

## Humani virusi papiloma (HPV)

M. Poljak, B. J. Kocjan, K. Seme, K. Fujs, M. Potočnik, B. Luzar in N. Gale

Humani virusi papiloma (HPV) so zelo heterogena skupina virusov DNA, ki jih etiološko povezujemo s številnimi benignimi in malignimi spremembami ploščatoceličnega epitelijskega tkiva. Poznanih je že več kot 95 genotipov HPV. V prispevku bomo predstavili osnovne lastnosti HPV, genotipe HPV, razvrščanje in razmnoževanje HPV, karcinogenezo, posredovano z visokorizičnimi genotipi HPV, ter diagnostiko in možnosti preprečevanja okužbe s HPV.

Na kratko bomo predstavili tudi tri novotvorbe, ki so najtesneje etiološko povezane z okužbo s HPV: rak materničnega vratu, ploščatocelični papilom grla in genitalne bradavice.

### ZGRADBA HPV

HPV taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, rod *Papillomavirus* (1, 2). So majhni, goli virusi DNA, ki v premeru merijo približno 55 nm. Dedni material HPV je obdan z dvoplastnim beljakovinskim plaščem, imenovanim kapsida. Kapsida je ikozaedrična in sestavljena iz 72 morfoloških enot, kapsomer, ki predstavljajo dva tipa strukturnih beljakovin, t. i. veliko (L1) in malo (L2) plaščno beljakovino. Velika plaščna beljakovina ima povprečno molekularno maso 54 kDa in tvori približno 80–90 % vseh beljakovin virusnega plašča. Ostali del beljakovin virusnega plašča sestavlja mala plaščna beljakovina z molekularno maso 74–80 kDa (3).

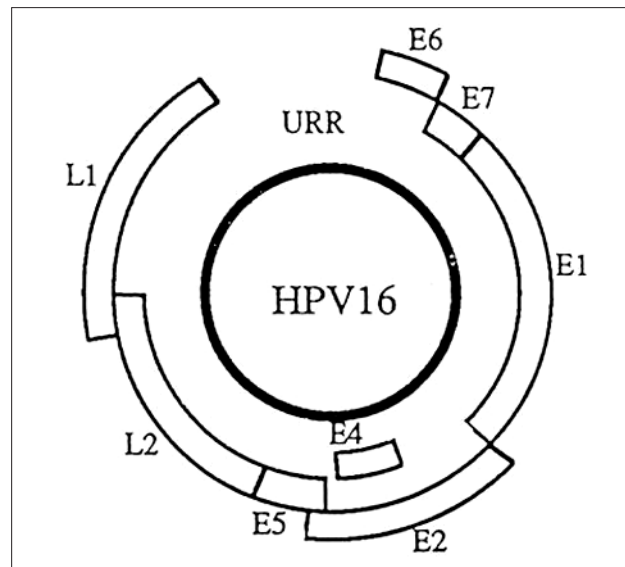
### ORGANIZACIJA GENOMA HPV IN VLOGA VIRUSNIH BELJAKOVIN

Genom HPV je krožna, zaprta, dvojnova DNA, velikosti 7500–8000 baznih parov (bp), z molekularno maso  $5,2 \times 10^6$  Da (3). Organizacija genoma HPV je shematsko prikazana na sliki 1.

Virusni genom sestavljajo kodirajoča in nekodirajoča območja. Kodirajoča delimo na zgodnje območje E (*angl. early*) in pozno območje L (*angl. late*).

Območje E vsebuje zapis za beljakovine, povezane s podvojevanjem virusa, uravnavanjem prepisovanja virusnega genoma in transformacijo okuženih celic. Večina do sedaj opredeljenih HPV ima najmanj 6 različnih genov E: E1, E2, E4, E5, E6 in E7 (4). Gena E6 in E7 sta med vsemi

**\*Kontaktni avtor:** prof. dr. Mario Poljak, dr. med.,  
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta,  
Zaloška 4, 1000 Ljubljana, Slovenija.  
Telefon: +386 1 543 7453. Faks: +386 1 543 7418. E-pošta:  
mario.poljak@mf.uni-lj.si



Slika 1. Organizacija genoma HPV-16.

območji genoma HPV najboljše raziskana. Večina raziskovalcev meni, da sta beljakovini E6 in E7 najpomembnejši v onkogenezi novotvorb, ki nastanejo zaradi okužbe s HPV (5, 6). Dokaz za to so pogosto najdeni prepisi genov E6 in E7 v različnih tumorjih in celičnih linijah (7). Onkogeno delovanje beljakovin E6 in E7 je podrobno opisano v poglavju »Karcinogeneza, posredovana z visokorizičnimi genotipi HPV«.

Transformirajoče lastnosti izraža tudi beljakovina E5, katere temeljna funkcija je indukcija celične transformacije prek tirozin-kinaznih receptorjev nekaterih rastnih faktorjev. Zaradi šibke transformirajoče aktivnosti *in vitro* in odsotnosti pri večini kožnih genotipov HPV in pri genotipih HPV, prvotno povezanih z bradavičasto epidermodisplazijo, je vloga E5 v procesu celične transformacije verjetno zanemarljiva. Poleg tega beljakovina E5 s še nezanim mehanizmom verjetno aktivira razmnoževanje epitelnih celic, ki dozorevajo v zgornjih plasteh kože (2, 8, 9, 10).

Virusna beljakovina E1 ima pomembno vlogo pri virusnem razmnoževanju in vzdrževanju HPV v obliki zunajkromosomskih delcev DNA ali episomov. E1 se veže na *ori* (*angl. origin of replication*) mesto podvojevanja virusnega genoma v nekodirajočem območju LCR (*angl. long control region*) in deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo (8).

Virusna beljakovina E2 se veže na DNA in uravnava podvojevanje in prepisovanje virusnega genoma. Z vezavo

na mesto *ori* fizično ovira vezavo celičnih dejavnikov prepisovanja SP1 in TFIIID, ki so nujni za prepisovanje virusnih onkogenov E6 in E7 (10).

Vloga virusne beljakovine E4 še ni povsem znana. Dosedanje študije so pokazale, da se E4 veže na citokeratine okuženih celic in povzroči, da se struktura citoskeleta v celicah poruši. Zaradi porušenega citoskeleta okužena celica dobi značilen izgled koilocita. Predvidevajo, da je porušenje citokeratinske mreže potrebno za lažje izstopanje zrelih virusnih delcev iz okuženih gostiteljskih celic (8, 10).

Območje L nosi zapis za strukturne beljakovine virusnega plašča (L1, L2). Gen L1 vsebuje zapis za veliko plaščno beljakovino in je skupaj z odprtim območjem za prepis beljakovine E1 najbolj ohranjeni del genoma med različnimi genotipi HPV. Gen L2 ima zapis za malo plaščno beljakovino, ki je pri posameznih genotipih HPV različna (1).

Nekodirajoče območje LCR oziroma URR (*angl. upstream regulatory region*) ne vsebuje zapisa za beljakovine, ampak zaporedja DNA, pomembna za uravnavanje virusnega razmnoževanja in prepisovanja virusnih genov. Nekodirajoče območje LCR se nahaja med genoma L1 in E6. Funkcija drugega nekodirajočega območja, ki se nahaja med genoma E5 in L2, še ni znana (11).

## GENOTIPI HPV

HPV so izjemno heterogena skupina majhnih DNA virusov, ki jih razvrščamo v različne virusne genotipe na podlagi skladnosti nukleotidnih zaporedij. Do danes je popolnoma opredeljenih in uradno priznanih že več kot 95 genotipov in 4 podtipi HPV (2, 12).

Leta 1978 so na konferenci v Mobilu (Alabama, ZDA) prvič sprejeli predlog o klasifikaciji oz. genotipih HPV. Tako so novo odkriti virus opredelili kot nov genotip HPV, če je bila skladnost njegovega nukleotidnega zaporedja z že znanimi genotipi HPV manj kot 50 %. Pri tem so skladnost nukleotidnega zaporedja ugotavljali z merjenjem reasociacijske kinetike pri hibridizaciji pod strogimi pogoji (1). Mednarodna komisija za nomenklaturu virusov je na letnem sestanku v Seattlu (Washington, ZDA) leta 1991 določila nova merila za opredelitev genotipa oz. podtipa HPV. Vsak novo odkriti virus, ki kaže več kot 10-odstotno neskladnost nukleotidnega zaporedja z že znanimi genotipi virusa v območjih E6, E7 in L1, opredelimo kot nov genotip. Če je neskladnost med 2–10 %, je to virusni podtip, in kadar je neskladnost pod 2 %, novi virus opredelimo kot različico enakega genotipa (1). Leta 1995 so nato na konferenci v kanadskem mestu Quebec City sprejeli sklep, da je za opredelitev novega genotipa HPV potrebna le analiza nukleotidnega zaporedja območja L1 (1). Tako genom HPV, katerega nukleotidno zaporedje celotnega gena L1 izkazuje manj kot 90-odstotno ujemanje z L1 odprtim bralnim okvirjem (ORF, *angl. open reading frame*) uradno priznanih genotipov HPV, opredelimo kot nov genotip HPV. Podobno izolat HPV, pri katerem poznamo le del gena L1 in ki z deli L1 ORF uradno priznanih genotipov HPV izkazuje manj kot 90-odstotno ujemanje, opredelimo

kot potencialno nov genotip HPV (*angl. putatively new HPV genotype*). Če je neskladnost v genu L1 med 2 in 10 %, je to virusni podtip. Kadar je odstopanje nekega nukleotidnega zaporedja od prototipskega oz. referenčnega izolata (največkrat prvi izolat nekega genotipa HPV) istega genotipa HPV manjše od 2 oz. 5 % za kodirajoča oziroma za nekodirajoča področja genoma HPV, opredelimo novi virus kot podtipsko različico enakega genotipa HPV (12, 13).

