

Human papilloma vírus (HPV) tipizálás és újonnan kifejlesztett HPV kimutatási eljárások, illetve a HPV triage-ban új potenciálisan alkalmazható biomarkerek vizsgálata a méhnyaki elváltozások diagnosztikájában

Doktori értekezés

Dr. Benczik Márta Judit

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sobel Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Szánthó András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Erika, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Vásárhelyi Barna, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Györffy Balázs, D.Sc., tud. főmunkatárs

Dr. Folyovich András, Ph.D., oszt. vez. főorvos

Budapest
2018

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	9
1.1. A human papilloma vírus (HPV, human papillomavirus) kóroki szerepe a cervikális carcinoma és rákmegelőző állapotaiban	9
1.1.1. A HPV fertőzés szerepe a méhnyakrák etiológiájában	9
1.2. A cervikális hrHPV fertőzés kockázati tényezői	14
1.3. A hrHPV fertőzések prevalenciája	15
1.4. A méhnyakrák megelőzés és szűrés jelentősége	16
1.5. HPV teszt jelenleg javasolt alkalmazásai	21
1.6. Biomarkerek a cervikális carcinoma és rákmegelőző állapotaiban	23
1.7. Virális markerek	24
1.7.1. HPV tipizálás	24
1.7.2. E6/E7 mRNS	24
1.7.3. HPV DNS-metiláció	25
1.7.4. HPV fehérjék	25
1.8. Humán celluláris markerek	26
1.8.1. Fehérje expresszió	26
1.8.2. p16 ^{INK4a}	26
1.8.3. Claudin-1	28
1.8.4. micro-RNS-ek	29
1.8.5. Humán génexpressziós biomarkerek – mRNS	30
1.8.6. Humán metilációs biomarkerek	30
2. Célkitűzések	32
3. Módszerek	33
3.1. PhD dolgozat tárgyában végzett saját munka	35
3.1.1. Full Spektrum HPV Amplifikációs és Detektáló teszt és genotipizálás (Full Spectrum L1F/L1R-HPV) epidemiológiai vizsgálatai	35
3.1.1.1. Genoid Laboratórium HPV tipizálási eredményei 2005/2006-ban (176)	35

3.1.1.2. A női szexmunkások illetve egy kontrollcsoport összehasonlító vizsgálata a szexuális szokások és a cervikális, anális és pharyngeális HPV fertőzés előfordulásának gyakorisága közötti összefüggések tanulmányozása céljából (178).....	36
3.1.2. Új real-time PCR alapú HPV teszt fejlesztése és klinikai vizsgálatai.....	37
3.1.2.1. MBRT-HPV (179)	37
3.1.2.2. MBRT-HPV-ABI (180)	37
3.1.3. HPV triage-ban potenciálisan alkalmazható biomarker vizsgálatok.....	38
3.1.3.1. Caludin1 (145)	38
3.1.3.2. miRNS (154).....	40
3.2. PhD dolgozat tárgyában szerzőtársaim által végzett munka.....	40
3.2.1. A női szex munkások illetve egy kontroll csoport összehasonlító vizsgálata a szexuális szokások és a cervikális, anális, és pharyngeális HPV fertőzés előfordulásának gyakorisága közötti összefüggések tanulmányozása céljából (178).....	40
3.2.2. Új real-time PCR alapú HPV teszt fejlesztése és klinikai vizsgálatai.....	41
3.2.2.1. MBRT-HPV (179)	41
3.2.2.2. MBRT-HPV-ABI (180)	43
3.2.3. HPV triageban potenciálisan alkalmazható biomarker vizsgálatok	45
3.2.3.1. Caludin1 (145)	45
3.2.3.2. miRNS (154).....	45
4. Eredmények	47
4.1. HPV tesztek klinikai alkalmazása, epidemiológiai eredmények	47
4.1.1. HPV genotípusok Magyarországon a Genoid laboratórium 2005/2006-ban végzett 12354 vizsgálata alapján (176).....	47
4.1.2. Human papillomavirus fertőzések a magyar női szexmunkások körében (178).....	50
4.1.3. MBRT-HPV teszt fejlesztése és klinikai validálása.....	51
4.1.3.1. CERVIVA study eredmények: Full Spectrum L1F/L1R-HPV és MBRT-HPV-ABI összehasonlító vizsgálata (180).....	55
4.2. CLDN1 immunfestés, mint a cervikális citológia és hisztológia biomarkere (145)	59
4.3. A micro-RNS (miR) expressziós profilok vizsgálata az adenocarcinoma (AC) és a laphám carcinoma (SCC) mintákban (154).....	67
5. Megbeszélés.....	72
6. Következtetések	90
7. Összefoglalás	94
8. Summary	95

