

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**A HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS INFEKCIÓK
EPIDEMIOLÓGIÁJA ÉS PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE**

Dr. Sápy Tamás

Témavezető: Dr. Hernádi Zoltán

DEBRECENI EGYETEM

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Nőgyógyászati Onkológiai Tanszék

2007.

A doktori értekezés impresszuma

**A HUMÁN PAPILOMAVÍRUS INFEKCIÓK EPIDEMIOLÓGIÁJA ÉS
PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a *nőgyógyászati onkológia* tudományágban

Írta: Dr. Sápy Tamás

Készült a Debreceni Egyetem *Klinikai orvostudományok* doktori iskolája
(*Epidemiológiai és klinikai epidemiológiai kutatások* programja) keretében

Témavezető: Dr. Hernádi Zoltán

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Dr.

Tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 2007.....

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

Elnök: Dr.

Tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2007.....

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
A humán papillomavírus infekció frekvencia földrajzi eloszlása	8
A HPV fertőzés prevalenciája pozitív citológiai eredmény és méhnyakrák esetén	9
A HPV infekció típus-specifikus megoszlása és korrelációja a szövettani elváltozások típusával	9
A humán papillomavírus fertőzés koreloszlása	10
A HPV fertőzés és az általa okozott CIN lehetséges kimenetele	12
A profilaxis legjobb módszere a vakcináció	12
HPV kimutatás méhnyakrákban és annak prognosztikai szerepe	13
A HPV fertőzés a nyirokcsomókban – lehetséges prognosztikai faktor	14
A HPV-DNS kimutatására alkalmas módszerek	15
CÉLKITŰZÉSEK	17
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	18
Betegcsoportok	18
HPV genotipizálás	19
Eredmények interpretálása, statisztikai analízis	21
EREDMÉNYEK	23
HPV prevalencia pozitív kolposzkópos és/vagy citológia eredményű pácienseknél	23
A HPV-pozitív nyirokcsomók prognosztikai szerepe	27
A HCT teszt klinikai alkalmazhatóságának vizsgálata HPV infekcióban	27
MEGBESZÉLÉS	32
ÖSSZEFOGLALÁS	37
IRODALOMJEGYZÉK	39
KÖZLEMÉNYEK	50
ELŐADÁSOK, POSZTEREK	53
TÁRGYSZAVAK	56
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	57
FÜGGELÉK	58

RÖVIDÍTÉSEK

ASCUS	atypical squamous cells of unknown significance (ismeretlen jelentőségű laphámsejt atypia)
bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
CIN	cervicalis intraepithelialis neoplasia, dysplasia
	CIN I enyhe fokú dysplasia
	CIN II közepes fokú dysplasia
	CIN III súlyos fokú dysplasia
FDA	Food and Drug Administration (Élelmiszer- és Gyógyszerhatóság, USA)
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics (Nemzetközi Szülészeti és Nőgyógyászati Szövetség)
HCT	Hybrid Capture Test (hibridizációs teszt)
HPV	humán papillomavírus
	LR-HPV alacsony kockázatú human papillomavírus
	HR-HPV magas kockázatú human papillomavírus
HPV clearance	a HPV perzisztálási ideje (az első pozitív, majd első negatív HPV teszt ideje közötti különbség)
ICC	invasive cervix carcinoma (invazív méhnyakrák)
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz lánreakció
	RT-PCR reverz transzkripciót követő PCR
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus)
RLU	relative light unit (relatív fényegység)
RLU/PC	RLU, pozitív kontrollhoz viszonyítva
SIL	squamous intraepithelial lesion
	LG-SIL enyhe fokú intraepithelialis laphám elváltozás
	HG-SIL súlyos fokú intraepithelialis laphám elváltozás
STD	szexuális úton átvihető betegségek

BEVEZETÉS

A méhnyakrák az egyik leggyakoribb nőgyógyászati daganat. A nőknél felfedezett malignomák 15%-a *cervix carcinoma*, amely az emlőrák után incidenciájában és mortalitásában a második leggyakoribb női malignus tumor (Munoz és mtsai, 1989).

Magyarországon a „hagyományos” méhnyakrákszűrés a *portio vaginalis cervicis uteri* kolposzkópos (binokuláris nagyító és reflektor kombinációja) megtekintését és az onnan exfoliált sejtek mikroszkópos értékelését (citológiai vizsgálat) foglalja magába, a hazai nőgyógyászat kialakulása szempontjából meghatározó jelentőségű „német iskola” hagyományai szerint. Az angolszász országokban ugyanakkor a *cervix carcinoma* primer szűrése citológiai vizsgálattal történik, a kolposzkópot a kiszűrt esetek értékelésére használva. Annak ellenére, hogy gyakorlatilag 100%-ban szűrhető malignomáról van szó, a megbízható szűrőmódszer birtokában, továbbá, hogy a rákmegelőző állapotok (CIN: *cervicalis intraepithelialis neoplasia*) kialakulásához, majd a malignus transzformációhoz legtöbbször egy évtized szükséges, még napjainkban is évente kb. 2600 új hazai méhnyakrákos esetet regisztrálunk. Világszerte a méhnyakrák incidenciája 500.000 új eset/év. További kedvezőtlen adat, hogy míg a '70-es években a betegségben szenvedők átlagéletkora 54 év volt, addig ez a kor a '90-es évek végére 10 évvel korábbra tolódott, és a 35 év alatti populációban megkétszereződött a morbiditás.

Az etiológiai tényezők szerepét tanulmányozva, a korábban ismert faktorok (korai életkorban elkezdett nemi élet, promiszkuitás, multiparitás, rossz szocio-ekonomiai helyzet, dohányzás, orális antikoncipiens szedés, immunszupprimált állapot, antioxidánsok hiánya) (Bosch és mtsai, 1992; Nyirjesy és mtsai, 1994) mellett új rizikó faktorok szerepére terelődött a kutatók figyelmé. Az ez irányban végzett megfigyelések irányították az érdeklődést a szexuálisan átvihető vírusok onkogén szerepére. Kezdetben a HSV-II (*Herpes simplex vírus*, 2-es típus), majd mind inkább a *humán papillomavírus* (HPV) került a kutatások fókuszába (Munoz és mtsai, 1992; Schiffman és mtsai, 1993; Walboomers és mtsai, 1999; Bosch és mtsai, 2002; Lorincz és mtsai, 2002).

Mai ismereteink szerint a HPV fertőzés, valamint a fent említett etiológiai faktorok, mint kofaktorok együttesen felelősek a *cervix carcinoma* kialakulásáért.

1956-ban Koss és Durfee írta le a *koilocytosist*, mint a HPV-re patognomikus citológiai elváltozást, és 1977-ben Meisels és zur Hausen egyidőben vetette fel, hogy a méhnyakrák és rákmegelőző állapotainak kialakulása HPV infekció következménye lehet. Azóta számos közlés jelent meg a papillomavírusoknak a méhnyakrák kialakulását indukáló hatása és a

vírusnak a betegség progressziójában játszott szerepe vonatkozásában (Barnes és mtsai, 1988; Munoz és mtsai, 1992; Baay és mtsai, 1997; Franco és mtsai, 1999; Ferenczy és mtsai, 2003; Chan és mtsai, 2005; Lukaszuk és mtsai, 2007).

A humán papillomavírusok a *Papillomaviridae* családba tartozó, 8000 bázispárt magában foglaló spirális, cirkuláris kettősszálú DNS genomot tartalmazó, kb. 55 nm átmérőjű, kis vírusok.

A HPV különböző típusai nagy affinitással és specificitással fertőzik meg a bőr és nyálkahártyák hámsajtjeit. Életciklusukra jellemző, hogy szaporodni csak a hám legfelső rétegeiben (*stratum granulosum* és *stratum corneum*) képesek.

A humán papillomavírusok elsősorban szexuális érintkezéssel terjednek. Becslések szerint a szexuálisan aktív nők 30-70%-a életük során HPV fertőzésen esik át (Bosch és mtsai, 2003; Kónya, 2006). Azonban nemcsak szexuális partnerek fertőzhetik egymást, hanem a magzat a szülőcsatornán való áthaladás közben is fertőződhet. A HPV-6 vagy HPV-11 pozitív anya újszülöttjében gégepapillomatosis fejlődhet ki.

A HPV-nek napjainkban több mint száz genotípusa ismert (Stoler és mtsai, 2000), amelyek közül több mint 30 a női genitális régióban is kimutatható (Dupuy és mtsai, 1999).

Kóroktani szempontból, azaz azt vizsgálva, hogy a vírusfertőzés jelenlétével párhuzamosan milyen valószínűséggel számíthatunk *cervix carcinoma* kialakulására, két csoportot különböztetünk meg: 1., *Alacsony kockázatú* (6-, 11-, 42-, 43-, 44-es) és 2., *Magas kockázatú* (16-, 18-, 31-, 33-, 35-, 39-, 45-, 51-, 52-, 56-, 58-, 59-, és 68-as) HPV típusokat. Molekuláris biológiai szempontból jellemző a különböző típusú HPV infekciókra, hogy míg alacsony kockázatú vírusfertőzés esetén a vírus DNS a gazdasejti genomtól függetlenül epizómaként van jelen a sejtekben, addig magas kockázatú HPV fertőzés esetén a vírusfehérjék expressziójának finom szabályozása sérülhet, amikor a vírus DNS beépül a gazdasejti genomba vagy a virális promotor deléció szenved (Veress és mtsai, 2001). A transzkripció kontroll megszűnésével a vírus onkogén hatása szabadon érvényesülhet. Ezen viselkedésük alapján érthető meg a különböző vírustípusok által okozott infekciók klinikai megjelenése is. Az alacsony kockázatú HPV-k jellemzően *condyloma acuminatum*-ban fordulnak elő, a magas kockázatú HPV-k a méhnyak rákmegelőző állapotokban (CIN I, II, III, CIS) és még gyakrabban méhnyakrákban (ICC) mutathatók ki, a vizsgálóeljárás érzékenységétől bizonyos mértékben függően, de gyakorlatilag 100%-ban.

A humán papillomavírusok onkogén hatása elsősorban a vírus DNS E6 és E7 gének által kódolt, majd replikálódott, ún. „korai fehérjék” útján valósul meg, amelyek a gazda-sejti

genom tumor szuppresszor génjeinek termékeivel, a p53 és pRb fehérjékkel komplexeket képeznek, így inaktíválva azok működését.

Ugyanakkor nem minden magas kockázatú HPV fertőzés vezet *cervix carcinoma* kialakuláshoz. Ez csak akkor következik be – mai ismereteink szerint, - ha a vírus-fertőzés perzisztál (Gallo és mtsai, 2003), és ott bizonyos kofaktorok hatására szomatikus mutáció történik, majd génamplifikációs lépések révén a folyamat a *carcinogenesis* útjára lép, a sejt *immortalizálódik*.

A HPV fertőzések prevalenciája a földrajzi hely és az életkor vonatkozásában változatos eloszlást mutat. Ugyanakkor meghatározóan fontos a HPV geográfiai, etnikai és kor szerinti megoszlásának ismerete az optimális és hatékony prevenciós stratégiák kidolgozásához, akár szűrés, akár vakcináció céljából. A magyarországi HPV prevalenciáról még napjainkban is csak kevés tanulmányból tájékozódhatunk, viszont számos adat szerint a HPV okozta infekció, mint a leggyakoribb STD veendő számításba hazánkban is. Mivel a fertőzés gyakori, ugyanakkor a *cervix carcinoma* előfordulása relatíve ritkább (Hildesheim, 1994; Ho és mtsai, 1998), felvetődik annak a kérdése, hogy mikor indokolt pozitív HPV lelet esetén az ún. magas kockázatú populációba sorolás, és mindez mennyiben emeli majd a szűrés hatékonyságát és a kiszűrt esetekben, mennyiben segíti a terápiás terv felállítását. Számos szerző szükségesnek és költség-hatékonynak tartja a HPV vizsgálatok beillesztését a „szekunder” szűrés gyakorlatába, és felveti annak lehetőségét, hogy a primer szűrésben is mérlegelni kellene szerepét (Kónya, 2006). Amennyiben indokolt a HPV tipizálás beépítése a szűrés gyakorlatába –amit egyre több adat támaszt alá-, annak mindenképpen meg kell felelnie a szűrő módszerekkel szemben támasztott kritériumoknak. Miután a klasszikus méhnyakrákszűrési módszerek kiegészítésre kerülnek a HPV meghatározás, majd -tipizálás révén (szekunder prevenció), reális lehetőség vetődik fel a másik prevenciós alternatíva (primer prevenció), a vakcináció racionális tervezésére, a rendelkezésre álló epidemiológiai adatokra alapozva.

Nagszámú tanulmány értékeli továbbá az igazolt és kezelt méhnyakrákban a HPV prognosztikai szerepét. Nincsenek ugyanakkor egyértelmű adatok a primer tumor HPV típusa és a nyirokcsomók HPV státusza, mint prognosztikai faktorok tekintetében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A humán papillomavírus fertőzés frekvencia földrajzi eloszlása

A HPV fertőzés frekvenciájára vonatkozóan földrészenként eltérő adatokat találunk, a vizsgált populáció kor- és etnikai csoportjai és egyéb kockázati tényezők szerint. (Becker és mtsai, 1991; Hildesheim és mtsai, 1993; Wheeler és mtsai, 1993).

A közép- és dél-amerikai országokban magasabb HPV fertőzöttségi mutatókat jeleztek, mint Európában vagy Ázsiában. Chilében 14,0- (Herrero és mtsai, 2000), Mexikóban 14,5- (Lazcano és mtsai, 2001), Costa Ricában 16,5- (Herrero és mtsai, 2000), Kolumbiában 14,8%-os (Molano és mtsai, 2002) HPV prevalenciát regisztráltak. Az európai országok közül Görögországban 2,5- (Agorastos és mtsai, 2004), Spanyolországban 3,0- (Sanjose és mtsai, 2003), Hollandiában 4,6% (Jacobs és mtsai, 2000), az ázsiai országok közül Tájföldön 6,3- (Sukvirach és mtsai, 2003), Vietnamban 10,9% (Pham és mtsai, 2003) vírus-frekvenciát jeleztek. Kirívóan magas, 59%-os HPV előfordulásról (Meulen és mtsai, 1992) számoltak be Tanzániából (Kelet-Afrika).

Sanjose és mtsai (2007) a Lancet-ben közölték 10 év alatt született 78 tanulmány meta-analízisét. Összességében 157.879 nő HPV prevalenciás adatait dolgozták fel, földrészenként elemezve az előfordulási adatokat, negatív citológia esetén. Afrikában 22,1-, Közép-Amerikában 20,4-, Észak-Amerikában 11,3-, Európában 8,1- és Ázsiában 8,0% HPV prevalenciát észleltek.

Különleges szubpopuláció, a HIV fertőzöttek csoportját tanulmányozva Clifford és mtsai (2006) 36,3%-os HPV frekvenciáról számoltak be, és ezek egyharmada (11,9%) kevert HPV fertőzést hordozott. Magas kockázatú populációt, a prostituáltakat vizsgálva Kubota és mtsai (1999) 47,5%-os HPV fertőzöttséget észleltek, szemben a kontroll csoport 5,3%-os adatával. Egy ausztráliai tanulmányban, melyben a bennszülöttek közötti HPV előfordulást kutatták, 42%-os prevalenciát diagnosztizáltak, és ez az előfordulás az életkorral szignifikánsan csökkent (Bowden és mtsai, 1999).

A legjelentősebb adat a magyarországi HPV fertőzés előfordulásáról Deák és mtsai-nak (1999) tanulmánya. Multicentrikus adatgyűjtésük során 17,4%-os HPV prevalenciát észleltek, melyből 3,95% LR-, 10,1% HR- és 3,4% kevert jellegű HPV fertőzés volt. A legmagasabb HPV frekvenciát 17-22 éves kor között regisztráltak.