Genotipi HPV so torej oštevilčeni popolnoma naključno – po vrstnem redu osamitve, in ne po bioloških lastnostih virusov ali njihovi genomski sorodnosti. Odkrivanje novih genotipov spremljajo v Referenčnem centru za HPV (Deutsches Krebs-Forschungszentrum) v Heidelbergu (Nemčija), kjer določajo tudi zaporedne številke novo opredeljenih genotipov HPV (14). Za opredelitev in priznanje novega genotipa HPV je treba celotni genom (lahko po delih) izolata HPV vklonirati v plazmidne vektorje in mu določiti nukleotidno zaporedje oziroma značilne ORF. Če pridobimo genomsko zaporedje potencialnega novega genotipa HPV z verižno reakcijo s polimerazo in ne s klasičnim kloniranjem, namesto s HPV, izolat (genotip) označimo s *candHPV* in mu dodamo zaporedno številko (2).

## RAZVRŠČANJE GENOTIPOV HPV

Genotipe HPV razvrščamo v določene skupine na dva načina: (i) glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela in (ii) glede na skladnost nukleotidnih zaporedij.

### Razvrščanje genotipov HPV glede na tkivni tropizem

Na podlagi epidemioloških in molekularnih raziskav in glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela, poznane genotipe HPV razvrščamo v štiri skupine (tabela 1) (2, 15).

Kot je razvidno iz tabele 1, v prvo skupino uvrščamo sluznične oziroma anogenitalne genotipe HPV, ki jih glede na njihov onkogeni potencial oziroma zmožnost povzročanja maligne preobrazbe ploščatoceličnega epitela sluznic delimo na visokorizične, verjetno visokorizične, nizkorizične in genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom (15). Medtem ko okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV etiološko povezujemo z intraepitelijsko neoplazijo najvišje stopnje in malignimi ploščatoceličnimi tumorji, je okužba z nizkorizičnimi genotipi HPV povezana predvsem z razvojem benignih novotvorb ploščatoceličnega epitela (16). Genotipi HPV-26, HPV-53 in HPV-66 so opredeljeni kot verjetno visokorizični genotipi HPV, saj je do danes zbranih premalo epidemioloških in bioloških dokazov, ki bi lahko potrdili filogenetsko uvrstitev teh virusov k visokorizičnim genotipom HPV (15).

Drugo skupino predstavljajo nesluznični oziroma kožni genotipi HPV, ki okužijo predvsem poroženevajoč večvrstni ploščatocelični epitel. Najpogosteje povzročajo različne benigne novotvorbe kože oziroma navadne kožne bradavice.

V tretjo skupino uvrščamo genotipe HPV, ki lahko okužijo tako poroženevajoč kot neporoženevajoč večvrstni ploščatocelični epitel (kožno-sluznični genotipi) in jih v

zadnjem času povezujejo tudi z neoplastičnimi spremembami epitela sluznic (2).

V četrto skupino uvrščamo t. i. genotipe EV-HPV, oziroma viruse, prvotno osamljene iz resičastih novotvorb kože pri bolnikih z dedno boleznijo, imenovano bradavičasta epidermodisplazija. Po podatkih iz literature je s temi virusi v povprečju okuženih 40–70 % zdravih ljudi, vendar se značilne spremembe povrhnjice kože razvijejo le pri majhnem deležu okuženih, najverjetneje kot posledica dolgotrajne imunske pomanjkljivosti in posledične aktivacije virusa, npr. po presaditvi ali pri osebah, okuženih s HIV (tabela 1).

**Tabela 1.** Razvrstitev genotipov HPV glede na tkivni tropizem in onkogeni potencial (prilagojeno po ref. 2, 15).

Sluznični (anogenitalni) genotipi HPV	
<b>Visokorizični genotipi</b>	HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73, HPV-82
<b>Verjetno visokorizični genotipi</b>	HPV-26, HPV-53, HPV-66
<b>Nizkorizični genotipi</b>	HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-61, HPV-70, HPV-72, HPV-81, candHPV-89
<b>Genotipi z nejasnim onkogenim potencialom</b>	HPV-34, HPV-55 (podtip HPV-44), HPV-57, candHPV-62, HPV-64 (podtip HPV-34), HPV-67, HPV-69, HPV-71, HPV-74, HPV-83, HPV-84, IS39 (podtip HPV-82)
Nesluznični (kožni) genotipi HPV	
HPV-1, HPV-3, HPV-4, HPV-10, HPV-28, HPV-29, HPV-41, HPV-48, HPV-50, HPV-60, HPV-63, HPV-65, HPV-78, HPV-88, HPV-94, HPV-95	
Kožno-sluznični genotipi HPV	
HPV-2, HPV-7, HPV-27, HPV-40, HPV-43, HPV-57, candHPV-91	
Genotipi EV-HPV, povezani z boleznijo epidermodysplasia veruciformis	
HPV-5, HPV-8, HPV-9, HPV-12, HPV-14, HPV-15, HPV-17, HPV-19, HPV-20, HPV-21, HPV-22, HPV-23, HPV-25, HPV-36, HPV-37, HPV-38, HPV-47, HPV-49, HPV-75, HPV-76, HPV-80, candHPV-92, candHPV-93, candHPV-96	

### Razvrščanje genotipov HPV glede na skladnost nukleotidnih zaporedij

Genotipe HPV taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, rod *Papillomavirus*, natančneje v različne rodove virusov papiloma alfa, beta, gama, mu in nu (2). S primerjavo celotnega zaporedja L1 ORF 96 genotipov HPV in 22 živalskih virusov papiloma, so de Villiersova in sodelavci leta 2004 objavili filogenetsko drevo s 16 rodovi in 45 vrstami virusov papiloma. V rod virusov papiloma alfa uvrščamo sluznične, kožno-sluznične in nekatere kožne genotipe HPV. Rod virusov papiloma beta sestoji pretežno iz genotipov EV-HPV. V rodove virusov papiloma gama, mu in nu uvrščamo preostale kožne genotipe HPV. V druge

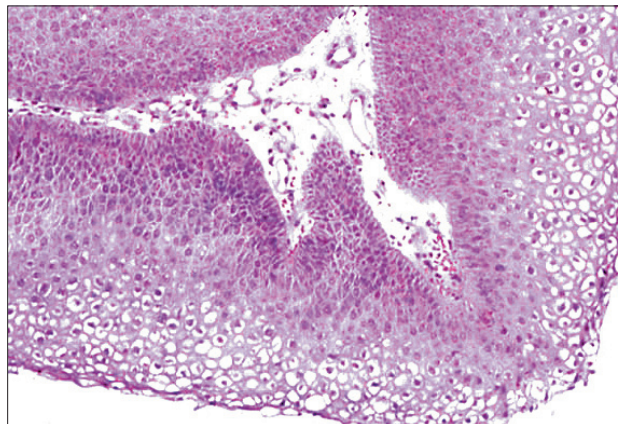
rodove družine *Papillomaviridae* so uvrščeni različni živalski virusi papiloma (2).

### RAZMNOŽEVANJE HPV

Tarčne celice za HPV so bazalne celice večvrstnega ploščatoceličnega epitela, ki so tudi mesto začetka okužbe s HPV. Domnevajo, da imajo zaradi specifične povezave med HPV in določeno vrsto epitela, samo te celice receptorje za vstop HPV (17, 18).

Proces razmnoževanja HPV je natančno uravnan in je odvisen od prisotnosti nekaterih uravnalnih virusnih beljakovin ter stopnje dozorevanja epitelijskih celic gostitelja. Ker bazalne epitelijske celice še niso dozorele, je razmnoževanje HPV v njih močno omejeno. Pozneje se sočasno z dozorevanjem okuženih celic povečuje tudi sposobnost razmnoževanja HPV v celici, kompletni virioni pa se sproščajo le iz popolnoma dozorelih celic (17, 18).

V bazalnih epitelijskih celicah se virusna DNA nahaja izključno v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev ali episomov. Bazalne celice z episomi so nosilke latentne okužbe in jih histološko ni mogoče razlikovati od neokuženih celic. Na tej stopnji podvajanje virusnega genoma tesno sledi celičnemu ciklu gostiteljske celice. Navadno pri eni celični delitvi nastane le ena kopija virusnega genoma. Pridelki zgodnjih virusnih genov E6 in E7, ki nastajajo v t. i. vegetativnem virusnem ciklu, stimulirajo bazalne epitelijske celice k pospešenemu razmnoževanju. Ob začetku diferenciacije bazalnih celic oziroma ko bazalne celice dozorejo v spinozne celice, se celični cikel ustavi. Od tu naprej poteka podvajanje genoma HPV po načinu kotalečega se kroga (*angl. rolling circle*), tako da v gostiteljskih celicah nastaja veliko kopij virusnega genoma. Pod vplivom celičnih dejavnikov prepisovanja (*angl. differentiation-induced transcription factors*) pride do aktivacije promotorjev poznih genov (L) ter sinteze velike in male plaščne virusne beljakovine. Nastali virioni se sproščajo s celično lizo in so sposobni okužiti sosednje celice. Zaradi razmnoževanja HPV nastanejo v povrhnjih epitelijskih celicah za HPV značilne morfološke spremembe, imenovane koilocitoza (1). Za koilocite so značilna skrčena, hiperkromna jedra različnih oblik, kromatin je grudast, okoli jeder pa se pojavlja značilen svetel pas ali halo (slika 2).