9. Irodalomjegyzék.....	96
10. Saját publikációk jegyzéke.....	124
11. Köszönetnyilvánítás	126

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	kifejtett rövidítés	kifejtett rövidítés magyar nyelven
AC	adenocarcinoma	adenocarcinoma
ADRA1D	alpha-1A-adrenergic receptor	alfa-1A-adrenerg receptor
AGC	atypical glandular cells	atípusos mirigyhámsejtek
AGC-neoplastic	atypical glandular cells, suspicious for AIS or cancer	atípusos mirigyhám sejtek, gyanúsak AIS-re vagy rákra
AGC-NOS	atypical glandular cells not otherwise specified	nem meghatározott atípusos mirigyhám sejtek
AIS	adenocarcinoma <i>in situ</i>	adenocarcinoma <i>in situ</i>
AJAP1	adherens junctions associated protein 1	adherens junctions associated protein 1,
ASCCP	American Society for Colposcopy and Cervical Pathology	Amerikai Kolposzkópos és Méhnyak Patológiai Társaság
ASCH	atypical squamous cells – cannot exclude HSIL	atípusos laphámsejtek - nem zárható ki a HSIL
ASCP	American Society for Clinical Pathology	Amerikai Klinikai Patológiai Társaság
ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance	atípusos laphámsejtek meghatározható ok nélkül
ATHENA	Addressing the Need for Advanced HPV Diagnostics	A fejlett HPV diagnosztika szükségességének vizsgálata
BIRC5	survivin	survivin
BPIFB1	bactericidal/permeability-increasing-fold-containing family B member 1	bactericidal/permeability-increasing-fold-containing family B member 1
CADM1	cell adhesion molecule 1	cell adhesion molecule 1
CAP	College of American Pathologists	Amerikai Patológusok Kollégiuma
CDK4	cyclin dependent kinase 4	cyclin dependent kinase 4
CDKN2	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CERVIVA	Irish Cervical Screening Research Consortium	Ír Méhnyakszűrés Kutatási Konzorcium
CFS	common fragile site	gyakori törési hely
CIN1	cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 1	cervicalis intraepithelialis neoplasia 1. fokozat
CIN2	cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 2	cervicalis intraepithelialis neoplasia 2. fokozat
CIN2+	CIN2 vagy magasabb fokú displasia	CIN2 vagy magasabb fokú hámelváltozás
CIN3	cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 3	cervicalis intraepithelialis neoplasia 3. fokozat

CIN2/3	cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 2 and 3	cervicalis intraepithelialis neoplasia 2. és 3. fokozatok
CIN3+	CIN3 vagy magasabb fokú displasia	CIN3 vagy magasabb fokú hámelváltozás
CIP2A	cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A	cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A
CIS	carcinoma in situ	karcinóma in situ
CLDN1	claudin 1	claudin 1
COL6A2	collagen Type VI Alpha 2	collagen Type VI Alpha
CpG	cytosine-phosphate-guanine	citozin-foszfát-guanin
Ct	threshold-cycle	ciklus köszöb
CWIUH	Coombe Women and Infants University Hospital	Coombe Női és Gyermekek Egyetemi Kórház
CXCL13	chemokine (C-X-C motif)	chemokine (C-X-C motif)
DNS	desoxyribonukleinsav	desoxiribonukleinsav
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	desoxinukleotid trifoszfát
DSG3	desmoglein 3	desmoglein 3
dT	deoxythymine	desoxi-timin
DTT	dithiothreitol	dithiothreitol
E	early	korai
E2F	transcription factor 2	traskzkripció faktor 2
EDN3	endothelin 3	endothelin 3
EMA	European Medicines Agency	Európai Gyógyszerügynökség
EPO	erythropoietin	eritropoetin
EU	European Union	Európai Unió
FAM	carboxyfluorescein	carboxyfluorescein
FDA	Food and Drug Administration	Élelmiszer- és gyógyszerfelügyelet
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	formalin-fixált, paraffin-beágyazott
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics	Nemzetközi Nőgyógyászati és Szülészeti Szövetség
FS-HPV	Full Spectrum HPV	Full Spectrum HPV
FSW	female sex worker	női szexmunkás
HC2	Hybrid Capture 2	Hybrid Capture 2
HDI	Human Development Index	Humán Fejlettségi Index
HGCIN	high-grade cervical intraepithelial neoplasia	magas fokú cervicalis intraepithelialis neoplasia
HGSIL vagy HSIL	high grade squamous intraepithelial lesion	magas fokú squamous intraepitheliális elváltozás
HPLC	high-performance liquid chromatography	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HPV	human papilloma virus	human papilloma vírus
hrHPV	high risk HPV	magas kockázatú HPV
HRP	horseradish peroxidase	torma peroxidáz
HS3ST2	heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2	heparán-szulfát glükózamin-3-O-szulfo-transzferáz