A HPV fertőzés prevalenciája pozitív citológiai eredmény és méhnyakrák esetén

A kóros citológiai lelettel társultan – szemben az átlagpopulációval – jóval nagyobb HPV infekciós frekvencia mutatható ki. Cseh szerzők adatai szerint negatív citológiai eredmény mellett 23%, LG-SIL esetén 53%, HG-SIL esetén 58%, míg ICC esetén 74%-os HPV előfordulást észleltek (Tachezy és mtsai, 1999). Indiai multicentrikus tanulmányban ICC esetén 75%, SIL esetén 18,8-25,7%, míg negatív citológia esetén 6,7-11,6% HPV frekvencia volt kimutatható (Laikangbam és mtsai, 2007). Adam és mtsai (2000) nagy beteganyagban végzett tanulmányukban, amelybe olyan pácienseket vontak be, akiknél a SIL valamelyik fokozatát találták, 66%-os HPV infekciós rátát észleltek. Megerősítették az életkor előrehaladtával észlelhető HPV infekciós prevalencia és LGSIL gyakoriság szignifikáns csökkenését és a HGSIL szignifikáns gyakoribb előfordulását. Chen és mtsai (2006) ASCUS/AGUS esetén 38,3-, LG-SIL esetén 74,9-, HG-SIL esetén 84,3- és invazív *cervix carcinoma* esetén 100% fertőzési rátát regisztráltak. Clifford és mtsai (2005) LG-SIL esetén Európában 70-, Észak-Amerikában 80% HPV prevalenciát írtak le, és megjegyzik, hogy a különbség a LG-SIL definíció különbségből is adódhat. Bao és mtsai (2007) több ezres beteganyagban LG-SIL, HG-SIL és invazív méhnyakrák esetén 72,9-, 81,0- és 85,9%-ban ki tudták mutatni a HPV infekciót.

A HPV infekció típus-specifikus megoszlása és korrelációja a szövettani elváltozások típusával

A HPV típusok gyakoriság szerinti megoszlását elemezve földrészenként változó adatokról tájékozódhatunk, de majdnem mindegyik tanulmány megegyezik a HPV-16 és -18 dominanciájában. Bosch és mtsai (1995) felmérése szerint a HPV-16 felelős a HPV fertőzések 50-60%-ért és a *cervix carcinoma* 50%-ért. Egy kínai tanulmányban a típusok szerinti gyakorisági sorrend: HPV-16, -18, -58, -33, -52, -45, -31 és -35, és a két leggyakoribb típus, a HPV-16 és -18 az esetek 66,9%-ban volt kimutatható. (Bao és mtsai, 2007). Clifford és mtsai (2003) meta-analízis értekezésükben 10.058 ICC-s beteg HPV tipizálás adatait dolgozták fel, és az előfordulási gyakorisági sorrendet a következőben állapították meg: HPV-16 (63%), -18 (14%), -45 (8%), -31 (7%) és -33 (5%). Megjegyzik ugyanakkor, hogy egyedül Ázsiában észlelték két mérsékelten gyakori előfordulású típus viszonylag nagyobb infekciós arányát, és ez a HPV-58 (6%) és -52 (4%) volt (Clifford és mtsai, 2003). Egy másik meta-analízis tanulmány szerint, melyben ICC (n=14.595) és HG-SIL (n=7.094) eseteket vizsgáltak, a

frekvencia sorrend a következő volt: HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -52 és -58 (Smith és mtsai, 2007). A legmagasabb HPV-18 prevalenciát ICC esetén Indonéziából jelentették, ahol ezt 39%-nak találták, ugyanakkor HPV-16 típust 44%, HPV-52-t 14%-ban regisztráltak (Schellekens és mtsai, 2004). ICC esetén Európában, Észak-Amerikában és Ausztráliában 74-77%-os HPV-16/18 dominanciát észleltek, míg Afrikában, Ázsiában és Dél/Közép-Amerikában ez 65-70%-nak adódott. Mexikói munkacsoport negatív citológia mellett végzett HPV tipizálásokat, és HPV-16, -53, -31 és -18 gyakorisági sorrendet állapítottak meg (Lazcano és mtsai, 2001).

ICC-ban számos tanulmány vizsgálta a szövettani típusok és a speciális HPV típus közötti korrelációt. Elsőként Tase és mtsai (1988) és Wilczynski és mtsai (1988) írták le, majd Bosch és mtsai (1995) megerősítették a gyanút, hogy *adeno- vagy adenosquamosus carcinoma* szövettani diagnózis esetén a HPV-18 szignifikánsan gyakrabban fordul elő, mint az egyébként a *planocellularis cervix carcinomában* domináns HPV-16. Egy évtizeddel később, észak-amerikai tanulmányban ugyanezt a megállapítást tették, hangsúlyozva, hogy *planocellularis carcinomában* szignifikánsan gyakoribb előfordulású a HPV-16, -31, -52 és -58 típusok (Smith és mtsai, 2007).

A humán papillomavírus fertőzés korelációja

A HPV prevalencia korfüggő (Melkert és mtsai, 1993; Herrero és mtsai, 1997; Sellors és mtsai, 2000), ugyanakkor ez a vírus– különösen fiatal nők esetén – más STD-vel, így gyakran *Chlamydia trachomatis*-szal vagy *Herpes simplex II*-vel társultan fordul elő (Sellors és mtsai, 1992; Munoz és mtsai, 1996). Számos keresztmetszeti tanulmányban vizsgálták normál citológiájú páciensek körében a HPV infekció előfordulását. A szexuálisan aktívak körében 20-40%-ban észleltek HPV fertőzést (Bauer és mtsai, 1993; Melkert és mtsai, 1993). Több éves prospektív klinikai vizsgálat során egyetemista lányokat rendszeresen vizsgálva, a kumulatív, 36 hónapos HPV incidenciát 43%-nak találták (Ho és mtsai, 1998).

Bauer és mtsai (1993) negatív citológiai eredmény mellett 17,7%-os HPV prevalenciát észleltek, és kimutatták a vírusfertőzés szignifikáns összefüggését a fiatalabb életkorral és a szexuális partnerek számával. További egyértelmű összefüggést találtak az iskolai végzettség alacsonyabb voltával, a kevesebb jövedelemmel rendelkezőkkel, a szexuális élet korai kezdetével, az orális antikonceptívumok használatával és a dohányzással (Schiffman és mtsai, 1993; Remmink és mtsai, 1995). Tovább bizonyítva a különböző egyéb kockázati tényezők szerepét Munoz és mtsai (1996) a HPV fertőzés legfontosabb kockázati tényezőinek a

szexuális partnerek nagy számát, a rosszabb gazdasági helyzetet és a fiatal korban elkezdett nemi életet jelölték meg.

A HPV prevalencia csúcs – a tanulmányok zömében – a 20-30. életév között észlelhető, majd minden HPV típus esetén lineáris csökkenést mutat a kor előrehaladtával (Melkert és mtsai, 1993; Veress és mtsai, 1994, Munoz és mtsai, 1996; Sellors és mtsai, 2000).

A korról párhuzamosan észlelhető lineáris HPV prevalencia csökkenéssel szemben, Herrero és Franceschi és mtsai (2000; 2006) Közép-Amerikában nemcsak a 25 éves, de az 55 éves korcsoportban is egy-egy HPV prevalencia csúcst írtak le. Ezzel párhuzamosan a HG-SIL prevalenciája is emelkedett a 30- és 65 éves korosztálynál egyaránt. Figyelembe véve a két korcsoportnál is észlelhető előfordulási csúcst, ún. U-alakú HPV prevalencia görbét jeleztek. A számos ennek ellentmondó tanulmány megállapításait mérlegelve és figyelembe véve azt a tényt, hogy a Herrero-féle vizsgálat során a 65 év felettiek 41%-át kizárták a tanulmányból, arra kell gondolnunk, hogy a második prevalencia csúcs csak melléktermék lehet, és nem tükrözi hűen az adott populáció HPV infekciós mutatóit. Sellors és mtsai (2000) a Herrero vizsgálat egyik interpretációs lehetőségének azt tartják, hogy a HPV infekció látens formában idős korban is megmaradhat, hasonlóan a *Herpes zooster*-fertőzéshez. Egyébként maga Herrero és mtsai is felvetik annak a lehetőségét, hogy az irodalmi adatokkal merőben szemben álló eredményeik esetleg egy későbbi életkorban észlelhető re-infekciónak tudhatók be.

A HPV okozta elváltozások (condyloma acuminatum, CIN, cervix carcinoma) gyakoribb előfordulása immunszupprimált, transzplantált betegeknél és HIV fertőzötteknél (Hankins és mtsai, 1999) erősíti azt a hipotézist, hogy számos embernél a HPV fertőzés látens fertőzésként idősebb életkorban is jelen lehet.

Melkert és mtsai (1993) foglalkoztak először a tranziens HPV fertőzés fogalmával. Az a tény, hogy a korról a HPV prevalencia fordított arányban változik, megerősíti azt a korábbi feltételezést, hogy a fiatal korban észlelhető HPV fertőzések nagy része *transziens fertőzés*, köszönhetően az immunrendszer felügyelte *HPV clearance*-nek. Evander és mtsai (1995) a 35 év alatti korosztályban a HPV fertőzés regresszióját (HPV clearance) 80%-nak találták. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a ténnyel, hogy a szexuálisan aktívabb „huszonévesek” körében nagyobb százalékban találjuk meg e szexuális úton átvihető fertőzést. Ugyanakkor felhívja a figyelmet arra, hogy a magasabb perzisztencia kockázat miatt a 35 évnél idősebbeknél előforduló HPV fertőzés esetén fokozott onkológiai éberségre van szükség.

Hasonló megfigyelést tettek más szerzők is, akik megállapították, hogy annak a valószínűsége, hogy egy fiatal, szexuálisan aktív nő hordozza a HPV-t, igen nagy, ugyanakkor a többségük mintegy 1-2 év alatt vírus-negatív lesz (Koutsky és mtsai, 1992; Ho és mtsai, 1998). Ugyanakkor Hopman és mtsai (2000) azt a megfigyelésüket közölték, hogy a perzisztáló HPV infekció mellett szignifikánsan nagyobb a kockázata annak, hogy kóros citológiai és kolposzkópos leletünk szülessen az elkövetkezőkben.

A HPV fertőzés és az általa okozott CIN lehetséges kimenetele

Prospektív, kohorsz vizsgálatokban a CIN elváltozások három kimeneteli lehetőségét írták le: (a) progresszió, (b) perzisztálás és (c) regresszió, melyek valószínűsége a CIN fokozatától is jelentősen függ (Östor és mtsai, 1993; Syrjanen és mtsai, 2000). Klinikopatológiai vizsgálatok sora igazolta, hogy a humán papillomavírus fertőzés kimenetele a CIN elváltozással párhuzamosan változik (IARC, 1995; Bosch és mtsai, 2002). Ugyanakkor ismert a HPV típusoknak az a tulajdonsága, hogy különböző affinitással képesek cervix carcinomát okozni. Mindezen tulajdonságainak köszönhetően a vírus képes látens fertőzést okozni, amit citológiai vagy hisztológiai vizsgálat során nem észlelünk (IARC, 1995; Syrjanen, 2000; Bosch és mtsa, 2002). A vírus latens formában hosszú ideig jelen lehet, majd reaktiválódik vagy spontán eliminálódik (Ferenczy és mtsai, 2003). Olyan jellemzői a vírus-fertőzésnek, mint a virális terheltség, felülfertőződés más vírus típusokkal vagy a vírus-clearance, nagyon fontos, csak mostanában közölt, igen fontos rizikótényezői a méhnyak karcinogenezisének (Franco és mtsai, 1999; Giuliano és mtsai, 2002).

A profilaxis legjobb módszere a vakcináció

A HPV profilaktikus vakcinák napjainkban kerültek forgalomba, amelyek közül egyet az egyesült-államokbeli FDA (Food and Drug Administration) is támogat. Történelmileg a vakcinák képviselik a legjobb megoldást a fertőző betegségek megelőzésében, illetve kezelésében. Randomizált, kontrollált tanulmányban 100% körüli hatékonyságát igazolták a vakcinációnak a perzisztáló HPV fertőzés megelőzésében és így a méhnyak rákmegelőző állapotainak kifejlődésében (Franco és mtsai, 2005). A kampányszerű oltásokkal kapcsolatban számos tényező további megfontolást kíván: *a)* Célszerű felmérni a HPV prevalenciát az adott cél-populációban; *b)* Vizsgálatot kíván a ritkább HPV típusok incidenciájának vizsgálata, melyek ellen a jelenleg forgalomban lévő vakcinák nem feltétlenül biztosítanak védelmet; *c)*

A többszörös fertőzések esete mérlegelést igényel; *d)* Felvetődik széles körű vakcináció esetén a szűrőprogramok rendszerének megreformálása; *e)* Szükségszerűnek tűnik a társadalmi elfogadottság megnyerése egy a gyermekkorban ajánlott oltásra, mely a későbbi életkorban fenyegető szexuális fertőzéssel kapcsolatos; *f)* Természetesen felvetődik a költség-haszon kérdés is, vagyis egy drága oltóanyag haszonértékének összevetése a SIL és ICC kezelési költségeivel az adott országban (Pereira és mtsai, 2007).

HPV kimutatás méhnyakrákban és annak prognosztikai szerepe

A méhnyakrák prognosztikai faktorai jól ismertek: a tumor stádiuma; a beteg életkora (klinikai paraméterek); az infiltráció mélysége, a tumor differenciáltsága; a nyirokcsomók státusza (patológiai paraméterek). Ezek közül a nyirokcsomók tumor metasztázisa – mint talán a legfontosabb faktor – az ötéves túlélést mintegy 25-60%-kal csökkenti (Lukaszuk és mtsai, 2007). Nincsenek ugyanakkor egyértelmű adatok a primer tumor HPV típusa és a nyirokcsomók HPV státusza, mint prognosztikai faktorok tekintetében. A PCR szenzitív diagnosztikai módszerének köszönhetően méhnyakrák esetén gyakorlatilag 100%-ban kimutatható valamelyik HPV genotípus jelenléte a primer tumorban. Huang és mtsai (2004) paraffinba ágyazott metszetekből – PCR-rel – a tumorok 98%-ban mutatták ki a HPV-DNS-t. Más megfigyelések szerint a különböző genotípusú HPV-k eltérő prognosztikai potenciált képviselnek méhnyakrákban (Barnes és mtsai, 1988; Walker és mtsai, 1989; Huang és mtsai, 2004).

Néhány genotípusról kimutatott, hogy fertőzésük esetén gyakoribb recidívával és metasztázissal lehet számolni, ezáltal rosszabb prognózist jelentenek. Burger és mtsai (1996) 291 méhnyakrákos beteg primer tumorából és nyirokcsomó preparátumaiból HPV tipizálást végzett és 38,9 hónap medián nyomonkövetés mellett megállapították, hogy a HPV-18 genotípus független prognosztikai faktornak tekinthető, és fertőzése esetén rosszabb kimenetelre lehet számítani *cervix carcinomában*. Az ezzel a genotípussal társultan észlelhető *adenocarcinoma* szövettani típust is szignifikánsnak találta. Az elmúlt években egyre több tanulmány igazolta a HPV-18 fertőzéssel társultan jelentkező „agresszív” méhnyakrák típus előfordulását (Lombard és mtsai, 1998; Schwartz és mtsai, 2001), és ez a megfigyelés még szignifikánsabbnak adódott korai stádiumú rák esetén (1996; Schwartz és mtsai, 2001; Im és mtsai, 2003). Molekulár-biológiai közlésekből tudjuk, hogy a HPV-18-nak ötször nagyobb (Barbosa és mtsai, 1989), más tanulmányok szerint tízszer nagyobb (Villa és mtsai, 1991) transzformáló potenciálja mérhető sejt kultúrákban, mint a HPV-16-nak, ugyanakkor a két

genotípus E6 és E7 onkoprotein termékeit tekintve nincs különbség az immortalizáló aktivitásukban (Romanczuk és mtsai, 1991). Molekuláris biológiai adatok mellett klinikai tanulmányok is felhívták a figyelmet a HPV-18 típus speciális szerepére a méhnyakrák gyors progressziójában. Összehasonlítva a HPV-18 és -16 prevalenciáját a CIN különböző fokozataiban és invazív méhnyakrákban azt találták, hogy míg a HPV-16 mindkét csoportban nagy gyakorisággal volt kimutatható, addig a HPV-18 típus inkább méhnyakrák esetén, ugyanakkor CIN esetében csak jóval kisebb prevalenciát észleltek (Kalantari és mtsai, 1997; Nindl és mtsai, 1999).

