions. *Coll Antropol* 2006;30:879-83.
24. Hadžisejdić I, Krašević M, Haller H, Grahovac B. Distribution of human papillomavirustypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Coll Antropol* 2007;31 Suppl 2:97-102.
25. Grce M, Husnjak K, Bozиков J, Magdić L, Zlacki M, Lukac J et al. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* 2001;21:579-84.
26. Milutin Gasperov N, Sabol I, Matovina M, Spaventi S, Grce M. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathol Oncol Res* 2008;14:355-63.
27. Sasieni PD, Cuzick J, Lynch-Farmery E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer* 1996;73:1001-5.
28. Grce M, Davies P. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:599-605.
29. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ* 2007;335:28.
30. CDC. Available at [http://www.cdc.gov/cancer/cervical/basic\\_info/screening.htm](http://www.cdc.gov/cancer/cervical/basic_info/screening.htm) Accessed March 8, 2010.
31. Kulmala SM, Syrjänen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Podistov J et al. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* 2004;42:2470-5.
32. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001;84:1616-23.
33. Koidl C, Bozic M, Hadžisejdić I, Grahovac M, Grahovac B, Kranewitter W et al. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:144. e1-6.
34. WHO. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Background Paper. World Health Organization (2008) Available at [www.who.int/immunization/documents/HPVBGpaper\\_final\\_03\\_04\\_2009.pdf](http://www.who.int/immunization/documents/HPVBGpaper_final_03_04_2009.pdf) Accessed March 8, 2010.
35. Grce M. Primary and secondary prevention of cervical cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9:851-7.
36. Harper DM. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:1663-79.
37. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix™ and Gardasil® human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin* 2009;5:705-19.
38. Michels KB, zur Hausen H. HPV vaccine for all. *Lancet* 2009;374:268-70.