IC	internal control	belső kontroll
IC	immunocytochemistry,	immuncitokémia
IH	immunohistochemistry,	immunhisztokémia
JOE	xanthene fluorophore with yellow fluorescence	xantén fluorofor sárga fluoreszcenciával
kb.	körülbelül	körülbelül
kbp	kilo base pair	kiló bázispár
KRT78	keratin 78	keratin 78
L	late	késői
LA-HPV	Linear array-HPV	Linear array-HPV
LAST	lower anogenital squamous terminology	alacsonyabb anogenitális laphám terminológia
LBC	liquid based cytology	folyadék alapú citológia
LCR	long control region	hosszú ellenőrzési régió
LEETZ	loop electrosurgical excision of the transformation zone	a transzformációs zóna elektro-kirurgikus kivágása
LGCIN	low-grade cervical intraepithelial neoplasia	alacsony fokú cervicalis intraepithelialis neoplasia
LGSIL vagy LSIL	low grade squamous intraepithelial lesion	alacsony fokú squamous intraepithelialis elváltozás
lrHPV	low risk HPV	alacsony kockázatú
MAGI2	membrane-associated guanylate kinase 2	membránhoz kötött guanilát kináz 2
MAL	MAL family of proteolipids	MOL proteolipidek családja
MASM	morphological reading adjusted scoring method	morfológiai olvasással korrigált pontozási módszer
MBRT	molecular beacon real-time	molekuláris beacon valós idejű
MCA	melting curve analysis	olvasási görbe analízis
MCM5	minichromosoma maintenance 5	minichromosoma maintenance 5
mRNS	messenger-RNS	messenger-RNS
miRNS	micro-RNS	micro-RNS
mtsai.	munkatársai	munkatársai
MMP9	metalloproteinase 9	metalloproteináz 9
MUC5AC	mucin 5AC	mucin 5AC
NA	not applicable	nem kezelhető eset
NA-HPV	kockázati csoportba nem sorolt HPV	kockázati csoportba nem sorolt HPV
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Országos Biotechnológiai Információs Központ
NILM	Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy	negatív az intraepiteliális elváltozásra vagy malignitásra
NTC	no template control	negatív kontroll
OEP	Országos Egészségbiztosítási Pénztár	Országos Egészségbiztosítási Pénztár
ORF	open reading frame	nyitott olvasási keret
p16 ^{INK4a}	protein 16 ^{INK4a}	fehérje 16 ^{INK4a}