Im és mtsai (2003) 144 IB stádiumú *cervix carcinomás* beteg adatainak tanulmányozása során arra a következtetésre jutottak, hogy HPV-18 infekció esetén a nyirokcsomó-metasztázis valószínűsége jóval nagyobb (48%), mint nem HPV-18 fertőzés esetén (28%), és az invázió mélysége is szignifikánsan nagyobb volt az első csoportban. Ennek megfelelően a HPV-18 csoportban kétszer nagyobb valószínűséggel (33%) észleltek tumor recidívát, mint a másik csoportban (16%). Más szerzők nem találtak összefüggést a HPV genotípus és a túlélés között (Rose és mtsai, 1991; Chen és mtsai, 1994). Hagmar és mtsai (1995) HPV-18-, illetve HPV-33 típusal társult méhnyakrákban kedvezőtlenebb prognózisról számoltak be, mint más HPV típusok esetén. Ugyanakkor Lai és mtsai (1999) HPV-58 infekció esetén, illetve Huang és mtsai (2004) HPV-31 infekció esetén kedvezőbb recidívamentes túlélésről számoltak be *cervix carcinomás* betegeknek.

A HPV-18 infekcióval társult tumorokban az esetek zömében *adenocarcinoma* szövettani diagnózist állapítanak meg (Ikenberg és mtsai, 1994; Burger és mtsai, 1996; Im és mtsai, 2003). Benedet és mtsai (2001) multivariáns analízis során észlelték, hogy sem *planocellularis carcinoma*, sem pedig *adenocarcinoma* esetén, korai stádiumban nincs számottevő különbség a túlélési adatokban.

A HPV fertőzés a nyirokcsomókban – lehetséges prognosztikai faktor

A HPV prognosztikai szerepét tovább tanulmányozva, számos közlés látott napvilágot, igazolva, hogy a kismencedei nyirokcsomók HPV státuszának is szerepe lehet a méhnyakrák kórlefolyásában. Lee és mtsai (2007) 57 radikális méheltávolításon átesett beteg *sentinel nyirokcsomóiban* a rutin hisztológiai vizsgálat mellett HPV meghatározást is végzett és a betegeket ezután három évig nyomon követték. Azt találták, hogy a recidivált betegek mindannyian hordozták a HPV-DNS-t a nyirokcsomóikban, ezáltal a HPV-negativitást a nyirokcsomókban negatív prediktív tényezőnek tartották. Lukaszuk és mtsai (2007) 116 *Piver*

III. típusú radikális *hysterectomy* során, prospektív vizsgálatukban azt a megállapítást tették, hogy a predilekciós nyirokcsomók HPV-pozitivitása, a tumor FIGO stádiuma és a primer tumor mérete három független prognosztikai paraméternek tekinthető a betegek túlélésében és a mortalitási kockázat vonatkozásában. Arra a konklúzióra jutottak, hogy a HPV-DNS jelenléte a kismencedei nyirokcsomókban a metasztázis korai jelének tekintendő, és ezt a prognosztikai faktort a kezelési terv felállítása során maximálisan figyelembe kell venni. Korábbi német tanulmányban, nagy beteganyagban (n=223), hosszú nyomonkövetéssel (4,4 átlag év), retrospektív vizsgálat során megállapították, hogy a HPV genom jelenléte a tumormentes nyirokcsomókban korrelációt mutat a tumor-metasztázis valószínűségével (Pilch és mtsai, 2001). Megjegyzik egyúttal, hogy a HPV prognosztikai szerepének vizsgálata hasonló esetekben további vizsgálatokat kíván.

A szakma a téma megítélésében megosztott, így ezzel ellentétes vélemények is napvilágot láttak. Holland munkacsoport – ugyan kis betegszámon és HPV-16 infekció esetén – nem talált összefüggést a hisztopatológiailag tumormentes, de HPV-pozitív nyirokcsomók és a prognózis között (Baay és mtsai, 1997). Egy kínai tanulmányban szintén HPV-16 fertőzés esetén, azt találták, hogy a primer tumorban mérhető virális terheltséggel („viral load”) egyenes arányban észleltek HPV-DNS-t a környéki nyirokcsomókban (Chan és mtsai, 2005). A munkacsoport hasonló következtetést vont le a nyirokcsomók HPV státusza és a prognózis vonatkozásában, mint a Baay és mtsai (1997). Hazai szerzők 150 *cervix carcinomás* beteg (többségük előrehaladott stádiumú! [FIGO IIA-IIIB]) szövet- és vírusmintáit elemezve, arra a következtetésre jutott, hogy a hisztológiai vizsgálattal igazolt metasztázisok jelenléte korrelál a betegség rossz prognózisával, de a HPV-DNS jelenléte azt nem befolyásolja (Füle és mtsai, 2006).

A HPV-DNS kimutatására alkalmas módszerek

A HPV-DNS kimutatására számos diagnosztikai módszert kidolgoztak. Kezdetben a vírusok szerkezetének megismerésével és genomjuk klónozásával specifikus jelölt nukleinsav próbákat hoztak létre. Ezeket radioaktívan jelölték, majd ismeretlen nukleinsav mintákhoz hibridizálták, így pozitív reakció esetén a vírus jelenlétét az adott mintában igazolták. A *blot* kifejezés a DNS izolálást, restrikciós endonukleázokkal történő hasítást és agaróz gélen történő szétválasztást követően nylon- vagy nitrocellulóz-alapú filterre való átjuttatást takar (Southern, 1975). A HPV-DNS hibridizációval (*Southern-blot*) történő kimutatása azonban igen munkaigényes és költséges eljárások. Így a klinikai gyakorlati HPV diagnosztikában nem

terjedtek el. A *dot blot* hibridizációs eljárást HPV kimutatásban először Shirasawa és mtsai (1986) írták le. A filterhibridizációs eljárásokkal egyidőben fejlesztették ki az *in situ* hibridizációs eljárást, ami a vírust szöveti környezetében mutatja ki, általában fluoreszkáló festékekkel jelzett próba segítségével. A hibridizálás hátránya az, hogy nem eléggé érzékeny, és alacsony vírus kópiaszám esetén a módszer nem ad pozitív reakciót. Ezzel szemben a PCR igen szenzitív módszernek bizonyult a HPV genom kimutatására is. Ezzel a módszerrel már akár 5-10 víruskópia is kimutatható. További előnye, hogy nemcsak friss szövetből, de paraffinos metszetekből is (*in situ* módszer esetén is) ki lehet mutatni a vírus DNS-t, így retrospektív vizsgálatok során is sikerrel alkalmazható. Nagy fejlődést jelentett a kvantitatív *real time* PCR rendszerek bevezetése, amely során a PCR amlifikációt hibridizálással kombinálják, ami fluoreszcens jelet hoz létre, aminek erőssége a mintában lévő vírus-DNS-sel arányos. Segítségével a vírusok kópiaszáma egyszerűen és pontosan meghatározható. A módszerrel a szenzitivitás mellett a specificitást is fokozni lehetett. További nagy várakozás fűződött az *in situ* PCR bevezetéséhez (Nuovo és mtsai, 1991), ami a vírusfertőzés lokalizációját és kiterjedését is jelzi. Sajnos az eljárás meglehetősen nehézkes, így a HPV diagnosztikában nem terjedt el. A *consensus* PCR-t követően végzett *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) módszert, majd azt követő nukleotid szekvenálást Bernard és mtsai (1994) alkalmazták először a HPV diagnosztikában. Aztán 1995-ben forgalomba került az *in vitro* alkalmazható *Hybrid Capture* teszt (Cox és mtsai, 1995), melynek szenzitivitását CIN I és II lézióban 93%-nak találták, szemben az ismételt citológiai vizsgálat 73%-ával. Később ez a viszonylag egyszerű, jelamplifikációs elven alapuló HPV kimutatási módszer mint HCT I, majd HC II (98% szenzitivitás) a legszélesebb körben elterjedt módszer lett. Ma az USA-ban a HC II az egyetlen az FDA által támogatott HPV diagnosztikai eljárás. Az egyszerűsége és költséghatékonysága mellett az szól a Hybrid Capture teszt, mint HPV diagnosztikai módszer mellett – szemben a PCR-rel –, hogy az onkológiai szempontból jelentéktelen, minimális vírusterheltséget nem jelzi, hiszen a jelerősség a *cut off* érték alatti (Lorincz és mtsai, 2002; Gravitt és mtsai, 2003; Schlecht és mtsai, 2003).

CÉLKITŰZÉSEK

A HPV meghatározások helyét keresve a szűrési programban és a nyomonkövetésben protokollokat állítottunk fel, majd prospektív és retrospektív elemzéseket végeztünk.

A DEOEC Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán 1997. január és 2002. december között az összes pozitív kolposzkópos és/vagy citológiai eredmény miatt kontroll vizsgálaton megjelent páciensnél HPV meghatározást végeztünk. Ezt követően a betegeket rendszeres további vizsgálatokra rendeltük, melynek során minden alkalommal ismételt HPV tesztet végeztünk. A klinikai adatok és a virológiai vizsgálatok eredményei alapján a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Korábbi pozitív (gyanús) szűrési eredmény miatt visszarendelt páciensek körében milyen az alacsony- és a magas kockázatú HPV prevalencia?
- A különböző korcsoportokban milyen HPV előfordulási különbségek regisztrálhatók?
- A kor előrehaladtával milyen prevalencia változások észlelhetők?
- A nyomonkövetés során műtétre nem került betegeknél HPV *clearance*-t számoltunk és vizsgáltuk, hogy van-e különbség az életkor függvényében?

Egy másik tanulmányunkban operábilis méhnyakrák miatt indikált Wertheim műtétek primer tumor és nyirokcsomó mintáiban kerestük a HPV jelenlétét.

- Kíváncsiak voltunk, van-e prognosztikai jelentősége a szövettanilag negatív, de HPV-pozitív nyirokcsomóknak?

Harmadik tanulmányunkban a szekunder szűrési programban felhasználható *Hybrid Capture* teszt HPV típus-specifitását PCR-RFLP módszerrel értékeltük.

- Azt vizsgáltuk, hogy a *Hybrid Capture* teszt, mint HPV diagnosztikai módszer megfelel-e a szűrési módszerek kritériumrendszerének?

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegcsoportok

I. A Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 1997. január és 2002. december között 3480 betegnél (medián: 32.00 év, átlag: 34.00 év, SD: 10.56) a rutin kolposzkópos és citológiai cervix carcinoma szűrést HPV meghatározással egészítettük ki. Ezen pácienseknél a korábbi vizsgálatok során pozitív kolposzkópos leletet (Római klasszifikáció, 1990.: II-es csoport) és/vagy pozitív citológiai eredményt (The Bethesda System, 1991.: Atypical Squamous Cell of Unknown Significance, ASCUS; Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LGSIL; High Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HGSIL, esetleg invazív méhnyakrák gyanúja) regisztráltunk.

A vizsgálatok klinikánk ambulanciáin ill. szakrendelésein történtek.

Az onkocitológiai mintavétel után közvetlenül végeztük el a natív cervikális mintavételt a Digene Hybrid Capture® (HCT) mintavevő kittjével, a 3%-os ecetsav használatát igénylő kolposzkópia előtt. A minta gyűjtése – a gyártó ajánlása szerint – a cervix nyakcsatornájából, a *squamocolumnaris junctio* területéből és az *ectocervix* esetleges gyanús elváltozásából történt.

A vírus-tipizálások a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Mikrobiológiai Intézetének Vírus Laboratóriumában történtek.

II. A másik betegcsoportot a méhnyakrákos betegek kórlefolyásának követése során az a 1992. és 1993-ban *hysterectomy radicalis*-ra (Wertheim-műtétre) került 47 beteg képezte, akiknél a rutin hisztológiai értékelés (formalin fixáció és haematoxylin-eosin festés) mellett HPV-típus meghatározás is történt a primer tumorból és a környéki nyirokcsomókból. A méhnyak tumorból és nyirokcsomókból származó biopsziák szárazjégben kerültek az Orvosi Mikrobiológiai Intézetbe, ahol annak Vírus Laborjában történtek a HPV meghatározások.

Az akkori szakmai ajánlásnak megfelelően a műtétet követően csonkbiztosító *intracavitális* (400, 1700 és 1700 reu dózissal) és külső mezőkből végzett tele-kobalt sugárkezelést (20x2 Gy) alkalmaztunk (Miltényi, 1990), standard feltételek mellett. A kombinált kezelést követően a betegeket 3 havonta rendszeres kontroll vizsgálatokra rendeltük vissza.

III. A harmadik betegcsoportban a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán korábban kolposzkópos és/vagy citológiai eltérés miatt szekunder szűrésen megjelent 570 betegnél a HCT mintavevő kittjével a *squamocolumnaris junctio*-ból exfoliált sejteket gyűjtöttünk. A mintákat -20 °C-on tároltuk. A vírus-meghatározások az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben történtek.

HPV genotipizálás

I. A 3480 beteget érintő tanulmányban használt *Digene Hybrid Capture® Tube Test* [HCT I] (Digene Diagnostics, Inc., Beltsville, MD USA) olyan HPV-DNS folyadék hibridizációs módszer, amely szignál amplifikációs, kemilumineszcens detektálási módszert használ fel. A HPV-DNS-t tartalmazó cervicális minták hibridizálódnak a specifikus HPV-RNS-t tartalmazó koktéllal. Az így létrejött DNS-RNS hibridek egy olyan kémcső falához kötődnek, amely anti-DNS-RNS monoklonális ellenanyaggal van bevonva. Ezután a preparátumhoz specifikus alkalikus foszfatázt tartalmazó ellenanyagot, mint konjugátumot adunk. Ezen alkalikus foszfatáz enzim szubsztrátja jelamplifikációs kemilumineszcens mérésre alkalmas. A szubsztrát lehasításával keletkező fényemisszió relatív fényegységben (relative light unit, RLU) – 10 pg/ml HPV-16 DNS pozitív kontrollhoz viszonyítva (RLU/PC) – luminométerben mérhető. A fényemisszió mértéke a mintában lévő vagy hiányzó HPV-DNS-t jelzi. A „cut off” értéknél alacsonyabb érték a HPV-DNS hiányára, míg a „cut off” értékkel megegyező vagy magasabb fényegység a HPV-DNS jelenlétének intenzitására utal. Ezen módszerrel (HCT I) az anogenitális régió 14 HPV típusát lehet tipizálni. [A legújabb típus (HC II) már 18 HPV típus kimutatására alkalmas.] A vizsgálatok során két kombináns RNS próba került alkalmazásra. Az „A” próbában az RNS az alacsony onkogenitású törzsek HPV 6/11/42/43/44 genomjával, míg a közepes és magas onkogenitású törzsek HPV 16/18/31/33/35/45/51/52/56 genomjával a „B” próba hibridizálódik.

Az összes tanulmányba került betegnél a „B” próbával elvégeztük a HR-HPV kimutatást, de az „A” próbával történő LR-HPV tesztet csak 2315 esetben volt módunkban kivitelezni.

A kemilumineszcens meghatározások során kapott RLU/PC érték alapján a HPV-DNS fertőzöttség intenzitását is mérni lehet.