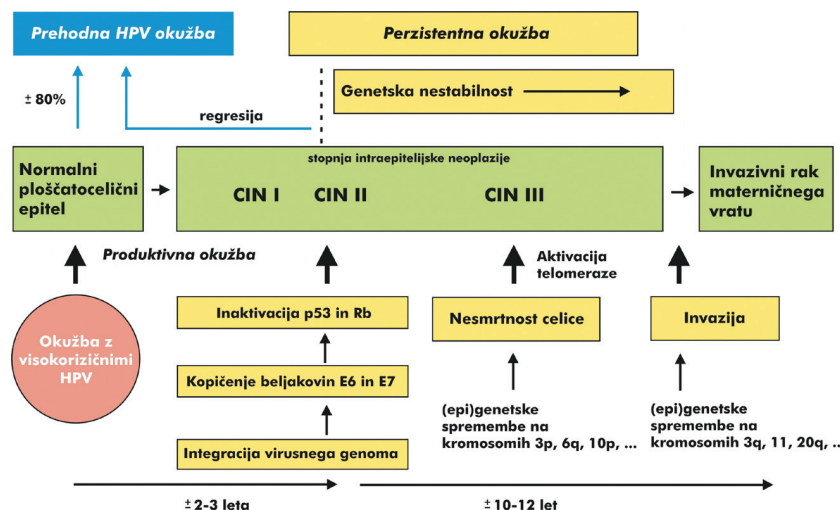


**Slika 2.** Koilocitotno spremenjen epitelij genitalne bradavice.



### KARCINOGENEZA, POSREDOVANA Z VISOKORIZIČNIMI GENOTIPI HPV

Novejša spoznanja o HPV so privedla do razvoja molekularnega modela karcinogeneze, posredovane z visokorizičnimi genotipi HPV. Temelj modela je interakcija genskih pridelkov visokorizičnih genotipov HPV (virusnih beljakovin) z močno kontroliranim spletom celičnih onkogenov in tumor zavirajočih beljakovin, ki uravnava proliferacijo celic in sintezo DNA. Model je prvi predstavil zur Hausen (19) in z manjšimi spremembami velja še danes. Avtor opisuje razvoj tumorjev v treh stopnjah, pri čemer kot vzorčni tumor služi rak materničnega vratu (slika 3). V prvi stopnji HPV okuži celico. Ključni dogodek pri tem modelu



Slika 3. Shematski prikaz večstopenjskega modela razvoja raka materničnega vratu.

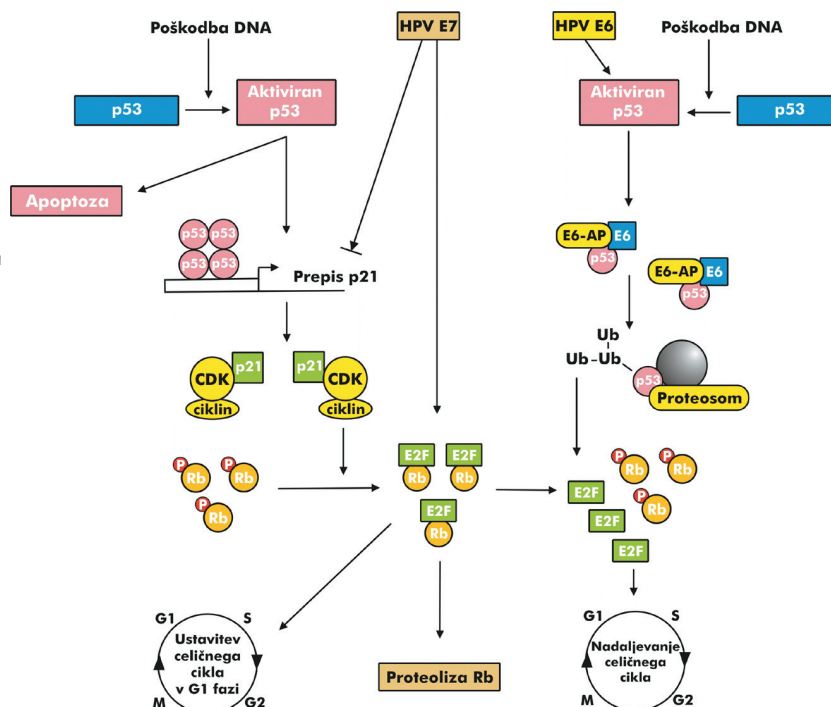
je druga stopnja oz. vključevanje (integracija) DNA HPV v humani genom (19). Do tega dogodka pride le v primeru razmeroma redke dolgotrajne (perzistentne) okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV, v nasprotju s pogostejšimi prehodnimi okužbami s HPV, ki so večinoma subklinične in spontano izginejo (slika 3). Nagnjenost k vključevanju v humani genom kažejo predvsem visokorizični tipi HPV (med njimi največ HPV-16 in HPV-18), nasprotno pa je ta dogodek pri okužbi z nizkorizičnimi tipi HPV izjemno redek (11, 19, 20). V tretji stopnji razvoja tumorja imajo poleg HPV pomembno vlogo tudi dodatne karcinogene snovi, kot so cigaretni dim, UV-žarki, obsevanje, najrazličnejši kemični dejavniki itd., ker povzročajo nastanek številnih sprememb človeškega genoma, ki vodijo v nesmrtnost okužene celice in možno maligno preobrazbo.

Številne raziskave kažejo, da je fizikalno stanje DNA HPV v benignih in malignih tumorjih oziroma različnih predrakavih spremembah epitela različno. V benignih tumorjih in intraepitelijskih neoplazijah

nižje stopnje (CIN I, CIN II) je virusna DNA prisotna v episomalni obliki, pri malignih tumorjih in intraepitelijskih neoplazijah najvišje stopnje (CIN III) pa je vsaj del virusne DNA vključen v genom celice gostiteljice (slika 3) (4, 20). Pri vključevanju virusne DNA visokorizičnih genotipov HPV v genom bazalnih celic pride do prekinitve virusnega genoma skoraj vedno na območju gena E2 (21). Izražanje gena E2, katerega pridelok (beljakovina E2) nenehno negativno uravnava izražanje virusnih genov E6 in E7, je zaradi fizične prekinitve gena E2 ob vključevanju v humani genom onemogočeno. Rezultat tega je povečano, neregulirano kopičenje virusnih beljakovin E6 in E7 ter njuna vezava na številne celične beljakovine, med katerimi

sta najpomembnejši tumor zavirajoči beljakovini p53 in pRB. Z vezavo virusnih beljakovin E6 in E7 je zavrti normalno tumor zavirajoče zaščitno delovanje celičnih beljakovin p53 in RB (20).

HPV-beljakovina E6 se v gostiteljskih celicah poveže v beljakovinski kompleks s celično beljakovino E6-AP (*angl. cellular ubiquitin-protein ligase E6-AP*), ki normalno sodeluje v procesu razgradnje celičnih beljakovin po ubikvitinski poti. Z vezavo virusne beljakovine E6 se vloga E6-AP spremeni, tako da v proces proteolitske razgradnje celičnih beljakovin prednostno usmerja tumor zavirajočo beljakovino p53. Beljakovina E6 v samem procesu razgradnje deluje kot katalizator, za učinkovito razgradnjo p53 zadostujejo že majhne količine



Slika 4. Shematski prikaz molekularnih interakcij med virusnimi beljakovinami E6 in E7 ter celičnimi tumor zavirajočimi beljakovinami.

E6 (slika 4). Poleg tega lahko E6 posredno zavre p53 z vezavo na njegov koaktivator p300/CBP (9, 22).

Celična jedrna beljakovina p53 normalno uravnava prepisovanje celičnih beljakovin, ki sodelujejo v kontroli celičnega cikla na prehodu iz G1 v S oziroma iz G2- v M-fazo in beljakovina Bcl-2, ki zavira apoptozo. Ob poškodbi DNA (iz kakršnega koli razloga) količina p53 naraste, kar sproži prepisovanje ciklin kinaznega inhibitorja p21 (angl. *cyclin kinase inhibitor*), ki močno zavre celični cikel, saj zmanjša celično raven številnih od ciklina odvisnih kinaz cdk (angl. *cyclin dependent kinases*), ki pomagajo vzdrževati celični ciklus in omogočajo delitev celice. Celični popravilni mehanizmi imajo tako dovolj časa, da popravijo okvarjene odseke DNA oziroma da se, če je DNA preveč poškodovana, sproži proces apoptoze. Zaradi te funkcije so beljakovino p53 poimenovali »varuh človeškega genoma«. Nasprotno, kadar (i) gen p53 manjka, (ii) je gen p53 mutiran, ali kadar je (iii) beljakovina p53 inaktivirana zaradi delovanja HPV-beljakovine E6, v jedru celice prevlada aktivnost cdk, ki fosforilirajo tumor zavirajočo beljakovino Rb. Tako pride do sprostitve dejavnikov prepisovanja E2F oziroma prehoda celičnega cikla iz G1- v S-fazo oziroma delitve celice ne glede na prisotnost potencialno karcinogenih poškodb DNA (22, 23).