Pap	Papanicolaou	Papanicolaou
PAX1	Paired Box 1	Paired Box 1
PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	foszfoinozítid-3-kináz adapter fehérje 1
pKi67	protein Ki67	fehérje Ki67
POU4F3	POU Class 4 Homeobox 3	POU Class 4 Homeobox 3
PP	teljes populáció	teljes populáció
PPV	positive predictive value	pozitív prediktív érték
pRB	protein retinoblastoma	fehérje retinoblastoma
PTE	Pécsi Tudományegyetem	Pécsi Tudományegyetem
PTGDR	prostaglandin D2 Receptor	prostaglandin D2 receptor
PVP	polyvinylpyrrolidone	polivinilpirrolidon
RLU/CO	relative light units/cutoff	relatív fényegységek / cutoff
RNS	ribonukleinsav	ribonukleinsav
rRNS	riboszómális RNS	riboszómális RNS
SCC	squamous cell carcinoma	laphámsejtes carcinoma
SCJ	squamous columnar junction	laphám hengerhám találkozási pontja
SM	simple scoring method	egyszerű pontozási módszer
SOX1	SRY-Box 1	SRY-Box 1
SOX17	SRY-Box 17	SRY-Box 17
SOX8	SRY-Box 8	SRY-Box 8
ST6GAL2	ST6 beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 2	ST6 béta-galaktozid alfa-2,6-sziilil-transzferáz 2
SYT9	synaptotagmin-9	synaptotagmin-9
TET	tetrachlorofluorescein	tetrachlorofluorescein
TEXASRED	sulforhodamine 101 acid chloride	sulforhodamin 101 savklorid
Tm	melting temperature	olvadási hőmérséklet
TOP2A	topoisomerase 2 alpha	topoizomeráz 2 alfa
TP	triage populáció	triage populáció
TP63	tumor protein p63	tumor fehérje p63
TRACE	Triage and Risk Assessment of Cervical Precancer by Epigenetic Biomarker	triage és méhnyakrák kockázatértékelés epigenetikus biomarkerrel
TS	tumor suppressor	tumorszuppresszor
U6 snRNS	U6 small nuclear RNS	U6 kis nukleáris RNS
UTR	untranslated region	nem transzlátált régió
WHO	World Health Organisation	Egészségügyi Világszervezet
ZNF614	zinc finger protein 614	cink ujj-fehérje 614

1. Bevezetés

1.1. A human papilloma vírus (HPV, human papillomavirus) kóroki szerepe a cervikális carcinoma és rákmegelőző állapotaiban

1.1.1. A HPV fertőzés szerepe a méhnyakrák etiológiájában

A HPV kóroki szerepe a méhnyakrák etiológiájában már több évtizede bizonyított (1-4). Az eset-kontroll és HPV prevalenciát vizsgáló tanulmányok adatai szerint a HPV örökítő anyaga (desoxyribonukleinsav, DNS) a carcinoma planocellulare (SCC, squamosus cell carcinoma, laphámsejtes carcinoma,) 96,6%-ában és az adenocarcinoma (AC, mirigyhámsejtes carcinoma) és a kevert típusú carcinomák (SCC+AC) 91,9%-ában kimutatható. (1)

A HPV egy kb. 8000 bázispárból (base pair, bp) álló burokkal nem rendelkező cirkuláris kettős szálú DNS tumor vírus, 72 kapszomerből álló ikozahedrális kapsziddal. A HPV genomja három régióra osztható. Az első szakasz egy körülbelül (kb.) 1000 bp nagyságú, úgynevezett hosszú szabályozó régió (long control region, LCR), mely fehérjét nem kódol, az E2 virális protein és celluláris transzkripciós faktorok kötőhelyeit tartalmazza, illetve ezen a területen található a vírus replikációs origója. A második szakasz, a korai (early, E) régió mintegy 4000 bp hosszú, mely hat nem strukturális fehérjét kódoló ORF-et (open reading frame) tartalmaz (E1, E2, E4^{E1}, E5, E6 és E7), melyek a HPV genom replikációt, a transzkripciót, a sejtciklust, az apoptózist az immunmoduláló folyamatokat szabályozzák, és szerepet játszanak a vírus okozta onkogenezisben. A korai fehérjék (E1, E2, E5, E6, E7) főbb funkciói: az E1 protein a vírusreplikáció iniciációjában és elongációjában játszik szerepet, a vírus genom sejtciklus-függő replikációjáért felel (5); az E2 protein a korai fehérjék transzkripciós szabályozásában játszik szerepet, a HPV16 és 18 LCR-eihez kötődve gátolja az E6 és E7 proteinek transzkripcióját (6, 7), az E1 proteinnel együtt részt vesz a replikáció iniciációjában (8), és elősegíti a vírusgenom bejutását a HPV fertőzött utódsejtekbe (9); az E4^{E1} protein a virion ORF-je ugyan a korai régióban van, azonban a produktív vírusinfekció késői fázisában a differenciált epitheliumban mutatható ki, vélhetőleg a virion sejtéből történő kijutását segíti elő (10); az E5 protein a sejt környezet befolyásolásával indirekt módon elősegíti a genom amplifikációját (11) és a vírusfertőzés