II. Második tanulmányunkban a primer tumorból és regionális nyirokcsomókból a HPV-státusz meghatározását a Polymerase Chain Reaction (PCR) módszerével végeztük. A nőgyógyászati műtőből érkező szárazjéggel gyorsfagyasztott mintákból a DNS izolálás a nemzetközi standardnak megfelelően történt (DN-áz és proteináz emésztés, fenol-kloroform extrakció és etanol precipitáció). Béta-globin génspecifikus PCR-rel igazoltuk a minta humán DNS tartalmát. Az első lépésben a minden mintán (a biopsziákból izolált DNS 1 µg-ját) alkalmazott „consensus primer” (csoportspecifikus) PCR amplifikálta a HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -52 és -58 típusok L1 ORF (open reading frame) mintegy 250 bázispár (bp) régióját, azt 40 ciklusban, automata „thermal cycler” segítségével végezve. Az egyes ciklusok jellemzői: 1,5 perc 95 °C, 1,5 perc 48 °C és 2 perc 70 °C. Az amplifikált produktum tipizálására Dde I, Hae III és Pst I, illetve szükség szerint Rsa I és Xba I restrikciós enzimek kerültek felhasználásra. A „consensus primer” által nem amplifikálódott minták esetén típus-specifikus primerekkel végeztünk amplifikációt (Evander és mtsai, 1991). A primerek tervezése a HPV-16 és -18 típusok E7 ORF-jei 200 és 310 bp-t tartalmazó régióinak megfelelő volt. Az alkalmazott 30 ciklus hőmérsékleti és időtartam jellemzői: 1 perc 95 °C, 1,5 perc 55 °C és 1,5 perc 72 °C. Minden PCR amplifikáció kontrollja megtörtént humán DNS, mint negatív és pozitív kontroll felhasználásával (Yosikava és mtsai, 1991; Czeglédy és mtsai, 1994).

A nyirokcsomókban a HPV-18 E6 mRNS transzkripteket reverz transzkripciót követő PCR-rel (RT-PCR) mutattuk ki.

III. Harmadik tanulmányunkban a cervikális mintákat első lépésben HCT-vel teszteltük. A hibridizációs módszerrel pozitív esetekben PCR amplifikáció történt. A gyorsfagyasztott minták felolvasztását követően a DNS izolálását végeztük el, majd pCO3 és pCO4 primereket használva Béta-globin génspecifikus PCR-t alkalmaztunk (Saiki és mtsai, 1985). 16 esetben az amplifikáció nem sikerült, ezeket kizártuk a további tanulmányból. Az amplifikációt MY09 és MY11 consensus primerekkel végeztük el, 40 ciklusban (Manos és mtsai, 1989). A PCR elegy láthatóvá tételét PolyAcrylamid (5%; acrylamid/bisacrylamid arány 50:1) Gél Elektroforézist (PAGE) követően ezüst-festéssel kiviteleztek. Ezt követően a PCR termékek tipizálására *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) módszert használtunk. AluI, BamHI, DdeI, HaeIII, HinfI és PstI restrikciós enzimek kerültek felhasználásra (Bernard és mtsai, 1994). Az egyszerű PCR restrikciós fragmentumainak elektroforézisét 2%-os agaróz gélen végeztük és a többszörös fertőzést PAGE-val igazoltuk.

Eredmények interpretálása, statisztikai analízis

I. Az epidemiológiai tanulmányban résztvevő betegeket hat korcsoportba (<25 éves, 26-34 éves, 35-44 éves, 45-54 éves, 55-64 éves és >64 éves) soroltuk, majd a HR- és LR-HPV fertőzötteket külön-külön táblázatban feltüntetve, a HPV frekvenciát %-ban ábrázoltuk. A frekvenciákat összevetve esélyhányadosot és 95%-os konfidencia intervallumot számoltunk. A statisztikai analízist az SPSS szoftverrel végeztük.

Azokat a HR-HPV pozitív betegeket (n=433), akinél nem történt szövettani vizsgálat vagy nem veszték el a nyomkövetésből, hathavonta kontrolláltuk és ismételt HPV tipizálásokat végeztünk, HPV clearance meghatározása céljából. A clearance időt úgy kalkuláltuk, hogy figyelembe vettük a tanulmányba kerülés idejét és az első negatív HPV teszt idejét. Ún. „havi HPV clearance arány”-t számoltunk, melynek során az utolsó vizit HPV-negatív esetszámának (betegeknek) és az összes nyomon követett nő-hónapnak hányadosát vettük, és százalékban ábrázoltuk (Syrjanen és mtsai, 2005). A clearance eredményeket korcsoportok szerint és a kiindulási citológiai eredményeknek megfelelően ábrázoltuk.

II. A 47 Wertheim-műtéten átesett beteg közül kiragadott 4 beteg adatait külön táblázatban nem ábrázoltuk. Kórtörténeti adataikat a szövegben ismertetjük.

III. A HCT eredmények kontrollja PCR-RFLP tanulmányunkban a gyors RFLP értékeléshez szerkesztettünk egy 1-2-4 kódokat használó két oszlopos pontrendszert. Az 1-2-4-értékelő rendszer szükségtelessé tette a restriktív fragmentek hosszának pontos meghatározását. A kódolás alapjául az szolgált, hogy a MY09-MY11 fragmentum hasadt-e a különböző restriktív enzimek hatására vagy sem. (Például: a HPV-33 hasadt a DdeI, HinfI és PstI hatására, de nem hasadt az AluI, BamHI vagy HaeIII esetén. Tehát a pontszám: $0x1_{(AluI)} + 0x2_{(BamHI)} + 1x4_{(DdeI)} = 4$, illetve $0x1_{(HaeIII)} + 1x2_{(HinfI)} + 1x4_{(PstI)} = 6$). Ezáltal a legtöbb HPV típusnak egyéni pontszáma lett, de az azonos pontszámú típusok között az alapján tettünk különbséget, hogy melyik enzim hatására alakult ki a legnagyobb különbség a fragmentumok hosszában. (Például: A HPV-18 és -45 is 64 pontot kapott, de megkülönböztethetjük őket a DdeI fragmentumaik alapján.)

Ezt követően a HCT és PCR-RFLP eredményeinek összevetését ábrázoltuk. A kettős pozitív minták RFLP és HCT jel eredményei közötti korrelációt úgy jelenítettük meg, hogy a hibridizációs minta relatív lumineszcenciája és három pozitív kontroll replikátum átlag relatív lumineszcenciájának hányadosát vettük, majd az első helyen a HR-, a másodikon az LR-próba elegyeket szerepeltettük.

EREDMÉNYEK

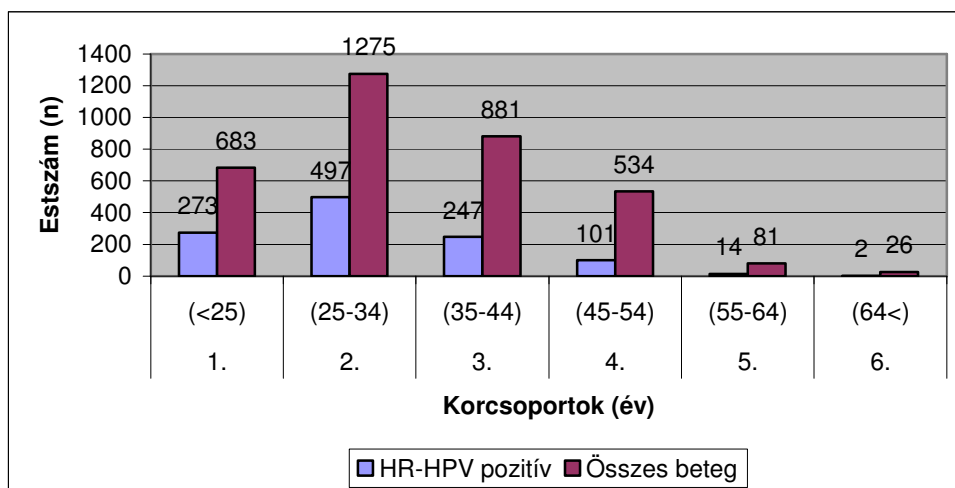
I. HPV prevalencia pozitív kolposzkópos és/vagy citológia eredményű pácienseknél

A kolposzkópos és/vagy citológiai eltérés miatt vizsgált 3480 páciensnél 1222 esetben (35,1%) észleltünk HPV fertőzést a *Hybrid Capture* módszerrel. Ezen belül az alacsony kockázatú fertőzés szinguláris előfordulását 91 esetben (2,6%), a magas kockázatú infekciót 1072 esetben (30,8%), míg a kétféle fertőzés együttes előfordulását 59 esetben (1,7%) regisztráltuk.

Az egyidejűleg több HPV típus által okozott fertőzésben szenvedők kvantitatív mutatók alapján végzett csoportosítását és ezek megoszlását tanulmányozva azt észleltük, hogy összesen 150 esetben alacsony kockázatú HPV infekciót sikerült igazolnunk (12,3%). Az ennek a fertőzésnek megfelelő klinikai eltérést, a *condyloma acuminatum*-ot csak 38 esetben (25,3%) regisztráltuk, tehát az esetek háromnegyed részében a fertőzés látenszen zajlott a vizsgált időpontban.

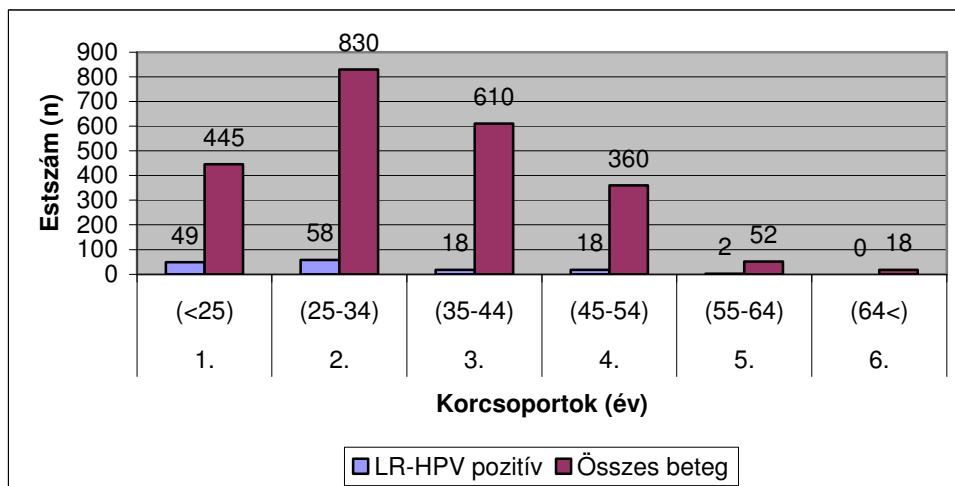
Magas kockázatú humán papillomavírus fertőzést összesen 1131 esetben (32,5%) észleltünk.

A tanulmányba került páciensek életkorát tanulmányozva, azt találtuk, hogy a legfiatalabb 16, a legidősebb 72 éves volt (medián: 32,00 év, átlag: 34,00 év, SD: 10,56), és több mint 90%-uk a 20 és 50 év közötti korosztályból került ki. A HR-HPV fertőzöttek medián életkora 29,00 év volt (átlag: 31,36 év, SD: 9,21); többségük (68%) 20 és 35 év közötti, tehát fertilis korú (1. ábra).



1. ábra A HR-HPV pozitív betegek kormegoszlása

A LR-HPV infekciót hordozók 74%-a a 35 év alatti korosztályból került ki. A median életkor 26,50 év (átlag: 29,97 év, SD: 10,06), amely adat a HR-HPV fertőzötteknél fiatalabb korosztályt jelent (2. ábra).



2. ábra A LR-HPV pozitív betegek kormegoszlása

Nem meglepő a 35 év alattiak magas részaránya mindkét HPV típusú fertőzésben, hiszen egy szexuális kontaktus útján terjedő vírusfertőzésről van szó, és a szexualitás szempontjából ez a korosztály a legaktívabb.

A két fertőzött csoport közötti előfordulási valószínűséget figyelembe véve a magas kockázatú HPV infekció nagyobb valószínűséggel fordult elő, mint az alacsony kockázatú ($p < 0,001$), függetlenül az életkortól.

A tanulmányban résztvevő betegeket hat korcsoportba sorolva és a HR- és LR-HPV fertőzötteket külön-külön táblázatban feltüntetve azt találtuk, hogy mindkét HPV típusú infekció esetén a kor előrehaladtával a HPV prevalencia csökken.

A magas kockázatú vírust hordozók esetén statisztikailag szignifikáns prevalencia csökkenés volt észlelhető 34 (2. csoport) és 44 (3. csoport) év felett ($p < 0,001$), míg az idősebb korcsoportokban (4., 5. és 6. csoport) ez a különbség nem volt szignifikáns. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy az idősebb korosztálynál is jelentős számban észleltünk HPV fertőzést (19 %, illetve 8 %), mely incidencia és prevalencia eseteket is jelenthet (1. táblázat).

	Korcsoport (év)	Esetszám		Prevalencia (%)	Esély- hányados Érték	95 % konf. intervall.	Statisztikai szignifikancia p-érték
		HPV- pozitív	HPV- negatív				
1.	<25	273	410	40	1		
2.	25-34	497	778	39	0,96	0,79-1,16	0,669
3.	35-44	247	634	28	0,59	0,47-0,72	<0,001
4.	45-54	101	433	19	0,35	0,27-0,46	<0,001
5.	55-64	14	67	17	0,31	0,17-0,57	<0,05
6.	64<	2	24	8	0,13	0,03-0,53	<0,05

1. Táblázat A HR-HPV frekvencia a különböző korcsoportokban

Bár az alacsony kockázatú HPV infekció esetén is prevalencia csökkenést észleltünk a magasabb életkorral, de ez az esés hamarabb; a 25. és a 34. év után következett be (1. és 2. csoport). Ez a korai prevalencia esés azt eredményezte, hogy az idősebb életkorban a perzisztáló HPV fertőzés elenyésző számban regisztrálható (2. táblázat).

	Korcsoport (év)	Esetszám		Prevalencia (%)	Esély-hányados Érték	95 % konf. intervall.	Statisztikai szignifikancia p-érték
		HPV- pozitív	HPV- negatív				
1.	<25	49	396	11	1,00		
2.	25-34	58	772	7	0,61	0,41-0,91	0,011
3.	35-44	18	592	3	0,25	0,14-0,43	0,001
4.	45-54	18	342	5	0,43	0,24-0,74	<0,05
5.	55-64	2	50	4	0,32	0,08-1,37	0,717
6.	64<	0	18	0	NA	NA	NA

2. Táblázat A LR-HPV frekvencia a különböző korcsoportokban

A 3. táblázat 433 HR-HPV pozitív páciens nyomonkövetési és HPV *clearance* adatait mutatja be, korcsoportonként. Azt találtuk, hogy az idősebb korcsoportokban a vírus-*clearance* ritkábban volt észlelhető, bár ez a “havi clearance arány” különbség a mellékelt citológiai eredmények és életkor viszonylatában nem volt szignifikáns. A HG-SIL esetén a *clearance* arány nem volt számolható, hiszen ezek a betegek – a szakma szabályai szerint - műtétes kezelésre kerültek.