HPV-beljakovina E7 je strukturno in funkcionalno podobna antigenu E1A adenovirusov, velikemu antigenu T-virusa SV40 in gostiteljski celični beljakovini ciklinu D1. Vse omenjene beljakovine imajo sposobnost kompetitivne vezave s celično tumor zavirajočo beljakovino Rb in sorodnima beljakovinama p107 in p130, ki jih tako zavrejo. Z vezavo beljakovine E7 na Rb pride do proteolitske razgradnje beljakovine Rb po ubikvitinski poti s proteasomom 26S (9). V nasprotju z beljakovino p53 je učinkovitost zaviranja beljakovine Rb odvisna od koncentracije virusne beljakovine E7.

Celična beljakovina Rb normalno deluje kot zaviralec (represor) družine dejavnikov prepisovanja E2F, ki postanejo aktivni šele na prehodu iz G1- v S-fazo celičnega cikla. V pozni G1-fazi celičnega cikla od ciklina odvisne kinaze fosforilirajo beljakovino Rb in tako sprostijo negativno uravnavanje E2F. Dejavniki prepisovanja E2F so pomembni za prepisovanje mnogih gostiteljskih genov, potrebnih za sintezo DNA in nadaljevanje celičnega cikla (npr. za DNA-polimerazo  $\alpha$ , dihidrofolatno reduktazo, timidinsko kinazo). Njihova aktivnost upade ob koncu mitoze ob ponovni vezavi na defosforilirano beljakovino Rb. Vezava virusne beljakovine E7 na beljakovino Rb povzroči funkcionalno inaktivacijo beljakovine Rb in sprostitve gostiteljskih transkripcijskih dejavnikov E2F oziroma prehod celičnega cikla iz G1- v S-fazo neodvisno od cdk. Podobno kot beljakovina E6 tudi beljakovina E7 zavira ciklin kinazna inhibitorja p21 in p27, zaradi česar se nekontrolirano poveča količina ciklinskih molekul in naraste aktivnost ciklin/cdk kompleksov (slika 4) (9, 24).

Odsotnost oziroma nepravilno delovanje tumor zavirajočih beljakovin p53 in Rb v celici zaradi vezave na HPV-beljakovine E6 in E7 torej omogoča neovirano škodljivo delovanje različnih karcinogenih dejavnikov v tretji stopnji in nekontrolirano pospešeno delitev celic s poškodovano

DNA, kar vodi do kopičenja različnih mutacij in s tem do velike nagnjenosti k maligni transformaciji s HPV okuženih celic. Nekatere znane spremembe genoma, ki so jih ugotovili pri procesu maligne transformacije in ki so odgovorne za nesmrtnost celic ter invazijo, so navedene na sliki 3.

Sposobnost vezave z beljakovinama p53 in Rb imata tudi beljakovini E6 in E7 nizkorizičnih genotipov HPV, vendar je njuna moč vezave v primerjavi z E6 in E7 visokorizičnih genotipov HPV približno stokrat manjša (7).

Opisani tristopenjski model razvoja raka materničnega vratu pojasnjuje osnovne značilnosti onkogeneze, povezane z okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV: med številnimi s HPV okuženimi osebami nastane rak le pri redkih, časovni presledek med okužbo s HPV in pojavom raka je navadno dolg, očiten je in tudi na molekularni ravni razločljiv sinergistični učinek HPV in drugih karcinogenih dejavnikov (slika 3).

## DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HPV

V zadnjih 30 letih so razvili številne metode za dokazovanje HPV, ki jih delimo na tradicionalne in molekularne (tabela 2).

**Tabela 2.** Pregled metod za dokazovanje in genotipizacijo HPV.

<b>Tradicionalne metode</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Svetlobna mikroskopija</li> <li>• Elektronska mikroskopija</li> <li>• Imuhistokemične metode</li> </ul>
<b>Molekularne metode</b>
<p><b>Hibridizacijske metode</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hibridizacija Southern blot</li> <li>• Hibridizacija <i>dot-blot</i></li> <li>• Hibridizacija <i>in situ</i></li> <li>• Hibridizacija <i>in situ</i> na filtru</li> <li>• Tekočinska hibridizacija (test <i>Digene Hybrid Capture</i>)</li> </ul> <p><b>Metode pomnoževanja nukleinskih kislin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verižna reakcija s polimerazo s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi</li> <li>• Verižna reakcija s polimerazo z genotipsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi</li> <li>• Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR)</li> <li>• PCR-encimsko oligonukleotidni test (<i>Roche AMPLICOR HPV Test</i>)</li> <li>• Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA (NASBA)</li> </ul> <p><b>Metoda določanja nukleotidnega zaporedja</b></p>

Tradicionalne metode temeljijo na opazovanju značilnih citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom (slika 2), opazovanju virusnih delcev z elektronskim mikroskopom in dokazovanju virusnih strukturnih beljakovin z uporabo monoklonskih in poliklonskih protiteles. Izolacija HPV v celični kulturi za zdaj ni možna, saj se virus razmnožuje le v terminalno dozorelih epitelnih celicah. Tradicionalne metode niso dovolj občutljive in ne omogočajo genotipizacije HPV, zato so se v diagnostiki okužb s HPV uveljavile le molekularne metode (16).

Molekularne metode temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusne DNA. Največkrat se uporabljajo različni

hibridizacijski testi z RNA- in DNA-lovkami, usmerjenimi proti značilnim odsekom genoma različnih genotipov HPV, ali testi, zasnovani na verižni reakciji s polimerazo (PCR), v katerih pomnožujemo značilna kratka zaporedja virusnega genoma, pridelek pomnoževanja pa naknadno dokazujemo z različnimi tehnikami (elektroforeza v gelu, encimska razgradnja, *dot blot*, encimski oligonukleotidni test) (tabela 2). Hibridizacijske metode temeljijo na povezavi (hibridizaciji) med komplementarnimi predeli majhnih, označenih delcev nukleinskih kislin ali lovk in tarčno DNA. Lovke so lahko označene z različnimi radioaktivnimi ( $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) in neradioaktivnimi označevalci (biotin, digoksin, fluorescentna barvila). Trdnost povezave med lovko in tarčno DNA je odvisna od skladnosti nukleotidnega zaporedja obeh verig in od pogojev, pri katerih poteka hibridizacija. Lovke so lahko značilne za določen genotip (genotipsko značilne lovke) ali za več genotipov HPV (skupinsko značilne lovke) (25).

### Hibridizacija po Southernu

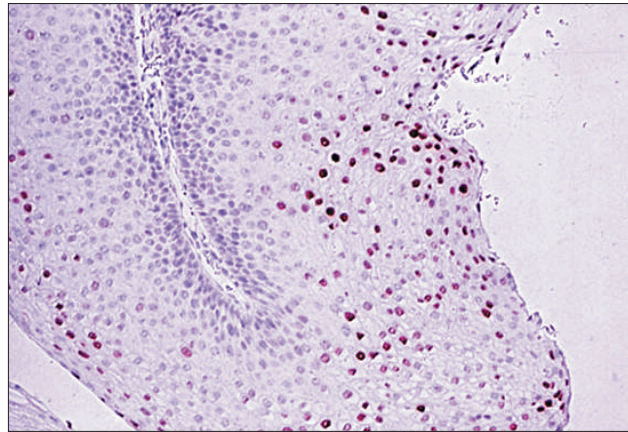
Hibridizacija po Southernu (26) je bila dolga leta temeljna molekularna metoda za odkrivanje in genotipizacijo HPV. Metoda hibridizacije po Southernu je še vedno ena najbolj občutljivejših in najbolj specifičnih metod za odkrivanje okužb s HPV (27). Uporabna je tudi za ugotavljanje fizikalnega stanja DNA HPV oziroma za ugotavljanje, ali je virusni genom v gostiteljski celici v episomalni ali vključeni (integrirani) obliki. Ker pa je metoda časovno zamudna, draga, neprimerna za obdelavo večjega števila vzorcev in ker za izvedbo zahteva razmeroma velike količine DNA (5-10  $\mu\text{l}$ ), ni primerna za rutinsko diagnostiko (28).

### Hibridizacija *dot-blot*

Hibridizacija *dot-blot* je tehnično preprostejša različica prej opisane metode. Test Vira Pap/Vira Type (Digene Laboratories, Silver Spring, ZDA), zasnovan na metodi *dot-blot*, je bil prvi komercialno dostopen test za odkrivanje HPV, ki ga je odobrila ameriška Uprava za nadzor hrane in zdravil (FDA, *angl. Food and Drug Administration*). Omogočal je genotipizacijo HPV z uporabo sedmih radioaktivno označenih genotipsko značilnih lovk RNA (HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35). Pred razvojem testov na podlagi tekočinske hibridizacije je bil to najpogosteje uporabljan test v diagnostiki HPV (16). Zaradi pogostih lažno pozitivnih rezultatov, premajhne občutljivosti in uporabe radioaktivno označenih lovk so ga kmalu umaknili s trga.