okozta koilocyta sejteltváltozásokat okozó folyamatokban mutatták ki a szerepét (12). Az onkogenitásban szerepet játszó E6 és E7 onkoproteinek egyik legfontosabb feladata, hogy sejtciklust indukálnak, mely fontos a vírus genom replikációjához. Ezen folyamat részeként a HPV E6 protein ubiquitin-függő proteolízis révén a p53 sejtciklust gátló illetve apoptózist indukáló fehérjét hatékonyan eliminálja (13), továbbá a HPV E7 protein a retinoblastoma tumorszupresszor protein (protein retinoblastoma, pRB) degradációjához vezet, miközben hozzá kötődik (14). Az onkogén HPV típusok (high risk HPV, hrHPV) okozta méhnyak carcinoma és adenocarcinoma kialakulásának hátterében a vírus E6 és E7 onkoproteinek overexpresszióját figyelhetjük meg, (15). A HPV genom harmadik, úgynevezett késői régiója (late, L) 3000 bp hosszú, mely az L1 és L2 strukturális fehérjéket kódolja. A vírus késői fehérjéi (L1, L2) az elszarusodó hámban expresszálódnak, melyek csak produktív vírusinfekció estén mutathatók ki, és az újonnan szintetizálódott vírus genom nukleokapszidját képezve viriont hoznak létre. A papilloma vírusok immundomináns epitópjai az L1 fehérjén helyezkednek el. Az L2 protein az L1 kapszid pentamérjeihez kapcsolódva a vírus enkapszidációjában játszik szerepet (16).

Mára több mint 150 humán fertőzést okozó HPV típus teljes szekvenciáját ismerjük. A HPV okozta epithelialis elváltozások úgy tűnik, összefüggést mutatnak a terjedésük és szaporodásuk különbözőségeivel és valószínűleg az immunrendszer és a vírus között létrejövő különböző kölcsönhatásokkal. DNS homológia alapján a papilloma vírusok öt evolúciós csoportba sorolhatók (Alpha-, Beta-, Gamma-, Nu-, Mu-papilloma vírus), mely beosztás jó egyezést mutat epithelialis tropizmusukkal és kóroki szerepükkel egyaránt. Az Alpha-papilloma vírus csoport tartalmazza az alacsony kockázatú (low-risk, lr) nyálkahártya típusokat, melyek nemi szerveken szemölcsöket okoznak, és a magas kockázatú (high risk, hr) nyálkahártya típusokat, melyek cervikális-preneopláziákat és carcinomát, adenocarcinomát okoznak (17). A méhnyakrákot okozó Alfa csoport típusairól jelentős mennyiségű kutatási adat ismert, melyek szerint a méhnyakrák mellett egyéb epithelialis szövetekben, mint vagina, anus, penis, oropharynx területén kialakuló rákokban is szerepet játszanak (18). A World Health Organisation (WHO) 12 HPV típust (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) sorol a hrHPV csoportba. Ezen típusokon kívül még nyolc HPV típusról (26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 és 82) bizonyított egyedi esetekben, archív mintákon patogén szerepük, mely alapján a feltételezetten hrHPV típusok csoportjába sorolják őket, és közülük a HPV66 és HPV68 típusokat egyes HPV

tesztek a 12hrHPV típusal együtt kimutatják. Mindeközéig nem áll rendelkezésünkre kellő mennyiségű indikáció a feltételezetten hrHPV típusok populációs szintű szűrőprogramokban való alkalmazására (19, 20). Alacsony kockázatu törzsek (HPV 6, 11, 42, 43, és 44) condyloma és alacsony fokú méhnyaki elváltozásokkal társulnak, mint például az enyhe fokú diszplázia (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) (17 198, 21 395) Az alacsony kockázatu HPV-fertőzés okozta elváltozások nagy valószínűséggel regrediálnak, és nem tartják őket vagy csak kis mértékben tekintik őket onkogén kockázatuaknak (22). A nemi szemölcsökben (condylomákban) leggyakrabban előforduló lrHPV típusok prevalenciája az ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) vagy súlyosabb fokú (ASCUS+) citológia mintákban a HPV 6 és HPV11 esetén 0,2% (HPV 6/11 önmagában) illetve 0,7% (beleértve a HPV 6/11-et más lrHPV vírus törzsekkel való együttes fertőzéseket) értéket mutatott egy olaszországi tanulmányban (23). Egy svéd tanulmány szerint nemi szemölcsökben a leggyakoribb nemi úton terjedő lrHPV a HPV6, ahol condylomák kilencvennégy százaléka genitális HPV genotípusokat tartalmazott, amelyek közül a HPV6 (62%), a HPV16 (13%) és a HPV11 (10%) volt a leggyakoribb (24). A condyloma éves incidenciája a fejlett országokban 0,1-0,2%, a tinédzser és a fiatal felnőtt korosztályban kicsúcsosodó értékekkel (25).