^a Citológia		Korcsoportok (év)				
		1. <25	2. 25-34	3. 35-44	4. 45-54	5. + 6. 55<
Negatív	<u>HR-HPV pozitív / összes (n)</u>	61/273	51/497	18/247	4/101	1/16
	^b Nyomonkövetett (n)	58	41	9	1	0
	^c Havi clearance arány	58/1193	41/602	9/144	1/31	0/0
	(%)	(4,86)	(6,81)	(6,25)	(3,22)	(0)
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ASCUS	<u>HR-HPV pozitív / összes (n)</u>	92/273	114/497	68/247	30/101	6/16
	^b Nyomonkövetett (n)	71	75	17	4	1
	^c Havi clearance arány	71/1563	75/1185	17/325	4/49	1/14
	(%)	(4,54)	(6,33)	(5,23)	(8,18)	(7,14)
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LG-SIL	<u>HR-HPV pozitív / összes (n)</u>	105/273	199/497	82/247	38/101	6/16
	^b Nyomonkövetett (n)	67	82	4	2	1
	^c Havi clearance arány	67/1611	82/1357	4/80	2/33	1/24
	(%)	(4,16)	(6,04)	(5,00)	(6,06)	(4,17)
HG-SIL	<u>HR-HPV pozitív / összes (n)</u>	15/273	133/497	79/247	29/101	2/16
	^b Nyomonkövetett (n)	0	0	0	0	0
	^c Havi clearance arány	-	-	-	-	-
	(%)	-	-	-	-	-

3. táblázat HPV *clearance* arányok és a "havi clearance arány" a HR-HPV pozitív betegek öt korcsoportjában

^a Citológiai eredmény a tanulmányba kerüléskor

^b A műtéti terápiára került és a nyomonkövetésből kiesett pácinsek kizárásra kerültek

^cHR-HPV *clearance* esetek (nyomonkövetett betegek) / összes nyomonkövetett hónap (%)

II. A HPV-pozitív nyirokcsomók prognosztikai szerepe

Az operábilis *cervix carcinoma*-s betegek átlagéletkora 41,4 (21-59) év volt. Érdekes koreloszlás különbséget figyeltünk meg a különböző leggyakoribb HPV típusok között: a HPV-18 betegcsoportban, - összevetve a HPV-16 fertőzöttekkel, ami 43,7 (27-59) volt -jával alacsonyabb, 33,5 (21-56) átlagos életkort regisztráltunk.

A 47 beteg közül négy esetében – mindannyian HPV-18 pozitívak voltak - igen korai recidívát és rövid túlélést észleltünk. Ennek a négy fulmináns kimenetelű betegnek a predispozíciós anamnesztikus adatait tanulmányozva azt észleltük, hogy mindannyian az ún. magas kockázatú csoportba tartoztak, melynek jellemzői voltak: korai életkorban elkezdett nemi élet, promiszkuitás, gyakori hüvelygyulladások, kérdéses higiéné, nőgyógyászati rákszűréstől távolmaradás, ugyanakkor egyikük sem dohányzott.

A négy méhnyakrákos betegből három a fiatal korosztályhoz tartozott (21, 33 és 35 évesek), egyikük menopausában lévő 56 éves volt. A posztoperatív hisztológiai stádium megerősítette a preoperatívot: 2 esetben FIGO Ib (a 35 és 56 éves), két esetben IIa stádiumot (a 21 és 33 éves) állapított meg. A műtéti preparátum szövettani lelete a három fiatal esetében alacsonyan differenciált (G 3) *carcinoma planocellulare*, míg az idősebb beteg esetében közepesen differenciált (G 2) *adenocarcinoma* volt, mind a négy primer tumor mérete 1 és 2 cm közötti. A nyirokcsomó preparátumokban szövettani metasztázist csak az *adenocarcinoma*-s esetben észleltek, ugyanakkor mind a négy betegnél - a primer tumoron kívül – a nyirokcsomókban kimutatható volt a HPV-18 jelenléte! A 21, 33, 35 és 56 éves betegnél igen korai recidívát (7, 7, 17 és 22 hónappal a műtétet követően, a retroperitoneumban a fiatal pácienseknél, illetve egy esetben a hüvelyconkban) és gyors progressziót, majd *exitus letalis*-t észleltünk. A regisztrált túlélés 9, 10, 21 és 24 hónap voltak.

III. A HCT teszt klinikai alkalmazhatóságának vizsgálata HPV infekcióban

Az 570 cervikális mintából 145 volt pozitív a HCT teszttel, ebből 15 LR-HPV pozitív („A” próba), 102 HR-HPV pozitív („B” próba) és 12 esetben kettős (LR+HR-HPV pozitív) fertőzést mutattunk ki. (16 esetet kizártunk a tanulmányból, mert ezek a későbbiekben nem amplifikálódtak a Béta-globin primerekkel. A PCR detektálási módszerünk két feltételnek felelt meg: 1.) Nem módosította a HCT eredményét, mivel a PCR-hez szükséges DNS-t csak a hibridizációs módszert követően nyertük ki. 2.) A hibridizációt és a polimeráz láncreakciót ugyanazon mintán végeztük el, így a módszerek összehasonlíthatóak.

A nem-denaturálódó PAGE használatával a közel azonos hosszúságú PCR termékek (449-458 bp) elektroforetikus mobilitása is nagymértékben eltér, a különböző nukleotid-szekvencia miatt így a kevert fertőzések ugyanolyan jól vizsgálhatóak, mint a szingulárisok.

A PCR termékek tipizálására az RFLP módszert választottuk. Az 1-2-4- értékelő rendszer szükségtelenné tette a restriktions fragmentek hosszának pontos meghatározását, a nem-denaturáló PAGE-val való kombináció pedig lehetővé tette, hogy a többszörös fertőzésekben az összes koinfekciós HPV-t kimutassuk. Ezzel a módszerrel tripla-infekciót is igazolni tudtunk, amelyet egy hónappal később ugyanazon beteg másik mintájából megerősítettünk.

1-2-4 kód		HPV-típusok	Azonos pontértékű HPV-típusok megkülönböztetése	
A ^a	B ^b		Enzim	Megkülönböztető restriktions fragment hossz (bp)
0	4	16		
0	5	59		
0	7	62		
1	1	61		
1	5	CP8304		
2	7	11, (43) ^c	<i>HaeIII</i>	HPV-11: 217, 124, 108 ill. (HPV-43: 331, 124) ^f
3	1	69		
3	2	68		
3	3	54, 70	<i>AluI</i>	HPV-54: 172, 167, 113 ill. HPV-70: 296, 159
3	5	LVX82, MM7	^{-d}	
3	7	CP141, L1AE1, LVX160	^{-d}	
4	1	44		
4	3	6, 55, MM8	<i>DdeI</i>	HPV-6:382 ill.HPV-55:112,111,85 ill.HPV-MM8:220,142,90
4	4	57		
4	5	34, 35	<i>PstI</i>	HPV-34: 253, 179 ill. HPV-35: 426
4	6	33		
4	7	31		
5	1	72, CP4173, LVX100	^{-d}	
5	2	IS039, MM4, L1AE2	<i>DdeI</i>	HPV-IS039:243,212 ill.HPV-MM4:288,167 ill.HPV-L1AE2:223,192
5	3	53		
5	4	73, MM9	^{-d}	
5	5	52, 56	<i>PstI</i>	HPV-52: 419, ill. HPV-56: 246, 203
5	6	39, 58	<i>PstI</i>	HPV-39: 330, 125, ill. HPV-58: 216, 207
5	7	67, CP8061	<i>HinfI</i>	HPV-67: 234, 215, ill. HPV-CP8061: 346, 106
6	0	40		
6	1	CP6108		
6	4	18, 45	<i>DdeI</i>	HPV-18: 432, ill. HPV-45: 324, 131
6	7	13, 64	<i>DdeI</i>	HPV-13: 326, ill. HPV-64: 211, 151, 87
7	1	(51) ^c		
7	2	42		
7	3	32		
7	4	66		

^a A, 1-2-4 kód az *AluI*, *BamHI* és *DdeI* enzim emésztés alapján

^b B, 1-2-4 kód a *HaeIII*, *HinfI* és *PstI* enzim emésztés alapján

^c Valószínűleg nem amplifikálódott a módosítatlan MY09-MY11 primer párral

^{-d} Nem különíthető el a hat restriktions enzim hatására, tekintettel egyforma vagy nagyon hasonló restriktions fragmentum hosszukra

4. táblázat Az MY09-MY11 fragmentumok RFLP tipizálási pontrendszere

A HCT teszt eredmények – amelyek csak az alacsony kockázatú- („A”) vagy csak a magas kockázatú („B”) próbákkal reagáltak – teljesen megegyeztek a PCR-RFLP módszer eredményeivel (4. táblázat).

A 102 HCT HR-HPV pozitív mintából 13 esetben többszörös fertőzést igazoltunk, de az összes koinfekciós HPV a magas kockázatú csoportba tartozott.

További egyéb magas kockázatú papillomavírus típusokat mutattunk ki, melyeknek megfelelő próbaelegyet a HCT nem tartalmazott. Így igazoltunk szinguláris HPV-53 (két esetben), HPV-58 (két esetben), HPV-66 (három esetben), HPV-MM4 és HPV-CP8304 típusú infekciókat is. Ezek a típusok valószínűleg kereszt-hibridizálódtak néhány HR próbával. Ezek között az új típusok között szerepelt a HPV-58, aminek megfelelő típus-specifikus próbát már tartalmaz az új generációs Hybrid Capture teszt (HC II). Ugyan nem tudjuk a hibridizációs módszer detektálási érzékenységét ezen új típusokra, de az ezek által okozott fertőzés valószínűleg kimutatásra került az első generációs teszttel is. [Peyton és mtsai (1998) tanulmányunk idején számoltak be a HC II új HPV típusokat (HPV-53, -66, -67, -73, -CP6108 és -CP8061) kimutató eredményeiről. Ezen típusok közül a HPV-53-mal és -66-tal a HCT I magas kockázatú próbái is hibridizálódnak.]

A 12 HCT dupla-pozitív („A és B”) mintából a PCR-RFLP csak két esetben igazolta a LR- és HR-HPV együttes jelenlétét, és a többi többszörösen fertőzött mintában – egy kivételével – csak magas kockázatú HPV-t igazolt (5.táblázat).

A LR- és HR-HPV-k szimultán kimutatásának hiánya ezekben a mintákban nem a módszerünk rovására írható fel, hiszen az érzékeny ezüsfestés könnyen kimutatja a többszörös PCR sávokat is, még akkor is, ha százszoros különbség van az illető target szekvenciák kópiaszámában.

PCR-RFLP eredmény	A HCT minták HPV eredményei		
	LR- pozitív	Kettős pozitivitás	HR- pozitív
<i>LR-HPV szingulárisan</i>			
HPV-6	11	1	
HPV-11	3		
HPV-44	1		
<i>HR-HPV szingulárisan</i>			
HPV-16		3	46
HPV-18		1	6
HPV-31		2	10
HPV-33			5
HPV-35			2
HPV-45			2
HPV-52			6
HPV-56			3
<i>Egyéb HPV-típusok</i>		1 ^a	9 ^b
<i>Többszörös HPV fertőzés</i>		4 ^c	13 ^d
Összesen	15	12	102

a HPV-62

b HPV-53, -58, -66, -MM4 és -CP8304

c HPV-6/16, -6/45, -16/31 és -16/52

d HPV-18/33, -18/58, -31/35, -33/35, -52/56, -16/31 (három mintában kimutatva),
-16/33 (három mintában kimutatva), -31/56/CPLVL1 (két egymást követő mintában
kimutatva, amelyek egy hónap eltéréssel ugyanattól a betegről származtak)

5. táblázat A HCT és RFLP eredmények közötti korreláció vizsgálata

Miután megállapítottuk, hogy a PCR-RFLP tipizáló módszer megbízható, újrateszteltük a mintákat a HCT teszttel, amivel lehetséges a fals-pozitív HCT minták kizárása (Schiffman és mtsai, 1995). A 13 mintából 12 ismét hibridizálódott mind az alacsony-, mind a magas kockázatú próbákkal.

Ezt követően megvizsgáltuk a hibridizációs jel erősségének jelentőségét (szignifikanciáját), amit a minta lumineszcenciája és három pozitív kontroll átlag lumineszcenciájának aránya fejez ki minden teszt sorozatban (Ferenczy és mtsai, 1996). Ahol a HR-jel („B”) erősebb volt, mint a LR-jel („A”), ott dominálón magas kockázatú fertőzés volt jelen, ellenben abban a három esetben, ahol az LR-HPV is kimutatásra került, ott minden esetben a LR-jel („A”) erősebb volt, mint a HR- („B”) (6. táblázat). Érdekes módon, egy új típus, a HPV-62 is jelen volt egy dominálón LR pozitív mintában.

Minta szám	PCR-RFLP-vel kimutatott HPV-típusok	Hibridizációs jel ^a
24	6	10,0>1,8
61	6, 16	3,7>1,3
191	6, 45	159,6>1,8
488	62	24,4>4,1
17	16	6,7<7,0
116	16	2,4<22,4
257	16	38,8<201,9
34	16, 31	26,9<192,2
492	16, 52	61,3<81,4
411	18	12,8<83,5
271	31	1,7<37,1
368	31	2,5<180,4

^a A minta relatív lumineszcenciája és három pozitív kontroll replikátum átlag relatív lumineszcenciájának hányadosa. Az első helyen a HR-, a másodikon a LR- próba elegyek szerepelnek.

6. táblázat A kettős pozitív minták RFLP és HCT hibridizációs jel eredményei közötti korreláció vizsgálata

Az új HPV típusok (HPV-53, -58, -62, -66, -CP8304 és -MM4) RFLP tipizált eredményeit szekvenálással igazoltuk. A MY09-MY11 amplimereket klónoztuk, szekvenáltuk és a megfelelő referencia HPV típusokhoz igazítottuk. Az első négy klón szekvenálása két irányba történt. Mivel a szekvenciák nagy része a kétirányú módszernél átfedést mutatott, ezért a többi klónon egyirányú szekvenálást hajtottunk végre. A homológia mértéke a referencia szekvenciákhoz képest 96-100% volt. Az amplifikáció a Taq polimerázzal történt, a néhány nukleotidnyi különbség észlelhető volt a klónok és a referencia szekvenciák között, amplifikációs hibából adódóan. Ez azonban nem befolyásolta a PCR-RFLP tipizálás eredményeinek igazolását.

MEGBESZÉLÉS

Tanulmányunk első részében Észak-kelet Magyarország régióban, nagy populációs anyagon, pozitív kolposzkópos és/vagy citológiai eredmény mellett mértük fel HPV infekció prevalenciáját. A klinikai epidemiológiai munkánk során észlelt 35,1%-os HPV fertőzés frekvencia az európai régióból közölt adatokkal közel megegyező (Tachezy és mtsai, 1999; Kornya és mtsai, 2002). Természetesen ezek a magas fertőzöttséget mutató adatok egy „primer” szűrően kolposzkópos és citológiai vizsgálat során pozitívnak ítélt szubpopuláció mutatói. Hasonló HPV frekvenciákat csak a magas kockázatú populációk, így egyetemisták (Bauer és mtsai, 1991), elzárt közösségek (Bowden és mtsai, 1999) és legmagasabb mutatókat a prostituáltak körében (Kubota és mtsai, 1999) észleltek.

A HR-HPV infekció nagyobb valószínűséggel fordult elő, mint a LR-HPV fertőzés ($p < 0,001$). Megerősítettük a magyar és nemzetközi irodalomban közölt azon megfigyelést (Deák és mtsai, 1999; Van den Brule és mtsai, 1991; Melkert és mtsai, 1993; Sellors és mtsai, 2000), miszerint a HPV prevalencia a kor előrehaladtával lineárisan csökken. A HPV infekciónak mind az alacsony, mind pedig a magas kockázatú csoportban megfigyelhető 20-35 év közötti halmozódása indirekt bizonyítéknak tekinthető abban a vonatkozásban, hogy valóban szexuális úton terjedő infekcióval (STD) állunk szemben, ugyanis a szexualitás szempontjából ez a korosztály a legaktívabb (Holmes és mtsai, 2004).

Saját tanulmányunkban a prevalencia csökkenés a HR-HPV esetén a 35. és a 45. év után szignifikánsnak bizonyult. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a lineáris frekvencia csökkenés ellenére, az idősebb korcsoportok esetén is relatíve magas fertőzöttség észlelhető (17% és 8%), bizonyítva a HPV-DNS perzisztálásra való hajlamát. Ezek az adatok is megerősítik azt az ajánlást, hogy a nőgyógyászati rákszűrést (méhnyakrák szűrést) a szexuális élet megkezdését követően 1-2 évvel el kell kezdeni, és 65 éves korig érdemes rendszeresen végezni.

A LR-HPV esetén hamarabb következett be a szignifikáns prevalencia csökkenés (a 25. és 35. év után), és ezt követően csak elenyésző százalékban fordul elő.