### Hibridizacija *in situ*

Hibridizacija *in situ* (ISH, *angl. in situ hybridization*) je metoda, pri kateri se postopek dokazovanja DNA HPV odvija v jedru okuženih celic. ISH lahko izvedemo na citoloških vzorcih ali na tkivnih rezinah (slika 5). Glavne prednosti metode ISH so preprostost, hitrost, ponovljivost, razmeroma nizka cena, možnost hkratnega testiranja več vzorcev, možnost natančne lokalizacije virusne DNA v celici in možnost primerjave morfoloških sprememb v tkivih, okuženih z določenim genotipom HPV (29, 30). V primerjavi z metodami, pri katerih poteka hibridizacija s



**Slika 5.** Ploščatocelični papilom grla, v katerem je s hibridizacijo *in situ* dokazana navzočnost HPV-6. Pozitivna reakcija je vidna v rdečerjavo obarvanih jedrih v zgornjih dveh tretjinah ploščatoceličnega epitelijskega tkiva. Kontrastirano z Mayerjevim hematoksilinom.

predhodno osamljeno DNA, je ISH nekoliko manj občutljiva, kar je njena glavna pomanjkljivost. Druga pomanjkljivost je, da so komercialno dostopne le lovke, ki so značilne za sedem genotipov HPV (HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 in HPV-51).

### Tekočinska hibridizacija

Test Hybrid Capture (Digene Laboratories, Silver Spring, ZDA) je trenutno edini za diagnostiko okužbe s HPV, ki ima dovoljenje FDA za uporabo v medicini. Metoda temelji na tekočinski hibridizaciji, pri kateri pride do hibridizacije tarčne DNA HPV z značilnimi enovijačnimi RNA-lovkami pravo v tekočini. Mešanica lovk je iz dveh kompletov enovijačnih RNA: en komplet lovk prepozna nizkorizične in drugi visokorizične genotipe HPV. Nastali hibridizacijski kompleksi se vežejo na poliklonska protitelesa, vezana na netopni nosilec (notranjost reakcijske posodice, vdolbinice mikrotitracijske ploščice). Hibride zaznamo z alkalno fosfatazo označenimi protitelesi proti hibridom RNA/DNA in s kemiluminiscentnim substratom. Intenziteto svetlobe, ki jo oddaja kemiluminiscentni substrat, merimo z luminometrom in jo izražamo v relativnih svetlobnih enotah. Intenziteta sproščene svetlobe je sorazmerna količini vezanih hibridov oz. količini DNA HPV v kliničnem vzorcu (31).

Obstajata dve generaciji testa Hybrid Capture, od katerih se trenutno v svetu uporablja novejša, druga generacija testa. S kompletom lovk za visokorizične oziroma nizkorizične genotipe HPV lahko s testom Digene Hybrid Capture (HCII) dokažemo skupino 13 visokorizičnih (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59 in HPV-68) in skupino 5 nizkorizičnih (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43 in HPV-44) genotipov HPV (31). Test HCII ne omogoča natančnega določanja genotipa HPV. V primerjavi s PCR je manj občutljiv, vendar je bolj specifičen in ima večjo pozitivno napovedno vrednost za CIN III kot PCR. Pomanjkljivost testa HCII so občasni lažno pozitivni rezultati zaradi navzkrižne reaktivnosti visokorizičnega kompleta DNA lovk z nekaterimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test (32).



### Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR je trenutno najboljčutljivejša metoda za dokazovanje okužb s HPV. Dokazovanje virusov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju za virus značilnega majhnega odseka genoma. Reakcija je sestavljena iz 25 do 40 ponovitev temperaturnih ciklov zaporedne denaturacije osamljene DNA, spajanja izbranih začetnih oligonukleotidov s komplementarnimi zaporedji ter sinteze nove komplementarne DNA v območju med začetnima oligonukleotidoma. Vsaka novo sintetizirana kopija odseka DNA v naslednjem ciklu reakcije služi kot matrica. Tako se začetni tarčni odseki virusne DNA v reakciji eksponentno kopičijo (33).

Ker začetni oligonukleotidi izbirajo odsek genoma HPV, ki bo v reakciji pomnožen, je njihov pravilni izbor najpomembnejši korak optimizacije PCR (34, 35). Za pomnoževanje virusnega genoma HPV izbiramo med dvema različnima vrstama začetnih oligonukleotidov, med genotipsko značilnimi in skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi. Značilna raznolikost nukleotidnih zaporedij posameznih genotipov HPV onemogoča razvoj preprostih, univerzalnih začetnih oligonukleotidov in protokola PCR za dokazovanje vseh genotipov HPV. Za določitev genotipa HPV je tako treba izvesti veliko reakcij PCR z uporabo različnih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov. Kljub učinkovitosti in veliki specifičnosti nekaterih genotipsko značilnih začetnih oligonukleotidov genotipizacija z genotipsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi ni primerna za opredeljevanje genotipov v velikem številu vzorcev. Veliko uporabnejše so metode, ki temeljijo na uporabi skupinsko značilnih začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo pomnoževanje širokega spektra genotipov HPV v eni sami reakciji PCR. Za dokazovanje sluzničnih genotipov HPV so v literaturi opisani številni skupinsko značilni začetni oligonukleotidi. Izmed teh se največkrat uporabljajo skupinsko značilni začetni oligonukleotidi PGMY09/PGMY11, GP5+/GP6+ in SPF10, ki pomnožujejo 450, 150 oziroma 65 bp dolg odsek močno ohranjenega virusnega gena L1 (16, 35, 36).

Vsaki reakciji PCR sledi dokazovanje specifičnosti pridelkov, za kar je na voljo več metod:

1. Pomnožene dele DNA ločimo z elektroforezo v gelu in njihove velikosti primerjamo z velikostjo standardnih delov DNA, ločenih v enakih razmerah elektroforeze. Specifičnost in občutljivost tovrstnega dokazovanja pridelka PCR je majhna.
2. Z metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (RFLP, *angl. restriction fragment length polymorphism*) pridelek reakcije PCR izpostavimo delovanju restrikcijskih endonukleaz in nastali vzorec razgradnje primerjamo s teoretično določenim vzorcem razgradnje pričakovanega odseka DNA. Opisanih je več različic metode RFLP, ki se med seboj razlikujejo glede na število in vrsto uporabljenih restrikcijskih encimov (16). Zanesljivost metode narašča s povečevanjem števila uporabljenih restrikcijskih endonukleaz. Najzanesljivejša je metoda RFLP z uporabo 7 restrikcijskih encimov, s

katero je mogoče opredeliti 44 različnih anogenitalnih genotipov HPV (13).

3. V encimsko oligonukleotidnem testu dokazujemo pridelek PCR z značilnimi lovkami v mikrotitracijskih ploščicah. Rezultat hibridizacije odčitamo spektrofotometrično (35). Roche AMPLICOR HPV Test (Roche Diagnostics) je najnovejši komercialno dostopen test, ki temelji na encimsko oligonukleotidnem testu in s katerim je mogoče dokazati skupino 13 visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59 in HPV-68). Njegova pomanjkljivost je v tem, da ne omogoča neposredne genotipizacije HPV.
4. Reverzni *dot-blot* je bila do sedaj največkrat uporabljena metoda za analizo pridelkov HPV PCR. Izvaja se po klasičnem protokolu za *dot-blot*, le da se na najlonsko membrano z vakuumom nanaša pridelek PCR in ne osamljena DNA. Temu sledi hibridizacija z genotipsko značilnimi lovkami. Te morajo biti izbrane tako, da se v procesu hibridizacije vežejo na komplementarno zaporedje pomnoženega dela genoma, ki je značilno samo za posamezne genotipe HPV (29, 34).
5. Reverzni *line-blot* je metoda, ki temelji na hibridizaciji s PCR pomnoženega odseka genoma HPV z genotipsko značilnimi lovkami, nanesenimi na nitrocelulozno membrano v obliki jasnih trakov. Metoda omogoča hibridizacijo pridelkov PCR z velikim številom genotipsko značilnih lovk hkrati in je zato primerna za analizo velikega števila vzorcev (36). Tako je mogoče opredeliti širok spekter genotipov HPV, med njimi tudi okužbe z več različnimi genotipi HPV (mešane okužbe). V literaturi je opisanih več različic metode *reverzni line-blot* (36, 37). Pri družbi Innogenetics (Gent, Belgija) so razvili komercialno dostopen test INNO-LiPA, s katerim je trenutno mogoče opredeliti 25 različnih anogenitalnih genotipov HPV: 13 visokorizičnih (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59 in HPV-68/73), 8 nizkorizičnih (HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, in HPV-70) in 4 genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom (HPV-34, HPV-53, HPV-66 in HPV-74). Test temelji na pomnoževanju 65 bp velikega odseka gena L1 s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi SPF10 (36). Podobno je družba Roche Diagnostics za opredeljevanje anogenitalnih genotipov HPV nedavno razvila dve različici metode *reverzni line-blot*. Test prve generacije, s katerim je mogoče opredeliti 27 različnih genotipov HPV, temelji na pomnoževanju 450 bp velikega odseka gena L1 s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi MY09/MY11 (PGMY09/PGMY11) in HMB01 (37). Nedavno razviti komercialni test druge generacije, Linear Array HPV Genotyping Test, omogoča opredelitev 37 genotipov HPV.

Metoda določanja nukleotidnega zaporedja je edina, s katero dokončno opredelimo genotip HPV. V primerjavi z drugimi molekularnimi metodami za genotipizacijo HPV je določanje nukleotidnega zaporedja metoda, ki omogoča natančnejšo opredelitev že znanih genotipov HPV,

odkrivanje mutacij, določanje podtipskih različic HPV in opredeljevanje novih genotipov HPV. Metoda je posebno primerna za dokazovanje in genotipizacijo kožnih genotipov HPV in genotipov EV-HPV, saj je tudi metod, s katerimi bi lahko potrdili specifičnost pridelkov PCR nastalih s pomnoževanjem s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi, zelo malo. Zaradi velikega deleža mešanih okužb (do 30 % pri okužbah z genotipi EV-HPV) je take pridelke PCR priporočljivo najprej vklonirati v plazmidne vektorje, jih razmnožiti v ustreznih bakterijskih sistemih in šele nato iz osamljene plazmidne DNA določiti specifična nukleotidna zaporedja (38). Ker je določanje nukleotidnega zaporedja časovno zamudno, drago in tehnično zahtevno, se danes večinoma uporablja le v raziskovalne namene.