A HPV elsősorban szexuális úton terjedve mikrosérüléseken keresztül és a differenciálatlan bazális sejteket fertőzi meg a hámban. A HPV életciklusa a hámban zajló differenciálódási folyamatok függvényében zajlik. A produktív vírusfertőzés során a virion mikroszkopikus hámsérüléseken keresztül a hám alsó rétegében található osztódó stratum basale hámsejteket fertőzi meg. A fehérje burkát elveszítve (dekapszidáció) a sejtmagba kerülő virion DNS genomja kis kópiaszámúban amplifikálódik, majd a sejtciklussal együtt replikálódik (maintenance). A nagy kópiaszámú eredményező produktív fertőzés csak a terminálisan differenciálódott hámsejtekben jelentkezik (26). Az esetek egy részében a fertőzött sejt magjában a HPV DNS alacsony kópiaszámúban perzisztál (episzomális formában), csak a korai virális fehérjéket expresszálva (E6, E7). Az E6/E7 korai vírusfehérjék szerepe, hogy sejtciklust indukáljanak a hám felsőbb rétegeiben a már differenciálódásra elkötelezett keratinocitákban - melyek normál esetben már nem lennének szaporodóképesek - annak érdekében, hogy megsokszorozzák a genomjukat és fertőző víruspartikulákba csomagolják őket. Ahhoz, hogy ezt

megtehessék a vírus korai fehérjéi (E6, E7, E5) szükségesek, melyek megzavarják a sejtciklus szabályozást és gátolják a sejt apoptózis válaszát a szabályozatlan DNS replikációra. A lrHPV típusokkal ellentétben a hrHPV típusok a hám felső rétegén kívül a fertőzött bazális sejtekben is képesek E6/E7 expresszióra (ismeretlen okokból), mely a bazális sejtek szaporodását stimulálja (26).

A replikációhoz hasonlóan a vírus által kódolt gének expressziója is szabályozottan változik a fertőzött epithel bazális sejtjeinek felszín felé irányuló migrációjával. Míg az alsóbb epithel rétegekben a vírus E6 és E7 fehérjéinek az expressziója megzavarja a sejtciklus szabályozását, indukálja a sejtciklus S fázisát, amely a vírus DNS amplifikációjának kedvez és a vírus az életciklusának produktív fázisába lép, addig a vírus késői fehérjéi (L1, L2) az elszarusodó hámban expresszálódnak a vírus E4^{E1} fehérjéjével együtt, ahol az újonnan szintetizálódott vírus genom kapszidációját az L1 proteinek az L2 közvetítésével összeállnak virionná. A vírus érése a hám legfelső elhaló keratinocita rétegében zajlik, ahol a vírus L1 proteinjei között diszulfid kötések alakulnak ki, mely stabil, fertőzőképes vírust eredményez. Ezt követően az E4^{E1}protein a keratin struktúra megzavarásával segíti a vírus kiszabadulását a sejtekből, illetve a vírusok a hám felső rétegében lévő sejtekkel (stratum spinosum felső rétege, stratum granulosum vagy stratum planocellulare) együtt lesodródhatnak (26). A virion a kiszáradásra rezisztens, fertőzőképességét a külvilágban több napig megőrzi (27).

A produktív HPV fertőzés klinikailag lehet tünetmentes vagy benignus hiperproliferatív elváltozásokat okozhat a hámban. Ha a laphám permisszív a virion termelésre, az elváltozások átmenetiek, morfológiailag alacsony fokú elváltozást okoznak (cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 1, CIN1, illetve LSIL), mely túlnyomó többségben klinikailag tünetmentes marad. A produktív HPV fertőzés okozta léziók sejt-közvetített immunválasz segítségével eliminálódnak, nem okoznak a sejtekben szabályozatlan génexpressziót (26).