Összegezve tanulmányunk végső megfigyelését, azt mondhatjuk, hogy nagy számú beteganyag különböző szintű *cervicalis epithelialis* elváltozása esetén a HR-HPV fertőzés esetén a vírus-perzisztálás esélye nagyobb, mint a LR-HPV esetén. Ennek a víruscsoportnak ez a fontos tulajdonsága lehet az egyik felelős az onkogenitásukért.

A korábbi irodalmi megfigyeléseken túlmutató, a gyakorlatban felhasználható következtetés, hogy az idősebb életkorban perzisztáló HPV infekciót hordozókat magas kockázatú

populációnak kell tekintenünk az esetleg későbbiekben kialakuló méhnyakrák szempontjából. Ezzel szemben az a megfigyelés, hogy a HPV fertőzés előfordulási gyakorisága az életkorral fordított arányban változik, azt jelzi, hogy a fiatal életkorban észlelhető HPV infekciók igen nagy része tranziens fertőzés, így onkológiai jelentősége kisebb. Ugyanakkor különös jelentőséggel bír az a tény, hogy becslések szerint a szexuálisan aktív nők 70%-a élete során HPV fertőzésen esik át (Bosch és mtsai, 2003).

Célszerűnek látszik ezért az elsődleges szűrési módszerek (kolposzkópia és citológia) pozitivitása esetén, a második lépcsőben a HPV státusz meghatározása. Csak így állítható fel individuális kezelési vagy nyomonkövetési terv. Negatív primer szűrési eredmények esetén is felvetődik a szükségessége bizonyos időközönként a HPV tipizálásnak. Ezzel a kiegészítő vizsgálattal is fokozható a szűrés hatékonysága. A citológiai vizsgálatot követő másodlagos HPV szűréssel Ratnam és mtsai (2000) is igazolták, hogy magas szenzitivitással azonosíthatók a potenciális kockázattal bíró páciensek. Dillner és mtsai (2001) ugyanakkor megjegyzik, hogy nem ismert a negatív citológiai eredmény és HPV teszt későbbiekre vonatkozó „védeltséget” biztosító hatása. Ferenczy és mtsai (2002) – utalva a negatív HPV eredmény jelentőségére - kijelentették, hogy negatív HPV teszt és sorozat negatív citológiai (2-3x) eredmény esetén, 5-10 éven belül nem alakulhat ki CIN III vagy ICC, amennyiben a nő szexuális partnert nem vált. Megjegyzik egyúttal, hogy negatív citológia, de perzisztáló pozitív HR-HPV lelet esetén hamarosan számíthatunk pozitív onkocitológiai eredményre, így ezt tartják a bizonyos magas kockázatú populációnak.

A méhnyakrák kórlefolyásának prognózisa tekintetében talán a legfontosabb tényező a nyirokcsomó-metasztázisok jelenléte (Burger és mtsai, 1996; Huang és mtsai, 2003). Ezt a témakört tanulmányozandó, terjesztettük ki vizsgálatainkat a cervix carcinomás betegek műtét során eltávolított nyirokcsomóinak HPV státusz meghatározására. 47 operált páciens adatait feldolgozva azt észleltük, hogy a szövettanilag metasztázis-mentes, de a predilekciós nyirokcsomókban HPV-DNS-t hordozó (a primer tumorról megegyező HPV státuszú) betegek kórlefolyása hasonlóan fulminánsnak bizonyult, mint a hisztológiailag már tumoros nyirokcsomójú betegek esetében. Négy páciensnél -, akik mind a primer tumor, mind a nyirokcsomók vonatkozásában HPV-18 pozitívak voltak, bár hármójuknál tumormentes nyirokcsomót észleltünk – korai recidívát és a korai stádiumnak nem megfelelő kedvezőtlen prognózist, rövid túlélést regisztráltunk.

A fentiek alapján fölmerül annak a lehetősége, hogy a HPV-specifikus nukleinsavak a metasztázis szenzitív indikátorai. Vizsgálataink során észleltük továbbá, hogy a HPV-18

típus konzekvensen a kedvezőtlenebb prognosztikai csoportban fordult elő, ezért azt gondoljuk, hogy ez a típusú HPV infekció jelenléte is rossz prognosztikai jelnek tekintendő a már kialakult méhnyakrák esetén. Lee és mtsai (2007) és Lukaszuk és mtsai (2007) is azon az állásponton vannak, hogy a nyirokcsomók HPV státuszának igenis jelentősége van a betegség kimenetelében. Hangsúlyozzák, hogy predilekciós nyirokcsomók HPV-pozitivitása ugyanolyan független prognosztikai paraméternek tekinthető a betegek túlélésében és a mortalitási kockázat vonatkozásában, mint a primer tumor mérete és a FIGO stádium. Mindezeket figyelembe véve, arra a konklúzióra jutottak, hogy a HPV-DNS jelenléte a kismedencei nyirokcsomókban a metasztázis korai jelének tekintendő, és ezt a prognosztikai faktort a kezelési terv felállítása során maximálisan figyelembe kell venni. Ezt a véleményt több korábban publikált tanulmány is osztja (Walker és mtsai, 1989; Rose és mtsai, 1995; Schwartz és mtsai, 2001).

Baay és mtsai (1997) nem találtak korrelációt a kismedencei nyirokcsomók HPV státusza és a tumormetasztázis-képzés között. Felvetve annak a lehetőségét, hogy a különböző HPV típusok prognosztikai potenciálja nem azonos méhnyakrákban, a holland munkacsoport (Baay és mtsai, 2007) HPV-16 infekció esetén vonta le fenti megállapításait. Tovább erősítve a HPV-16 infekció HPV-18-tól eltérő viselkedését, kínai tanulmányban megerősítették Baay és mtsai-nak (1997) megállapításait. Chan és mtsai (2005) a primer tumorban mérhető virális terheltséggel („viral load”) egyenes arányban észleltek HPV-DNS-t a környéki nyirokcsomókban és éppen ezért nem tekintik prognosztikai tényezőnek.

A HPV-18 fertőzés rossz prognózisának magyarázatát nem ismerjük méhnyakrákban. Több molekuláris teória született: (a) nagyobb integrációs potenciál; (b) fokozott E7 foszforilációs képesség (Stoler és mtsai, 1992; Park és mtsai, 1997). A HPV-18 társult tumorokban rövidebb pre-klinikai kimutathatósági szakaszt igazoltak, és gyorsabb progressziót a különböző súlyosságú CIN-ek között, majd az ICC-ba (Kurman és mtsai, 1988). Újabban Woodman és mtsai (2003) azon megfigyelésüket közölték, hogy az ilyen esetekben észlehető rövidebb rákmegelőző stádiumok nem a HPV-18 fertőzés agresszívebb hatásának tudható be, hanem az általuk okozott kevésbé súlyos citológiai eltérésnek köszönhető.

A fenti, sokszor egymásnak ellentmondó adatokból is látható, hogy a tumormentes nyirokcsomókban kimutatható HPV-DNS prognosztikai szerepe nem egyértelmű. Ugyanakkor mégiscsak azt a következtetést kell levonnunk, hogy korai stádiumú méhnyakrákban, különösen HPV-18 fertőzéssel társulva, a HPV genom jelenlétét a hisztopatológiai vizsgálattal negatív kismedencei nyirokcsomókban igenis a metasztázis korai jelének kell tekinteni, és ezek a betegek ennek megfelelően kezelendők.

Számos megfigyelés igazolta azt a feltételezést, hogy a rutin nőgyógyászati szűrésen kiemelt páciensek szekunder szűrésében/nyomonkövetésében a hagyományos méhnyakrákszűrés során alkalmazott kolposzkópos és citológiai vizsgálatot indokolt kiegészíteni HPV vizsgálattal (Schneider és mtsai, 2000; Gravitt és mtsai, 2005). A *cervicalis intraepithelialis neoplasia*-k szűrésére és diagnosztikájára alkalmazott metodikák nem alkalmazhatók a HPV diagnosztika során, ezért egy olyan a HPV-DNS kimutatására alkalmas teszt iránti igény vetődött fel, mely megfelelő találati biztonságot nyújt, ugyanakkor gazdaságos és rutinvizsgálatok során egyszerűen alkalmazható. Mindezek szellemében vizsgáltuk a HCT teljesítőképességét, különös tekintettel a határesetekre. A magas szenzitivitású és specificitású HCT (I) teszttel 14 HPV típust lehet meghatározni (a HC II-vel 18-at) és ez a módszer egyértelműen megkülönbözteti a leggyakrabban előforduló alacsony- és magas kockázatú típusokat. Az újonnan azonosított HPV típusok egyre növekvő száma felveti annak a lehetőségét, hogy a HCT teszt ezen új típusokkal keresztreakciót ad, zavarva az eredmények interpretálását.

A PCR-RFLP és szekvenálás módszerekkel megerősítve megállapíthatjuk, hogy a HCT teszt megfelelő diagnosztikus módszert biztosít az alacsony és magas kockázatú HPV típusok egyértelmű megkülönböztetésére, ezáltal a méhnyakrák kialakulása szempontjából alacsony és magas kockázatú populáció elkülönítésére. A kettős pozitív (LR és HR) esetek vizsgálatunk szerint a magas onkogenitású csoportba sorolandóak és természetesen klinikailag is az ezzel a csoporttal azonos megítélést igényelnek. Jelen tanulmányunk is megerősítette a szoros korrelációt a pozitív kolposzkópos lelet és SIL citológiai eredmény, illetve a magas kockázatú HPV fertőzés között, függetlenül attól, hogy éppen kettős infekcióról van szó, tehát alacsony kockázatú vírustípus is jelen van. Ezt a megfigyelésünket nemzetközi irodalmi adatok is megerősítik (Schiffman és mtsai, 1995).

Mindezen megállapításainkat alátámasztottuk a PCR-RFLP módszerrel, melynek során csak egyetlen esetben találtunk olyan ellentmondó eredményt, amikor egy a HCT alapján dupla-pozitív mintából nem tudtuk a HR-HPV-t kimutatni. Vizsgálataink alapján így a HCT típus-specificitása 128/129, tehát 99,2%-nak bizonyult.

Felvetődik annak a kérdése, hogy a HPV tipizálás során indokolt-e az infekciós HPV genotípusának pontos ismerete. Elméleti és gyakorlati tapasztalataink azt igazolják, hogy ennek csak a vakcinálás ellenőrzésében és a műtét utáni kontroll vizsgálatokban lehet szerepe. A jelenleg forgalomban lévő (quadrivalens és bivalens) vakcinák alapvetően a legnagyobb onkológiai kockázatot hordozó HPV-16 és -18 által okozott fertőzések megelőzését szolgálják

(Frazer, 2004). A vakcinálás széleskörű bevezetésétől azt reméljük, hogy ezek a vírusok okozta CIN-ek és ICC-k előfordulása jelentősen csökken. Ugyanakkor felvetődik annak a lehetősége, hogy a „megüresedő” ökológiai pozíciót egy másik, jelenleg még alig elterjedt magas kockázatú típus veszi át. A CIN különböző stádiumai miatt végzett méhnyak műtétek sikerességét a posztoperatív negatív citológiai és HPV teszt eredmények igazolják (Hernádi és mtsai, 2005). A műtét utáni negatív HPV eredmény reziduális CIN ellen szól, ezzel szemben a pozitív teszt óvatosságra int, a későbbiekben recidiváló *cervicalis dysplasia* lehetőségét veti fel. Amennyiben pontos HPV genotípus meghatározás történt a műtét előtt és után, és azok különbözőek, úgy az is reziduális folyamat ellen szól.

Megfigyeléseinket összefoglalva megállapítható, hogy a HCT teszt egy a szekunder szűrési program gyakorlatában könnyen és megbízhatóan alkalmazható módszer a magas kockázatú populáció kiemelésére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Pozitív kolposzkópos és/vagy citológiai eredményű betegeknek vizsgáltuk az alacsony- és magas kockázatú HPV fertőzés prevalenciáját, prospektív klinikai epidemiológiai tanulmányban. A 3480 páciensnél 1222 esetben (35,1%) észleltünk HPV fertőzést a Hybrid Capture módszerrel. Ezen belül a LR-fertőzés szinguláris előfordulását 91 esetben (2,6%), a HR-infekciót 1072 esetben (30,8%), míg a kétféle fertőzés együttes előfordulását 59 esetben (1,7%) regisztráltuk. A HR-HPV fertőzöttek medián életkora 29,00 év, a LR-HPV infekciót hordozóké 26,50 év volt. A magas kockázatú HPV infekció nagyobb valószínűséggel fordult elő, mint az alacsony kockázatú ($p < 0,001$), függetlenül az életkortól. Megerősítettük azt az irodalomban is közölt tényt, hogy mind a HR-, mind a LR-HPV prevalencia a kor előrehaladtával csökken. A HR-HPV fertőzés esetén statisztikailag szignifikáns prevalencia csökkenés volt észlelhető 34 és 44 év felett ($p < 0,001$). Ugyanakkor az idősebb korosztálynál is jelentős számban észleltünk HPV fertőzést (19 %, illetve 8 %). A LR-HPV infekció esetén a prevalencia csökkenés hamarabb következett be (25 és 34 év után), de az idősebb életkorban a perzisztáló HPV fertőzés csak elenyésző számban regisztrálható. 433 HR-HPV pozitív páciens nyomonkövetési és HPV *clearance* adatait elemezve, kiderült, hogy az idősebb korcsoportokban a vírus-clearance ritkábban volt észlelhető, de ez a "havi clearance arány" különbség a citológiai eredmények és életkor viszonylatában nem volt szignifikáns.

A HPV prognosztikai szerepét tanulmányozva méhnyakrákban, 47 operábilis cervix carcinomás betegnél (átlagéletkor: 41,4 [21-59] év) a radikális méheltávolítás során PCR-rel HPV tipizálást végeztünk a primer tumorból és a kismencedei nyirokcsomókból. A betegek további kórtörténeti adatait tanulmányozva négy esetben igen korai recidívát és rövid túlélést észleltünk. A nyirokcsomó preparátumokban, mind a négy esetben a primer tumorral megegyező HPV-18 jelenlétét mutattuk ki, ugyanakkor szövettani metasztázist csak egyetlen betegnél állapítottunk meg. A fentiek alapján fölmerül annak a lehetősége, hogy a HPV-specifikus nukleinsavak a metasztázis szénitív indikátorai.

A klinikai gyakorlatban elterjedt HCT I. HPV típus-specifitását értékeltük 570 cervikális mintából PCR (MY09-My11)-RFLP módszerrel. A kontroll módszer megerősítette a HCT eredményeit szinguláris fertőzés esetén (15 minta LR-HPV pozitív, 102 minta HR-HPV pozitív), ugyanakkor a HCT-vel dupla-pozitív mintákból PCR-RFLP-vel csak egyetlen esetben nem tudtuk a HR-HPV-t kimutatni. Vizsgálataink alapján így a HCT típus-specifitása 99,2%-nak bizonyult. Megfigyeléseinket összefoglalva megállapítható, hogy a HCT teszt egy a szekunder szűrési program gyakorlatában könnyen és megbízhatóan alkalmazható módszer a magas kockázatú populáció kiemelésére.

EPIDEMIOLOGY AND IMPORTANCE OF PROGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS INFECTIONS

In a prospective clinical epidemiological study, the prevalence of low and high-risk HPV infections was examined in patients with positive colposcopic and/or cytological findings. Using the Hybrid Capture Technique among the 3480 patients in the study, we could detect HPV infection in 1222 cases (35.1%). Single prevalence of LR and HR infection, and the combination of the two were found in 91 cases (2.6%) and 1072 cases (30.8%), and 59 patients (1.7%), respectively. The median age of women with HR-HPV infection was 29.00 years, while the carriers of LR-HPV infection were 26.5 years of median age. The likelihood of high-risk HPV infection was higher compared to the low-risk one ($p < 0.001$), independently of age. We could also confirm the fact in the literature that both HR- and LR-HPV prevalence decreased by age. Statistically significant decrease in prevalence was noted in patients over 34 and 44 years of age in HR-HPV infections ($p < 0.001$). At the same time, however, high incidence of HR-HPV infection was also found among the elderly (19% and 8%, respectively). A decrease in prevalence came earlier in LR-HPV infections (after 25 and 34 years of age) but HPV-infection persisting into old age could be registered in a negligible number of cases. Analyzing the follow-up and HPV-clearance data of the 433 patients found positive for HR-HPV, we could see that virus clearance was rarer in the older age group, but the differences in monthly clearance-rates were not significant as far as the cytological findings and the patients' age were considered.