PCR v realnem času (*angl. real time PCR*) predstavlja nadgradnjo klasične PCR, kjer pomnoževanje tarčne DNA HPV poteka istočasno kot določanje specifičnosti pomnoženih pridelkov PCR z uporabo različnih fluorescentno označenih lovk. Metoda bo najverjetneje v nekaj letih postala najbolj uporabljana metoda za dokazovanje in genotipizacijo HPV.

Poleg opisanih metod, ki temeljijo na dokazovanju DNA HPV, se v zadnjem času uvajajo tudi metode za dokazovanje sporočilne RNA (mRNA) nekaterih genotipov HPV. Tako je družba NorChip (Klokkarstua, Norveška) nedavno razvila komercialno dostopen test PreTect® HPV-Proof Kit, s katerim je mogoče opredeliti E6/E7 mRNA 5 visokorizičnih genotipov HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 in HPV-45).

### RAK MATERNIČNEGA VRATU IN HPV

Rak materničnega vratu je predvsem v razvitih državah za rakom dojke drugi najpogostejši rak pri ženskah. Zaradi dolgotrajnega razvoja, razmeroma učinkovitega odkrivanja in zdravljenja rizičnih sprememb predstavlja rak materničnega vratu eno od redkih onkoloških bolezni, pri katerih lahko z načrtnim iskanjem rizičnih sprememb občutno zmanjšamo incidenco raka materničnega vratu (39). V razvitih državah sta se obolevnost in smrtnost zaradi raka materničnega vratu zmanjševali predvsem zaradi dobro zasnovanega in skrbno izpeljanega načrtnega zgodnjega odkrivanja te bolezni. Kljub temu se incidenca raka materničnega vratu v nekaterih deželah z najbolje organiziranim aktivnim iskanjem in odkrivanjem ne zmanjšuje več, celo narašča pri ženskah, mlajših od 40 let. Podobno velja tudi za Slovenijo. Po podatkih Registra raka za Slovenijo se je incidenca raka materničnega vratu zmanjšala od 28,8/100.000 žensk v letu 1961 do 16,1/100.000 žensk v letu 1982. Od takrat naprej se obolevnost ne zmanjšuje več, ampak se pri ženskah, mlajših od 54 let, celo povečuje. Tako v zadnjih letih za rakom materničnega vratu v Sloveniji zboli blizu 200 žensk na leto in umre od 50 do 60 žensk na leto. Incidenca raka materničnega vratu se je leta 1994 po desetih letih spet povzpela na 18/100.000 žensk. Pri tem je bila incidenca največja pri mlajših ženskah, starih od 30 do 39 let. Leta 1997 je zaradi raka materničnega vratu zbolelo 236 žensk.

Tako se je incidenca povzpela na 23,1/100.000 žensk. V zadnjih letih se je, predvsem zaradi začetka programa ZORA, incidenca raka materničnega vratu v Sloveniji spet začela zmanjševati (39, 40).

S številnimi raziskavami, ki so bile opravljene v zadnjem desetletju, so nedvomno dokazali, da je dolgotrajna (perzistentna) okužba z visokorizičnimi genotipi HPV najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek raka materničnega vratu HPV (pregled v ref. 41). Tako so leta 1995 v multicentrični raziskavi, ki je zajela približno 1000 žensk iz 22 različnih držav, ugotovili 93-odstotno prevalenco okužbe s HPV pri ženskah z invazivno obliko raka materničnega vratu (42). V raziskavi, ki je bila opravljena štiri leta pozneje, so z uporabo novejših in zanesljivejših metod diagnostike okužbe s HPV znova analizirali 7 % vzorcev, v katerih okužbe s HPV prvotno niso dokazali. Rezultati obeh raziskav kažejo, da je prevalenca okužbe s HPV pri ženskah z invazivno obliko raka materničnega vratu vsaj 99,7 % (43). Nedavna metaanaliza na 3607 primerih raka materničnega vratu iz 25 držav sveta je pokazala, da je v svetovnem merilu najpogostejši genotip HPV povezan z rakom materničnega vratu, HPV-16, ki so ga dokazali v 54,4 % vseh primerov (44). Sledila sta genotipa HPV-18 in HPV-45 v 11,3% oziroma 5,2 %. Prevalenca drugih, manj pogostih genotipov HPV, je bila naslednja: HPV-31 (3,8 %), HPV-52 (2,3 %), HPV-33 (2,1 %), HPV-58 (1,7 %), HPV-35 (1,3 %), HPV-56 (1,1 %) in HPV-59 (1,1 %). Genotipi (po padajočem vrstnem redu) HPV-39, HPV-51, HPV-73, HPV-68, HPV-82, HPV-26, HPV-66, HPV-6, HPV-11, HPV-53, HPV-81, HPV-55 in HPV-83 so bili dokazani pri manj kot 1 % vseh primerov raka materničnega vratu (44).

Ugotovitve dosedanjih raziskav dokazujejo, da se rak materničnega vratu ne more razviti pri ženski, ki ni predhodno nekaj časa okužena z visokorizičnimi genotipi HPV. Schiffman in sodelavci so v epidemiološki raziskavi povezave med HPV in rakom materničnega vratu prvi ugotovili, da je relativno tveganje (RR) za nastanek raka materničnega vratu pri ženskah, okuženih z visokorizičnimi genotipi HPV, med 50 in 500 (45). V isti raziskavi je bilo ugotovljeno, da sta za vznik raka materničnega vratu najpomembnejša trajanje okužbe z visokorizičnimi genotipi HPV in stopnja CIN. Tako RR za nastanek raka materničnega vratu pri ženskah s CIN I in okužbo z genotipom HPV-16 ali HPV-18 znaša 140, medtem ko je RR za nastanek raka materničnega vratu pri ženskah s CIN II-III in okužbo z genotipom HPV-16 ali HPV-18 že 290 (45). Rezultati novejših raziskav kažejo, da prevalenca visokorizičnih genotipov HPV narašča z naraščanjem stopnje CIN. Prevalenca visokorizičnih genotipov HPV, dokazana v različnih populacijah žensk v svetu, se giblje med 25–45 % pri CIN I, med 60–80 % pri CIN II in med 90–100 % pri CIN III (41). Nedavna šestletna prospektivna raziskava, ki je zajela 353 žensk z različnimi stopnjami predrakavih sprememb, je pokazala, da je perzistentna okužba z visokorizičnimi genotipi HPV nujna ne samo za razvoj raka materničnega vratu, ampak tudi za nastanek in vzdrževanje CIN III (46). Med ženskami, pri katerih je prišlo do nastanka CIN III, je bilo namreč kar 95 % žensk s perzistentno okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV (46).



Posebej je treba poudariti, da je večina okužb z visokorizičnimi HPV le prehodnih in da ne vodijo v nastanek CIN in raka materničnega vratu (slika 3). Tako je prospektivna raziskava, ki je zajela 608 študentk univerze v New Jerseyju, pokazala, da je bilo v obdobju treh let 60 % študentk vsaj enkrat okuženih s HPV (47). Pri tem je bil povprečni čas trajanja okužbe s HPV 8 mesecev. Perzistentna okužba s HPV je bila čez 12 mesecev dokazana le pri 30 % in čez 24 mesecev le še pri 9 % vseh okuženih žensk. Rizična dejavnika za več kot 6-mesečno trajanje okužbe s HPV sta bila večja starost in okužba z visokorizičnimi genotipi HPV, predvsem s HPV-16 in HPV-18 (47).

Glede na pomembno vlogo visokorizičnih genotipov HPV v razvoju raka materničnega vratu so številna strokovna združenja testiranje na okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV že uvrstila v različne strokovne smernice. Največkrat priporočajo testiranje žensk na visokorizične genotipe HPV v naslednjih kliničnih primerih: (i) kot dopolnilni test v triazi bolnic z rezultati ASCUS in Pap II (abnormne in blago diskariotične celice), da bi se izboljšala občutljivost testiranja za odkrivanje CIN II in CIN III; (ii) za kontrolo uspešnosti operativnega zdravljenja predrakavih sprememb, zlasti če ne gre za konizacijo; (iii) za sledenje žensk s CIN I; (iv) kot primarno presejanje v nerazvitih deželah in v deželah, kjer citološko testiranje dosega majhno občutljivost in specifičnost za odkrivanje CIN II in CIN III; (v) kot presejalni test skupaj s citologijo pri ženskah, starejših od 30 ali 35 let, v nekaterih razvitih državah (41, 48).

#### PLOŠČATOCELIČNI PAPILOMI GRLA IN HPV

Med benignimi epitelnimi tumorji sluznice grla je najpogostejši ploščatocelični papilom. Papilom grla je krhek, resičast ali cvetačast, blede rožnat ali rdečkast tumor, velik 1–10 mm (slika 6). Lahko vznikne kjer koli na sluznici



**Slika 6.** Laringomikroskopska slika ploščatoceličnega papiloma grla.

grla. Redko se pojavlja posamezno. Navadno je v grozdčastih skupkih, najpogosteje na prostem robu glasilk in v sprednji komisuri. Pri otrocih lahko prekriva vso sluznico grla. Histološko je papilom zgrajen iz resičaste

vezivno-žilne strome, ki jo odeva večvrstni ploščatocelični epitel (49).