Az abortív fertőzésben a korai gének (E6, E7 fehérje) folyamatosan expresszálódnak a hám minden rétegében, míg a késői fehérjék génjei nem expresszálódnak, így nem tud befejeződni a vírus életciklusa. A kutatások alapján mára ismert, hogy a virális onkogén túltermelése (E6, E7 fehérje) sejtburjánzást indukál, mely klinikailag tartós vírus kimutathatóságot, azaz perzisztáló vírusfertőzést eredményez. A HPV-laphám kölcsönhatás eredményeként a vírus génexpressziója és a laphám

differentiációja közötti koordinált egyensúly felbomlik, melyre morfológiailag a rákmegelőző léziók a jellemzők (cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 2, CIN2; cervicalis intraepithelialis neoplasia grade 3, CIN3). A rákos elfajulás összefüggést mutat a perzisztáló hrHPV fertőzéssel és a szabályozatlan vírus gén expresszióval, ami a fertőzött sejtekben túlzott sejtproliferációt indukál és a DNS-repair folyamatok elégtelenségéhez és a genetikai sérülések halmozódásához vezet. A HPV16 fertőzés átlagosan tovább perzisztál, mint a többi hrHPV, ez lehet az oka annak, hogy a HPV16 legnagyobb százalékban mutatható ki a rákokban (26).

A CIN2/3 léziókban megfigyelt szabályozatlan E6/E7 expresszió elősegíti az epizomális vírus DNS integrációját a sejt kromoszómájába, amely tovább deregulálja az E6 és E7 gének expresszióját. Nem teljesen ismert, hogy a korai CIN elváltozásokban az epizomális virion génextpressziója miként válik deregulálttá. A kutatási eredmények felvetik a hormonális hatások és epigenetikai változások szerepét. Megfigyelték, hogy a HPV16 LCR estrogen response elementeket (gén promóterében elhelyezkedő rövid DNS szakaszok, melyek ösztrogén függő módon a génextpressziót szabályozzák) tartalmaz illetve az LCR DNS-metilációja a betegség súlyosságával együtt változik, mely hatásoknak szerepe lehet a megváltozott vírus génextpresszió szabályozásban (28-33). A HPV DNS integrációja a gazdasejt genomjába a common fragile site (CFS), azaz minden egyénben előforduló, törékeny kromoszómális régiókon történik legvalószínűbben (34). A HPV genom kromoszómális integrációja a HPV16 okozta rákok 70%-ban kimutatható, azonban 30%-ában a vírus kizárólag epizomálisan helyezkedik el (35). A HPV genom integrációja olykor olyan vírus gének (E1, E2) sérülését okozza, amelyek feladata az LCR transzkripció szabályozása lenne. Az E1 vagy E2 gének sérülése az E6/E7 génextpresszió szabályozásának elvesztésével jár, mely folyamatos, emelkedett E6/E7 expressziót eredményez, mely a genetikai instabilitásnak (36) és a rák kialakulásának kedvez.

A HPV okozta onkogén sejttranszformáció Herf és munkatársai (mtsai.) szerint gyakorlatilag kizárólag egy bizonyos sejt populációban alakul ki a cervix ecto-endocervikális squamous columnar junction (SCJ) területén (37), mely sejtek egyedi génextpressziót mutatnak, és az elváltozás műtéti eltávolítása után nem regenerálódnak. A vizsgálat eredményei a méhnyakrák megelőzés potenciális célpontját tárták fel, mely a méhnyakelváltozások kockázatértékelésének eszköze lehet, és modellként szolgálhat a hrHPV fertőzést követő rákkeltő folyamatok felderítéséhez.

A hrHPV életciklusa hasonló a lrHPV-hez, azonban a két víruscsoport jelentősen különböző mértékben képes a bazális és parabazális sejtrétegben a sejtciklust és a sejtek proliferációját indukálni. Ez részben összefüggést mutathat azzal, hogy a hr és lrHPV E6 fehérjéi a p53 és a PDZ domain fehérjék kötődése különböző, illetve, hogy a hr és lrHPV E7 fehérjék affinitása különböző a pRB család fehérjéihez (p105, p107, p130). A hrHPV a targetjeit ubiquitinálási lebontó folyamatok segítségével bontja le (38).