Studying the prognostics role of HPV in cervical cancer, in the 47 patients in the sample with operable cervical carcinoma (mean age 41.1 [21-59] years) the primary tumor and lymph nodes of the pelvis were used to perform HPV-typing via PCR after radical hysterectomy. Studying the patients' history further, early recidivation and short survival were found in 4 patients. In the lymph node preparations, the presence of HPV-18 coinciding with the primary tumor was found in each of the 4 cases, but, histologically, metastasis could only be detected in one patient. Based on the above, it might be hypothesized that HPV-specific nucleic acids act as sensitive indicators of metastasis development.

We evaluated the HCT I. HPV-specificity (widely used in clinical practice) in 570 cervical samples applying PCR (MY09-My11)-RFPL technique. The control technique confirmed the HCT results in cases of single infection (15 and 102 samples positive for LR-HPV and HR-HPV). At the same time, however, in double positive samples by HCT we failed to detect HR-HPV using PCR-RFLP in one case only. Based on our investigations, the type specificity of HCT was found to be 99.2%. Summing up our observations we can conclude that the HCT test is an easy and safe method to use in a secondary screening program to highlight the population at high risk.

IRODALOM

Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 257-264.

Agorastos T, Dinas K, Lloveras B, Bosch FX, Kornegay JR, Bontis JN et al. Cervical human papillomavirus infection in women attending gynaecological outpatient clinics in northern Greece. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 145-147.

Baay MF, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Quint WG et al. Detection of HPV-16 DNA by PCR in histologically cancer free lymph nodes from patients with cervical cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 960-961.

Bao YP, Li N, Smith JS, Qiao YL. Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2007 (in press)

Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* 1989; 4: 1529-1532.

Barnes W, Delgado G, Kurman RJ, Petrilli ES, Smith DM, Ahmed S et al. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1988; 29: 267-273.

Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20: 274-278.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *J Am Med Assoc* 1991; 265: 2809-2810.

Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Jordan SW, Dorin M, Miller J. Cervical papillomavirus infection and cervical dysplasia in Hispanic, Native American and non-Hispanic white women in New Mexico. *Am J Public Health* 1991; 81: 582-586.

Benedet JL, Odicino F, Masionneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz APM et al. Carcinoma of the cervix uteri. *J Epidemiol Biostat* 2001; 6: 5-44.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H 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: 1077-1085.

Bosch FX, De Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst* 2003; 31: 3-13.

Bosch FX, Manos M, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. (International Biological Study on Cervical Cancer Study Group) *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.

Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89: 183-190.

Bosch FX, Munoz N, De Sanjose S, Izarzugaza I, Gili M, Viladin P et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 750-758.

Bosch FX, De Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 3-13.

Bowden FJ, Paterson BA, Mein J, Savage J, Fairley CK, Garland SM et al. Estimating the prevalence of *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and Human papillomavirus infection in indigenous women in northern Australia. *Sex Transm Infect* 1999; 75: 431-434.

Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML et al. Human papillomavirus type-18: Association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1361-1368.

Castle PE, Schiffmann M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1787-1789.

Chan PK, Yu MM, Cheung TH, To KF, Lo KW, Cheung JL et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumour and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 33: 201-205.

Chen CA, Liu CY, Chou HH, Chou CY, Ho CM, Twu NF et al. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1801-1808.

Chen Tm, Chen CA, Wu CC, Huang SC, Chang CF, Hsieh CY. The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. *Int J Cancer* 1994; 57: 181-184.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366: 991-998.

Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1157-1164.

Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 946-954.

Czeglédy J, Póka R, Veress G, Gergely L. Amplification of human papillomavirus type 16 transforming genes from cervical cancer biopsies and lymph nodes of Hungarian patients. *J Clin Microbiol* 1992; 31: 233-236.

Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I et al. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999; 81: 554-558.

Cseh I, Deak J, Pulay T et al. Prevalence of human papillomavirus infection in Hungary. *Magyar Nőorv Lapja* 1998; 61: 2-9.

Deak J, Cseh I, Szollosi J, Pulay T, Kornya L, Bak M et al. Detection of human papillomavirus infection by the nucleic acid hybridization method (a multicenter study). *Orv Hetil* 1999; 140: 115-120.

Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touze A, Bout D, Coursaget P. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J Virol* 1999; 73: 6063-9071.

Evander M, Boden E, Bjersing L, Rylander E, Wadell G. Oligonucleotide primers for DNA amplification of the early regions 1, 6 and 7 from papillomavirus types 6, 11, 16, 18, 31, 33. *Arch Virol* 1991; 116: 221-233.

Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171: 1026-1030.

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2003; 3: 11-16.

Ferenczy A, Franco E, Arseneau J, Wright TC, Richart RM. Diagnostic performance of hybrid capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid assay combined with liquid-based cytologic study. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 651-656.

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3: 11-16.

Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SL, Snijders PJ, Meijer CJ et al. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 2271-2276.

Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006; 119: 2677-2684.

Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm is cervical cancer control. *Vaccine* 2005; 23: 2388-2394.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180: 1415-1423.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 46-54.

Füle T, Csapó Z, Máthé M, Tátrai P, László V, Papp Z et al. Prognostic significance of high-risk HPV status in advanced cervical cancers and pelvic lymph nodes. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 570-578.

Gallo G, Bibbo M, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, Vecchione A et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 2003; 56: 532-536.

Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007; 125: 176-182.

Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papaenfuss MR et al. Incidence, prevalence and clearance of type-specific human papillomavirus infections. *J Infect Dis* 2002; 186: 462-469.

Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME et al. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 477-484.

Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19: 439-458.

Hagmar B, Christensen JJ, Johansson B, Kalantari M, Ryd W, Skyldberg B et al. Implications of human papillomavirus type for survival in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5: 341-345.

Hankins C, Coutlee F, Lapointe N, Simard P, Tran T, Samson J et al. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *CMAJ* 1999; 160: 185-191.

Hernádi Z, Szöke K, Sáy T, Krasznai Z, Soós G, Veress G et al. Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 118(2): 229-234.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1787-1789.

Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J et al. Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 464-474.

Herrero R, Schiffman MH, Bratti C, Hildesheim A, Balmaceda I, Sherman ME et al. Design and methods of a population-based natural history study of cervical neoplasia in a rural province of Costa Rica: the Guanacaste Project. *Pan Am J Public Health* 1997; 1: 362-375.

Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, Kurman RJ, Barnes W, Jones S et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington, D.C. *Sex Trans Dis* 1993; 20: 279-285.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-240.

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Eng J Med* 1998; 338: 423-428.

Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical Dysplasia. *J National Cancer Inst* 1995; 87: 1365-1371.

Holmes KK, Levine R, Weaver M. Effectiveness of condoms in preventing sexually transmitted infections. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 454-461.

Hopman EH, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Walboomers JM, Kenemans P, Helmerhorst TJ. High risk papillomavirus in women with normal cervical cytology prior to the development of abnormal cytology and colposcopy. *BJOG* 2000; 107: 600-604.

Huang LW, Chao SL, Chen PH, Chou HP. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J Clin Virol* 2004; 29: 271-276.

Huang LW, Chao SL, Hwang JL. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 327-334.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Papillomaviruses. Lyon: IARC 1995; 64: 1-409.

Ikenberg H, Wiegering I, Pfisterer J, Kiechle-Schwarz M, Schmitt B, Sauerbrei W et al. Human papillomavirus DNA in tumor-free regional lymph nodes: a potential prognostic marker in cervical carcinoma. *Cancer J Sci Am* 1996; 2: 28-34.

Ikenberg H, Sauerbrei W, Schottmuller U, Spitz C, Pflaiderer A. Human papillomavirus DNA in cervical carcinoma – correlation with clinical data and influence on prognosis. *Int J Cancer* 1994; 59: 322-326.

Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4145-4150.

Jakobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000; 87: 221-227.

Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, Sigurjonsson T, Warleby B, Hagmar B. Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade: a study on 476

Stockholm women, using PCR for detection and typing of HPV. *Hum Pathol* 1997; 28: 899-904.

Kónya J. A human papillomavírus (HPV) diagnosztika helye az anogenitális carcinomák megelőzésében. *Infekt Klin mikrobiol* 2006; 13: 107-113.

Kornya L, Cseh I, Deak J, Bak M, Fulop V. The diagnostics and prevalence of genital human papillomavírus (HPV) infection in Hungary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100: 231-236.

Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1956; 63: 1245-1261.

Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CF, Paavonen Jbeckmann AM et al. A cohort study of the risk of intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Eng J Med* 1992; 327: 1272-1278.

Kubota T, Ishi K, Suzuki M, Utsuno S, Igari J. Prevalence of human papillomavírus infection in women attending a sexually transmitted disease clinic. *Kansenshogaku Zasshi* 1999; 73: 233-238.

Kulmara SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjanen KJ, Gyllensten UB, Johansson BC et al. Type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infections in the New Independent States of the former Soviet Union – Cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 17-22.

Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD, Reid R, Jenson AB, Temple GF et al. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 293-296.

Lai HC, Sun CA, Yu MH, Chen HJ, Liu HS, Chu TY. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papillomavirus type 58 and related types. *Int J Cancer* 1999; 84: 553-557.

Laikangbam P, Sengupta S, Bhattacharya P, Dutttagupta C, Dhabali ST, Verma Y et al. A comparative profile of the prevalence and age distribution of human papillomavirus type 16/18 infections among three states of India with focus on northeast India. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 107-117.

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001; 91: 412-420.

Lee YS, Rhim CC, Lee HN, Lee KH, Park JS, Namkoong SE. HPV status in sentinel nodes might be a prognostic factor in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 351-357.

Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, Zafrani B, de la Rochefordiere A, Clough K et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2613-2619.

Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass Ag, Wacholder S et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002; 360: 228-229.

Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M et al. Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients – a prospective study. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 721-726.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-214.

Meisels A, Gagne O. Microbiology of the female reproductive tract. V. Changing patterns within one decade in a French Canadian population. *J Reprod Med* 1977; 18: 66-68.

Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP et al. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age dependent. *Int J Cancer* 1993; 53: 919-923.

Meulen J, Eberhardt HC, Luande J, Mgaya HN, Chang-Claude J, Mtiro H et al. Human papillomavirus (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania, east Africa. *Int J Cancer* 1992; 51: 515-521.

Miltényi L. Tele-Co-besugárzás a biológiai paraméterek figyelembevételével. A DOTE Női Klinika kiadványai, Nőgyógyászati Onkológia III. In: Lampé L. 1990; 17: 73.

Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 2002; 87: 324-333.

Munoz N. Human papillomavirus and cervical cancer. IARC Sci. Publ. No. 94., Int. Agency on Cancer, Lyon, 1989.

Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 733-740.

Munoz N, Kato I, Bosch FX, Eluf-Neto J, De Sanjose S, Ascunce N et al. Risk factors for HPV detection in middle-aged women. *Sex Trans Dis* 1996; 23: 504-510.

Nindl I, Lotz B, Kuhne-Heid R, Endisch U, Schneider A. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a nonradioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1999; 52: 17-22.

Nuovo GJ, Gallery F, MacConnell P, Becker J, Bloch W. An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am J Pathol* 1991; 139: 1239-1244.

Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia – critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-192.

Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ et al. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol* 1997; 65: 121-129.

Park JS, Rhyu KS, Kim CJ, Kim HS, Han KT, Ahn HK et al. Presence of oncogenic HPV DNAs in cervical carcinoma tissues and pelvic lymph nodes associating with proliferating cell nuclear antigen expression. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 418-423.

Pereira CR, Rosa ML, Vasconcelos GA, Faria PC, Cavalcanci SM, Oliviera LH. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 651-660.

Pham TH, Nguyen TH, Herrero R, Vaccarella S, Smith JS, Nguyen Thuy TT et al. Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer* 2003; 104: 213-220.

Pilch H, Günzel S, Schaffer U, Tanner B, Brockerhoff P, Maeurer M et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in primary cervical cancer and in cancer free pelvic lymph nodes – correlation with clinico-pathological parameters and prognostic significance. *Zentralbl Gynakol* 2001; 123: 91-101.

Peyton CL, Schiffman AT, Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C et al. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3248-3254.

Poka R, Czegledy J. HPV- and node status in cervical cancer long-term results. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 71: 169-172.

Ratnam S, Franco EL, Ferenczy A. Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2000; 9: 945-951.

Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61: 306-311.

Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, Howley PM. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol* 1991; 65: 2739-2744.

Rose BR, Thompson CH, Cossart YE, Elliot PE, Tattersall MH. Papillomavirus DNA and prognosis in cervical cancer (letter). *Lancet* 1991; 337-489.

Rose BR, Thompson CH, Simpson J, Jarrett C, Elliot P, Tattersall M et al. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid as a prognostic indicator in early-stage cervical cancer: a possible role for type 18. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1461-1468.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.

Sanjose S, Alnirall R, Lloveras R, Font R, Diaz M, Munoz N et al. Cervical human papillomavirus infections in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 788-793.

Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz 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: 453-459.

Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S et al. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 49-53.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-964.

Schiffman MH, Kiviat NB, Burk RD, Shah KV, Daniel RW, Lewis R et al. Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 545-550.

Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103: 519-524.

Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistritz S, Kühne-Heid R, Nindl I et al. Screening for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* 2000; 89: 529-534.

Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, Madeleine MM, McKnight B, Galloway DA et al. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1906-1915.

Sellers JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ* 2000; 163: 503-508.

Sellers JW, Pickard L, Gafni A, Goldsmith CH, Jang D, Mahony JB et al. Effectiveness and efficiency of selective versus universal screening for chlamydial infection in sexually active young women. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1837-1844.

Shirasawa H, Tomita Y, Kubota K, Kasai T, Sekiya S, Takamizawa H et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol* 1986; 67: 2011-2015.

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: 621-632.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Molecular Biol* 1975; 98: 503-507.

Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 16-28.

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 1992; 23: 117-128.

Sukvirach S, Smith JS, Tunsakul S, Munoz N, Kesararat V, Opasatian O et al. Population-based human papillomavirus prevalence in Lampang and Songkla, Thailand. *J Infect Dis* 2003; 187: 1246-1256.

Syrjanen K. Natural history of cervical HPV infections and CIN. In: *Papillomavirus infections in human pathology*, New York: Wiley, 2000; 6: 142-166.

Syrjanen S, Shabalova IP, Petrovichev N, Kazachenko VP, Zakharova T, Pajanidi J et al. Human papillomavirus testing and conventional Pap smear cytology as optional screening tools of women at different risks for cervical cancer in the countries of the former Soviet Union. *J Lower Genit Tract Dis* 2002; 6: 97-110.

Syrjanen S, Shabalova IP, Petrovichev N, Kozachenko VP, Zakharova T, Pajanidi J et al. Acquisition of high-risk human papillomavirus infections and PAP smear abnormalities among women in the New Independent States of the former Soviet Union. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 505-511.

Syrjanen S, Shabalova IP, Petrovichev N, Kozachenko VP, Zakharova T, Pajanidi J et al. Clearance of high-risk human papillomavirus (HPV) DNA and PAP smear abnormalities in a cohort of women subjected to HPV screening in the New Independent States of the former Soviet Union (the NIS cohort study). *Obstet Gynecol* 2005; 119: 219-227.

Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Osterlind A, Moi H, Christensen RB et al. Risk factors for HPV infection in women from sexually transmitted disease clinics: comparison between two areas with different cervical cancer incidence. *Int J Cancer* 1998; 75: 1-8.

Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, Mikyskova I, Smahel M, Van Ranst M et al. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18 and 33 virus-like particles. *J Med Virol* 1999; 58: 378-386.

Tase T, Okagaki T, Clark BA, Manias DA, Ostrow RS, Twiggs LB et al. Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 1988; 48: 993-998.

Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jap J Cancer Res* 1991; 82: 524-531.

Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Clifford GM et al. Sexual behavior, condom use and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 326-333.

Van den Brule AJC, Walboomers JMM, du Maine M, Kenemans P, Meijer CJL. Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 48: 404-408.

Veress G, Kónya J, Csiky-Mészáros T, Czeglédy J, Gergely L. Human papillomavirus DNA and anti-HPV secretory IgA antibodies in cytologically normal cervical specimens. *J Med Virol* 1994; 43: 201-207.

Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhász A, Kónya J, Gergely L. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1946-1952.

Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to viral LCR-E6-E7 region. *Virology* 1991; 181: 374-377.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.

Walker J, Bloss JD, Liao SY, Berman M, Bergen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989; 74: 781-785.

Wheeler CM, Parmenter CA, Hunt WC, Becker TM, Greer CE, Hildesheim A et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in cytologically normal women attending the University of New Mexico student health center. *Sex Transm Dis* 1993; 20: 286-289.

Wilczynski SP, Bergen S, Walker J, Liao SY, Pearlman LF. Human papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. 1988; 19: 697-704.

Woodman CB, Collins S, Rollason TP, Winter H, Bailey A, Yates M et al. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 2003; 361: 40-43.

Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78: 1-30.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények

Sápy T, Póka R, Szarka K, Kónya J, Huga S, Hernádi Z. Age-specific prevalence of high-risk human papilloma virus infection in a Hungarian female population with positive cytology. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007; (in press)

IF: 1,273 (JCR 2006.)

Sápy T, Hernádi Z, Kónya J, Lukácskó L. Poor clinical outcome in early stage cervical cancer with human papillomavirus-18 positive lymph nodes. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000; 90(1): 93-95.

IF: 0,703 (JCR 2000.) CIT: 5

Kónya J, Veress G, Juhász A, Szarka K, **Sápy T**, Hernádi Z, Gergely L. Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. J Clin Microbiol. 2000; 38(1): 408-411.

IF: 3,503 (JCR 2000.) CIT: 7

Sápy T, Szikszay Á, Kónya J, Borsos A, Hernádi Z. Human Papillomavírus infekció prevalenciája közel 5 éves anyagunkban. Orv Hetil. 2001; 142(24): 1265-1268.

Sápy T, Hernádi Z, Kónya J, Veress Gy, Czeglédy J. Korai recidíva és fulmináns kórlefordulás HPV 18-pozitív cervixcarcinómában. Magy Nőorv L. 1997; 60(3): 233-235.

Sápy T, Hernádi Z, Lukácskó L, Borsos A. The role of high risk HPV lymph node positivity in the surgical staging of cancer of the uterine cervix. Acta Chir Hung. 1997; 36(1-4): 313-315.

A kutatási területhez kapcsolódó egyéb közlemények

Hernádi Z, **Sápy T**, Kónya J, Veress G, Czeglédy J. Magas kockázatú Humán Papillomavírus (HPV)- pozitív méhnyakrákos betegek kórlefordulásának követése. Orv Hetil. 1997; 138(20): 1249-1253.

Lukácskó L, Hernádi Z, **Sápy T**, Borsos A. The prognostic value of CA-125 in epithelial ovarian cancer patients during and after chemotherapy. Acta Chir Hung. 1997; 36(1-4): 213-214.

Hernádi Z, **Sápy T**, Lukácskó L, Borsos A. Second-look surgery (SLO) in the management of carcinoma of the ovary. Acta Chir Hung. 1997; 36(1-4): 128-129.

Hernádi Z, Lukácskó L, **Sápy T**, Borsos A. Petefészekrákos betegek cyclophosphamid és cisplatin (CP) kombinált kemoterápiája Amifostine (WR-1065) védelemben. Magy Nőorv L. 1998; 61: 489-496.

Szarka K, Veress G, Juhász A, Kónya J, **Sápy T**, Soós G, Hernádi Z, Gergely L. Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. *Anticancer Res.* 2000; 20(3B): 2161-2167.

IF: 1,331 (JCR 2000.) CIT: 11

Hernádi Z, Huga S, Lukácskó L, Krasznai Z, **Sápy T**, Borsos A. Second-line Taxol treatment of ovarian cancer patients refractory to first line platinum-based chemotherapy. *Dzem Gin.* 2000; 2: 29-32.

Sápy T, Lampé L. Terhességgel szövődött méhnyakrák érdekes esete. *Magy Nőorv L.* 2001; 64: 421-423.

Hernádi Z, Huga S, Lukácskó L, Krasznai Z, **Sápy T**. Rezisztencia a petefészekrákos betegek platina-bázisú kemoterápiája során – a paclitaxel, mint kezelési lehetőség. *Magy Nőorv L.* 2001; 64: 249-254.

Szőke K, **Sápy T**, Krasznai Z, Hernádi Z, Szládek G, Veress G, Dillner J, Gergely L, Konya J. Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities. *J Med Virol.* 2003; 71(4): 585-592.

IF: 2,371 (JCR 2003.) CIT: 1

Hernádi Z, Szarka K, **Sápy T**, Krasznai Z, Veress G, Póka R. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow up. *BJOG.* 2003; 110(2): 205-209.

IF: 1,191 (JCR 2003.) CIT: 3

Hernádi Z, **Sápy T**, Krasznai Z. The prevalence of the HPV 16 genome, integrated viral status and p53 genotype in cervical cancer population of north-eastern Hungary, the correlation with the established markers of tumour progression. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 113(1): 83-86.

IF: 0,955 (JCR 2004.) CIT: 1

Hernádi Z, Szőke K, **Sápy T**, Krasznai Z, Soós G, Veress G, Gergely L, Kónya J. Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 118(2): 229-234.

IF: 1,141 (JCR 2005.) CIT: 3

Hernádi Z, Gazdag L, Szőke K, **Sápy T**, Krasznai Z, Kónya J. Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006; 125(1):114-119.

IF: 1,273 (JCR 2006.)

Összesített impakt faktor: 13,741

Független citációk: 31

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó folyóiratban megjelent kongresszusi előadások

Hernádi Z, **Sápy T**, Czeglédy J. HPV-infekció mint prognosztikai tényező. *Magy Onkol.* 1995; 115. Suppl.

Hernádi Z, **Sápy T**, Veress Gy, Kónya J, Czeglédy J. Follow-up results of cervical cancer patients with high-risk HPV-positive status. *C Eur Assoc Gynec Obstet.* 1997; 110. Suppl.

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

Sápy T., Hernádi Z., Czeglédy J.: Méhnyakrákos betegek kórlefolyása különböző HPV típusú infekciók esetén. Fiatal Szülész és Nőgyógyász Orvosok Tudományos Ülése, Miskolc, 1995. szeptember 29-30.

Hernádi Z., **Sápy T.**, Czeglédy J.: HPV-infekció mint prognosztikai tényező. Magyar Onkológusok Társasága XXI. Nemzeti Kongresszus, Pécs, 1995. november 9-11.

Sápy T.: A HPV-infekció prognosztikai szerepe méhnyakrákban. DOTE PhD és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen, 1996. március 21-23.

Sápy T.: Sikeres terhesség korai stádiumú méhnyakrák konzervatív terápiáját követően. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekciója XII. Tudományos Ülése, Debrecen, 1996. április 26-27.

Sápy T.: Méhnyakrákos betegek hisztológiailag negatív, de Human Papillomavírus-18 pozitív nyirokcsomói rossz prognózisra utalnak. DOTE PhD és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen, 1997. március 6-8.

Sápy T.: Videokolposzkópia., Újabb ismeretek a szülészeti-nőgyógyászatban – Továbbképző tanfolyam. Debrecen, 1997. március 12.

Sápy T.: A méhnyakrákos betegek hisztológiailag negatív, de Human Papillomavírus-18 pozitív nyirokcsomói rossz prognózisra utalnak. (I. helyezés) Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 1997. április 24.

Sápy T., Hernádi Z., Lukácskó L., Borsos A.: The role of high risk HPV lymph node positivity in the surgical staging of cancer of the uterine cervix. XVI. Kísérletes Sebészeti Kongresszus, Debrecen, 1997. szeptember 25-27.

Sápy T., Hernádi Z., Kónya J., Gergely L.: Human Papillomavírus fertőzés kimutatása nukleinsav hibridizációs technikával. Magyar Nőorvos Társaság Északkelet-magyarországi Szakcsoportjának Tudományos Ülése, Berettyóújfalu, 1999. október 15.

Sápy T.: Human Papillomavírus fertőzés kimutatása nukleinsav hibridizációs technikával. Magyar Nőgyógyász Onkológusok Társasága II. Kongresszusa, Budapest, 1999. december 10-11.

Sápy T., Hernádi Z., Kónya J.: Human papillomavírus kimutatása cervikális kenetektől nukleinsav hibridizációs módszerrel. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekciójának XV. Kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2000. június 15-17.

Sápy T.: A méhnyakrák szűrésének újabb szempontjai – a HPV diagnosztika jelentősége. Nőgyógyászati malignómák korszerű diagnosztikája és terápiája, Szakreferátum, Debrecen, 2000. december 15.

Sápy T., Kónya J., Hernádi Z.: Onkogén HPV típusok előfordulása Klinikánk járóbeteg körében, MOT Nőgyógyászati Szekciója Továbbképző Ülése, Budapest, 2001. október 5.

Sápy T., Kónya J., Hernádi Z.: Humán papillomavírus-infectio praevalenciája öt éves anyagunkban. Magyar Nőorvos Társaság XXVII. Nagygyűlése, Budapest, 2002. augusztus 28-31.

Sápy T.: A méhnyakrák szűrésének újabb szempontjai, a HPV diagnosztika szerepe. V. Zempléni Őszi Orvosnapok, Sátoraljaújhely, 2002. október 4.

Kónya J., **Sápy T.**, Szőke K., Szládek Gy., Hernádi Z., Gergely L.: Predictive value of human papilloma virus (HPV) testing for incident and recurrent cervical intraepithelial neoplasia (CIN). 20th International Papillomavirus Conference, Paris, 2002. október 4-9.

Sápy T.: Terhességgel szövődött méhnyakrák érdekes esete. Magyar Nőorvos Társaság Északkelet-magyarországi Szakcsoportjának Kongresszusa, Mátészalka, 2002. október 10-12.

Sápy T.: A méhnyakrák szűrésének újabb szempontjai, a HPV diagnosztika szerepe. Szülészeti-Nőgyógyászati Prevenációs Tudományos Társaság Továbbképző, Debrecen, 2003. január 17.

Sápy T.: A méhnyakrákszűrés továbbfejlesztése, hatékonyságának növelése – HPV vizsgálatok preventív értéke, Nőgyógyászati Onkológia – Képzés és továbbképzés, a szakterület szerepe a daganatos halálozás csökkentésében, rákszűrés, tudományos ülés, Debrecen, 2003. február 14.

Sápy T.: Nőgyógyászati daganatok szűrése, korszerű méhnyakrák szűrés, ÁNTSZ háziorvosi szakmai nap, Debrecen, 2004. október 18.

Sápy T.: Genitális HPV infekciók. Cervicalis rákmegelőző állapotok diagnosztikája c. továbbképző tanfolyam, Debrecen, 2004. november 8-11.

Sápy T., Kónya J., Hernádi Z.: A HPV infekciók epidemiológiája – Hospital based epidemiology. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVI. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2005. október 14-15.

Hernádi Z., **Sápy T.**, Krasznai Z., Kónya J.: A HPV genom azonosítása és annak prognosztikai jelentősége a méhnyakrák kialakulása és progressziója különböző stádiumaiban. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVI. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2005. október 14-15.

Huga S., **Sápy T.**, Krasznai Z., Óvári L., Hernádi Z.: Az előrehaladott stádiumú méhnyakrák különböző protokollok szerint végzett radio-kemoterápiájának tapasztalatai. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVI. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2005. október 14-15.

Sápy T.: Genitális HPV infekciók. Cervicalis rákmegelőző állapotok diagnosztikája c. továbbképző tanfolyam, Debrecen, 2005. november 28-December 1.

Sápy T.: Az onkológia családorvosi vonatkozásai. Családorvosképzés, Debrecen, 2006.

Sápy T.: Genitális HPV infekciók. Cervicalis Rákmegelőző Állapotok Diagnosztikája c. Tanfolyam, Debrecen, 2006. november 27-30.

Gazdag L., **Sápy T.**, Hernádi Z.: HPV-pozitív betegek biopsziás mintáinak elemzése. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVII. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2007. március 23-24.

Krasznai Z., Gazdag L., Szőke K., **Sápy T.**, Kónya J., Hernádi Z.: A HPV asszociált kockázat időtartama a magas fokú CIN kialakulására. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVII. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2007. március 23-24.

Hernádi Z.: Krasznai Z., Gazdag L., Szőke K., **Sápy T.**, Kónya J.: A HPV típus-specifikus meghatározásának jelentősége a CIN sebészeti kezelését követően. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVII. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2007. március 23-24.

Sápy T., Hernádi Z.: A magas kockázatú HPV-infekció és a méhnyakrák kapcsolatát alátámasztó epidemiológiai adatok régióinkban. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpatológiai Szekció XVII. Tudományos Ülés, Hajdúszoboszló, 2007. március 23-24.

TÁRGYSZAVAK

- human papillomavírus (HPV) /human papillomavirus (HPV)/
- korfüggő prevalencia /age-specific prevalence/
- Hybrid capture /Hybrid capture/
- havi *clearance* ráta /monthly clearance rate/
- kismedencei nyirokcsomók /pelvic lymph nodes/
- prognosztikai faktor /prognostic indicator/
- polimeráz láncreakció (PCR) /polymerase chain reaction (PCR)/
- restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP)
/restriction fragment length polymorphism (RFLP)/

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek, Hernádi Zoltán professzor úrnak, a DEOEC Női Klinika Onkológiai Tanszék vezetőjének, aki felkeltette tudományos érdeklődésemet, nőgyógyászati onkológiai elméleti és gyakorlati ténykedésem meghatározója, eddigi pályafutásomon önzetlen mentora volt.

Köszönettel tartozom Póka Róbert tanár úrnak, akitől megtanultam a tudományos munka nemzetközi prezentációjának igényes kivitelezését. Bátorítói szavai újra és újra erőt adtak a tudományos munkához.

Hálásan gondolok Batár István tanár úrra, aki a türelmes, körültekintő, a betegek érdekeit mindenkor szem előtt tartó munkára hívta fel a figyelmemet.

Lampé László, első intézetvezető professzorom megtanított a méltóságteljes orvoslásra, emberi és szakmai tanácsainak sokat köszönhetek.

Köszönetet mondok Borsos Antal és Tóth Zoltán professzor uraknak, akik lehetővé tették számomra, hogy intézetükben magas szintű tudományos és gyakorlati munkát végezzek.

Köszönöm Kónya József tanár úrnak, Czeglédy Judit tanárnőnek, Szőke Krisztina és Szarka Krisztina adjunktusoknak és a virológiai labor összes munkatársának, hogy interdiszciplináris kutatásaim odaadó segítői voltak.

Köszönöm a Nőgyógyászati Onkológiai Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának, hogy munkámat mindenkor segítették és támogatták.

Külön köszönetet mondok a Citológiai Labor minden munkatársának, hogy értékes munkájukkal hozzájárultak az adatgyűjtéseimhez.

Végül, de elsősorban szeretnék köszönetet mondani családomnak; szüleimnek, feleségemnek és gyermekeimnek, hogy nőgyógyászati pályafutásom mindenkori támogatói voltak és elnézésüket kérem, hogy azt az időt, amit elméleti és gyakorlati képzésemre fordítottam, nem töltöttem velük.

FÜGGELÉK