Klinična znamenja papilomov grla so odvisna od velikosti in lokalizacije sprememb. Papilomi na prostem robu glasilk povzročajo močno hripavost, dihanje je ovirano pri večjih novotvorbah, ki pomembno zožujejo svetlino grla.

Incidenca spontane maligne preobrazbe papilomov grla je približno 1–2 % (v Sloveniji 0,8 %) in v izbranih skupinah zdravljenih z obsevanjem doseže tudi 10 % (49, 50).

Čprav so ploščatocelični karcinomi, ki so nastali z maligno preobrazbo papilomov grla, histološko večinoma dobro diferencirani, so navadno zelo agresivni in povezani s slabo napovedjo (49).

Povezava med virusno okužbo in nastankom papilomov grla je znana že desetletja. S sodobnimi molekularnovirološkimi metodami se je odstotek ugotovljene okužbe s HPV v papilomih grla nenehno večal in v primeru uporabe PCR v posameznih skupinah papilomov grla, predvsem pri otrocih, že dosegel 100 odstotkov (50). Genotip HPV-6 oziroma HPV-11 najdemo v približno 95 % vseh papilomov grla. Okužba s HPV-6 je približno trikrat pogostejša. Nastanek in razvoj papilomov grla pri otrocih in mladostnikih povezujejo s prenosom HPV z okužene matere na novorojenca med porodom pri prehodu ploda skozi porodni kanal (51). Način okužbe sluznice grla s HPV pri odraslih bolnikih še ni dokončno razjasnjen. Najpogosteje omenjajo reaktivacijo latentne okužbe s HPV, pridobljene pri porodu, ali poznejšo okužbo zaradi orogenitalnih stikov ali stikov z aerosoli, ki vsebujejo virusne delce (52). Menimo, kot nekateri drugi avtorji (51, 53), da je prva možnost malo verjetna. Z reaktivacijo latentne okužbe s HPV si težko razlagamo npr. prvi pojav papiloma grla v starosti 71 let pri eni od naših bolnic. Če bi bila domneva o reaktivaciji latentne okužbe s HPV pravilna, bi morali zaradi pogoste prisotnosti genotipov HPV-16 in HPV-18 v cervikalnem kanalu (tudi do 15 % v populaciji ginekološko popolnoma zdravih žensk) tudi v sluznici grla pogosteje najti HPV-16 in HPV-18, kar pa je izjemno redko. Prav tako bi morala biti v primeru pravilnosti te domneve razporeditev papilomov grla med spoloma pri odraslih enakomerna (takšna, kot je pri papilomih grla pri otrocih), ne pa približno dvakrat večja pri moških, kot je ugotovljeno v vseh kliničnopatoloških študijah (49).

#### GENITALNE BRADAVICE IN HPV

Genitalne bradavice (GB) so najpogostejša benigna novotvorba v anogenitalnem predelu, ki je etiološko tesno povezana z okužbo z genotipoma HPV-6 in HPV-11. Klinično razločujemo tri vrste GB: klasične ostre kondilome (*condylomata acuminata*), ploščate kondilome (*condylomata plana*) in gigantske kondilome (*condylomata gigantea*, ali Buschke-Löwensteinovi kondilomi).

Klasični ostri kondilomi nastajajo predvsem na neporoženevajočem ploščatem epiteliju v prepucijski vreči pri neobrezanih moških, v sečnici in perianalno, pri ženskah pa na velikih in malih sramnih ustnah, nožničnem predvoru, v nožnici, na materničnem vratu in perianalno. V začetku vidimo od 1-2 mm velike, če pride do maceracije

belkaste, sicer rožnate papule. Sčasoma se povečajo po številu in velikosti, postanejo papilomatozne in zrastejo v cvetačaste tvorbe, ki lahko prekrijejo celotno zunanje spolovilo (slika 7). Nastanejo pecljate vzbrsti, ki postanejo



**Slika 7.** Genitalne bradavice na penisu pri 45-letnem moškem.

na mestih, kjer so izpostavljene pritisku, sploščene in v obliki petelinje rože. So kožne do biserne barve in imajo na površini roženo oblogo. Če so izpostavljene maceraciji, postanejo belkaste in zmečkane, v globini kožnih gub lahko tudi odmrejo. Če GB nastanejo v sečnici, lahko povzročajo krvavitve, izcedke in zmanjšan curek urina.

Ploščati kondilomi (*condylomata plana*) so ploščate rožnate, lahko številne, papule. Pri moškem se pogosteje pojavljajo na prepuciju, pri ženski pa na materničnem vratu.

Posebna oblika GB so hitro rastoči veliki Buschke-Löwensteinovi tumorji (*condylomata gigantea*), ki jih najdemo v prepucijski vreči, perianalno ali na presredku (slika 8). Rastejo hitro in destruktivno, navzven in



**Slika 8.** *Condylomata gigantea* pri 30-letnem moškem.

navznoter, lahko prodrejo v brecila ali predrejo kožo penisa ali prepucija, redko se pojavlja maligna preobrazba.

Zadnja tri desetletja incidenca GB stalno narašča. Najpogosteje so okužene ženske med 19. in 22. letom ter moški med 22. in 26. letom (54, 55). Po ocenah ameriškega Centra za nalezljive bolezni (CDC) je bilo leta 1992 v ZDA 500.000–1.000.000 novih primerov GB (56), po ocenah iz leta 1997 pa 1.000.000 (57).

Leta 1976 je zur Hausen prvi odkril povezavo med GB in okužbo s HPV (58), leta 1980 pa sta Gissmann in zur Hausen iz izvlečka GB izolirala DNA, ki se je razlikovala od petih do takrat poznanih genotipov HPV (59). Novi virus sta imenovala HPV-6 (60). Številne raziskave, opravljene v zadnjem desetletju, so pokazale, da je odstotek ugotovljene okužbe s HPV v tkivnih vzorcih GB že dosegel 100 odstotkov. Po podatkih iz dostopne literature genotip HPV-6 oziroma HPV-11 najdemo v približno 90 % vseh bradavic anogenitalnega predela (55, 61). Okužba s HPV-6 je približno trikrat pogostejša. Prevalenca mešanih HPV-okužb (okužba z več HPV-genotipi hkrati) z drugimi, večinoma anogenitalnimi genotipi HPV, se giblje od 19 % do 44 % (61).

Načine zdravljenja GB delimo na tiste, ki jih izvaja bolnik sam (podofilotoksin, imikvimod), in na tiste, ki jih opravi zdravnik (kirurško zdravljenje: ekskohleacija, ekscizija, elektrokirurgija, laser; triklorocetna kislina; krioterapija s tekočim dušikom ali ogljikovim dioksidom). Izbira zdravljenja je odvisna od morfologije in razširjenosti sprememb, temelji pa na dogovoru med bolnikom in zdravnikom. Večina bolnikov ima razmeroma majhno število GB, ki jih lahko odstranimo s katerim koli od načinov zdravljenja. Pri bolnikih z eno do pet GB je najprimernejša odstranitev pri zdravniku. Noben od naštetih načinov zdravljenja GB ni uporaben na vseh lokalizacijah. GB se ponovijo v vsaj 20–30 % primerov. Z dosedanjim poznavanjem patogeneze okužbe s HPV si ne znamo razložiti, ali gre pri ponovitvi GB za novo okužbo s HPV ali ponovni vznik GB spodbudijo HPV, ki so stalno prisotni v endogenem rezervoarju v okolici odstranjenih GB.

#### ZDRAVLJENJE OKUŽBE S HPV

Trenutno ne poznamo specifičnega protivirusnega zdravljenja okužbe s HPV. Obstoječi načini zdravljenja temeljijo na kirurški ali nekirurški odstranitvi patoloških epiteljskih sprememb večjega ali velikega tveganja ali na imunomodulaciji celične imunosti (npr. z imikvimodom ali interferoni) (57).

#### PREPREČEVANJE OKUŽBE S HPV

Kondom velja kot najuspešnejše sredstvo za preprečevanje okužbe s HPV. Tako je nedavna raziskava v katero je bilo vključenih 997 bolnikov z GB in 977 oseb v kontrolni skupini, pokazala, da se je z dosledno uporabo kondoma statistično pomembno zmanjšalo tveganje okužbe s HPV in s tem tudi nastanek GB (56). V nedavni metaanalizi 20 raziskav so ugotovili, da ni trdnih dokazov, da uporaba kondoma zmanjšuje tveganje za okužbo s HPV, je pa



nekoliko manjše tveganje za GB, CIN II ali CIN III in raka materničnega vratu (62). Pri analnih odnosih je poleg kondoma pomembna tudi uporaba lubrikantov, ki nekoliko zmanjšajo trenje in poškodbo sluznice, kar nekoliko zmanjša možnost prenosa HPV.

Raka materničnega vratu in druge s HPV povezane bolezni bi najlažje, podobno kot pri nekaterih drugih virusnih okužbah, preprečili oziroma zdravili z uporabo cepiv. Za zdaj so najbolj obetavna profilaktična cepiva, ki temeljijo na cepljenju s t. i. virusom podobnimi delci (VLP, *angl. virus like particles*) in spodbujajo nastanek protitelesnega imunskega odziva oziroma protiteles, usmerjenih proti mali (anti-L2) in veliki (anti-L1) plaščni beljakovini HPV (63). Nastala nevtralizirajoča protitelesa anti-L1 in anti-L2 razreda IgG se izločajo iz seruma v sluznični matriks in preprečujejo vstop HPV v gostiteljsko celico. Protitelesa so značilna za genotip HPV (64).

S terapevtskimi cepivi naj bi v prihodnosti dosegli eradikacijo oz. vsaj omejili ali upočasnili razvoj novotvorb, povzročenih s HPV. V nasprotju s profilaktičnimi cepivi terapevtska cepiva spodbujajo nastanek celičnega imunskega odziva in citotoksičnih limfocitov T, ki prepoznajo in uničijo s HPV okužene celice, vključno s tumorskimi celicami. Terapevtska cepiva so usmerjena proti antigenskim determinantom zgodnjih virusnih beljakovin E2, E6 in E7. Po dosegljivih podatkih nobeno od terapevtskih HPV-cepiv še ni v fazi kliničnega preizkušanja (63, 64).

V zadnjih petih letih je bilo izvedenih nekaj raziskav, v katerih so preverjali učinek profilaktičnih cepiv L1 VLP na zmanjšanje incidence in perzistence okužb s HPV oziroma pojavljanja bolezni, ki jih povzročajo različni genotipi HPV. Koutsky in sodelavci so leta 2002 objavili rezultate prve dvojno slepe, s placebom kontrolirane randomizirane študije profilaktičnega cepiva HPV (65). V študijo je bilo vključenih 2392 žensk, starih od 16 do 22 let, ki so prejele tri odmerke placeba ali cepiva, ki je vsebovalo L1 VLP HPV-16. Preiskovanke so spremljali povprečno 17,4 meseca po cepljenju. Nobena izmed cepljenih žensk v opazovanem obdobju ni razvila perzistentne okužbe s HPV-16, tudi ne s HPV-16 povezane CIN (65). V raziskavi Harperjeve in sodelavcev, objavljeni leta 2004, so uporabili dvovalentno cepivo L1 VLP proti visokorizičnim genotipoma HPV-16 in HPV-18 (66). V dvojno slepo, s placebom kontrolirano randomizirano študijo so vključili 1113 žensk, starih od 15 do 25 let, ki so prejele tri odmerke placeba ali cepiva. Po 27 mesecih spremljanja so ugotovili, da cepivo proti HPV-16 in HPV-18 učinkovito zmanjša tako incidenco kot perzistenco okužbe, kakor tudi s HPV-16 in HPV-18 povezane CIN (66). Villa in sodelavci so maja 2005 objavili raziskavo o učinkovitosti cepiva, ki poleg L1 VLP visokorizičnih genotipov HPV-16 in HPV-18 vsebuje tudi L1 VLP nizkorizičnih genotipov HPV-6 in HPV-11 (67). V dvojno slepo, s placebom kontrolirano randomizirano študijo je bilo vključenih 552 žensk, ki so prejele po tri odmerke placeba ali cepiva. Ugotovili so, da kvadrivalentno cepivo proti HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18 bistveno zmanjša incidenco okužbe in bolezni, povzročene s HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18 (67). Prednost tega cepiva je v

tem, da je bilo učinkovito tudi pri preprečevanju okužb z genotipi HPV, ki so etiološko povezani z nastankom ploščatoceličnega papiloma grla in genitalnih bradavic.

V naslednjem letu na trgu pričakujemo dve cepivi (trenutno sta v tretji fazi kliničnega preizkušanja): eno dvovalentno proti visokorizičnim HPV-16 in HPV-18 ter eno kvadrivalentno cepivo proti HPV-16, HPV-18 in nizkorizičnim HPV-6 in HPV-11 (63, 64).

Strategija cepljenja s profilaktičnimi cepivi proti HPV za zdaj še ni popolnoma izdelana, prav tako ni znano, katere starostne skupine bodo vključene v cepilni program in ali bodo cepljeni tako dečki kot tudi deklice (64). Glavni pomisleki, ki zadevajo uspešno implementacijo profilaktičnih cepiv HPV, so: (i) domnevno visoka cena cepiv; (ii) ali bo z izkoreninjenjem v cepiva zajetih genotipov HPV prišlo do povečanja incidence okužb in bolezni, povzročenih s trenutno manj razširjenim genotipi HPV; (iii) ali bo cepljenje negativno vplivalo na učinkovitost obstoječih presejalnih programov za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu, ki temeljijo na citologiji; (iv) ali bo cepljenje zaradi lažnega občutka varnosti vplivalo na povečanje nezaščitenih spolnih odnosov in tako posredno privedlo do povečanja incidence drugih spolno prenosljivih okužb; in (v) kako se bo cepljenje izvajalo v državah v razvoju (63, 64, 68, 69).

## Viri

- zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-F78.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 1994; 37: 143-9.
- Bosch FX, Rohan T, Schneider A, et al. Papilloma research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol* 2001; 54: 163-75.
- Ledwaba T, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. *Biol Chem* 2004; 385: 671-82.
- Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J* 1993; 7: 872-9.
- Summersgill FK, Smith EM, Kirchner LH, Haugen TH, Turek LP. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 334-9.
- Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2005; 79: 6732-40.
- Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89: 213-28.
- Blachon S, Demeret C. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* 2003; 85: 813-9.
- McGlennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* 2000; 20: 383-405.



12. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, et al. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *J Virol* 2005; 79: 6565–9.
13. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170: 1077–85.
14. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 1–12.
15. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–27.
16. Poljak M, Seme K, Gale N. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Adv Anatomic Pathol* 1998; 5: 216–34.
17. Schneider A. Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirol* 1994; 37: 201–14.
18. de Villiers EM. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 2001; 12: 57–64.
19. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 1991; 254: 1167–73.
20. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005; 32: S25–S33.
21. Partridge M, Kiguwa S, Emilion G, Pateromichelakis S, A'Hern R, Langdon JD. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 45–55.
22. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 362–72.
23. Loinjon M, Drobetsky EA. The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis* 2002; 23: 35–45.
24. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109: 157–62.
25. Gravitt PE, Manos MM. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Lab Anim Sci* 1993; 43: 5–10.
26. Southern EM. Detection of specific DNA sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503–17.
27. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974; 13: 650–6.
28. Brandsma JL, Burk RD, Lancaster WD, Pfister H, Schiffman MH. Inter-laboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 1989; 43: 260–2.
29. Nuovo GJ, Richart RM. A comparison of slot blot, Southern blot, and in situ hybridization analyses for human papillomavirus DNA in genital tract lesions. *Obstet Gynecol* 1989; 74: 673–8.
30. Krigman HR, Terrell W, Hulette CM. A comparison of commercially available probes for in situ hybridization to human papillomavirus DNA. *Mod Pathol* 1994; 7: 734–40.
31. Poljak M, Brenčič A, Seme K, Vince A, Marin IJ. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 796–7.
32. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high risk cocktail. *J Clin Virol* 2002; 25: S89–S97.
33. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo - nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
34. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of the polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209–15.
35. Poljak M, Seme K. Rapid detection and typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 1996; 56: 231–8.
36. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2508–17.
37. Coutlée F, Gravitt P, Richardson H, et al. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1852–7.
38. Kocjan BJ, Poljak M, Seme K, Potočnik M, Fujs K, Babič DZ. Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 255–9.
39. Uršič-Vrščaj M, Poljak M. Voznik ali sopotnik? Pomen okužbe s humanimi virusi papiloma v etiologiji nekaterih novotvorb pri človeku. *Zdrav Vestn* 1995; 64: 223–8.
40. Smrkolj S, Rakar S, Možina A, Eržen M. Evaluation of causes of increased incidence of cervical cancer in Slovenia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117: 213–21.
41. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244–65.
42. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796–02.
43. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12–9.
44. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111: 278–85.
45. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958–64.
46. Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20–5.
47. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 339: 423–8.
48. Cuschieri KS, Cubie HA. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virol* 2005; 32: S34–S42.
49. Kambič V, Gale N. Epithelial hyperplastic lesions of the larynx. Amsterdam: Elsevier, 1995: 1–265.

50. Gale N, Poljak M, Kambič V, Ferluga D, Fischinger J. Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathologic, and clinical evaluation. *Virchows Arch* 1994; 425: 291–5.
51. Rimell F, Maisel R, Dayton V. In situ hybridization and laryngeal papillomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101: 119–26.
52. Chang F, Wang L, Syrjanen S, Syrjanen K. Human papillomavirus infections in the respiratory tract. *Am J Otolaryngol* 1992; 13: 210–25.
53. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115: 621–5.
54. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3–8.
55. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3316–22.
56. Wen LM, Estcourt CS, Simpson JM, Mindel A. Risk factors for the acquisition of genital warts: are condoms protective? *Sex Transm Infect* 1999; 75: 312–6.
57. Centers for Disease Control and Prevention. 1998 guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47:1–111.
58. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; 36: 794.
59. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int J Cancer* 1980; 25: 605–9.
60. de Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* 1981; 40: 932–5.
61. Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193: 35–44.
62. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 725–35.
63. Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 2005; 10: 528–38.
64. Schiller JT, Davies P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 343–7.
65. Koutsky L, Ault AK, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347: 1645–51.
66. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1757–65.
67. Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 271–8.
68. Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19: 439–58.
69. Youde SJ, McCarthy CM, Thomas KJ, Smith KL, Man S. Cross-typic specificity and immunotherapeutic potential of a human HPV16 E7-specific CTL line. *Int J Cancer* 2005; 114: 606–12.