1.2. A cervikális hrHPV fertőzés kockázati tényezői

A hrHPV típusok nem egyforma mértékben hordoznak carcinogén kockázatot (39). Castle és mtsai. a costa ricai HPV pozitív nőbetegeken egy rövid távú prospektív vizsgálatában megállapította, hogy a hrHPV típusok perzisztáló fertőzése (főleg a HPV16) összefüggést mutatnak az elkövetkező 3-5 évben kialakuló CIN2 vagy súlyosabb fokú elváltozások kialakulásával (40). Azóta több follow-up vizsgálatban meghatározták az egyes hrHPV típusok okozta rák illetve rákmegelőző állapotok kockázatát (41, 22, 42-45). Kjaer és mtsai 8656 nőbeteg végzett hosszú távú prospektív vizsgálatában (22) 12 éves utánkövetés eredményei alapján határozták meg azoknak az eseteknek a HPV típusokra vonatkozó CIN3 vagy súlyosabb fokú (CIN3+) hisztológia abszolút kockázatát, amely betegekben normál citológiájú, frissen kimutatott HPV pozitív fertőzés igazolódott, illetve perzisztáló HPV fertőzés (kétéves intervallumban egymás követően pozitív HPV eredmény) állt fent. A HPV típusok közül a HPV16 típus specifikus CIN3+ abszolút kockázata volt a legnagyobb friss fertőzés esetén 26,7% (95% CI: 21,1-31,8%). A HPV16-ot követte a HPV18 19,1% (95% CI: 10,4-27,3) és a HPV31 14,3% (95% CI: 9,1-19,4%) majd a HPV33 14,9 (95% CI: 7,9-21,1%). A többi hrHPV típus együttes kockázata 6,1% (95% CI: 3,8-8,3%) volt összesen, míg a negatív HPV teszt 3,0% kockázatot jelentett a CIN3+ 12 éven belüli kialakulására. A 2 éven belüli ismételt HPV16 pozitivitás jelentős, 47% (95% CI: 34,9-57,5%) kockázatot jelentett a 12 éven belüli CIN3+ elváltozás kialakulására. A HPV16 perzisztáló fertőzés esetében tapasztalt magas CIN3+ abszolút kockázat felveti a HPV tipizálás jelentőségét a méhnyakrák szűrésben. Mindezt szintén alátámasztotta az ATHENA study 3 éves utánkövetés vizsgálatában a 30 év feletti korosztályokban a negatív citológia eredménnyel társuló HPV16 fertőzésben kimutatott 8,2% (95% CI: 5,8-11,4%) CIN3+ abszolút kockázat (43).

1.3. A hrHPV fertőzések prevalenciája

A HPV prevalencia a normál citológiájú nőkben korosztályi és földrajzi különbségeket mutat, mely világ átlagban 11,7%, és a legmagasabb a sub-saharai Afrikában (24%), kelet-Európában (21,4%), és Latin-Amerikában (16,1%) (46, 47, 2). A HPV fertőzés korosztályi ingadozást mutat, miszerint 25 éves kor alatt a legmagasabb a fertőzöttek aránya, mely a korral együtt haladva folyamatosan csökkenő tendenciát mutat, majd 45 éves korban egy újabb csúcsot ér el. Az ATHENA (Addressing the Need for Advanced HPV Diagnostics) studyban, mely az USA-ban 46601 mintán vizsgálta a cobas[®] HPV teszt diagnosztika szerepét egy prospektív multicentrikus méhnyakrák szűrővizsgálatban, a vizsgálatra bevont betegekben a cobas[®] HPV teszttel mért 14 hrHPV együttes prevalenciája 12,6% volt. Ugyanakkor, a 20-24 évesek 30,5%-ban voltak HPV pozitívak, ami ez a 40-44 éveseknél 7,5%-ra csökkent és 70 év felett csak 5%-ot ért el (48).

Az ATHENA studyban publikált HPV tipizálási eredmények alapján (43) a teljes populációban 10,3% (4220/40901) volt az egyszeresen fertőzöttek HPV prevalenciája. Korosztályi felbontásban az egyszeres fertőzések összes HPV típusra egyesített prevalenciája a 25-29 éves korosztályban volt a legmagasabb, 17,8%, ami fokozatosan csökkent, a 30-39 éveseknél 11,6% és 50 éves korban és felette 6,5%, amely érték a 70 éves korban és felette 5,1%-ra csökkent. A hrHPV típusok közül a HPV16 prevalenciája volt a legmagasabb a teljes korosztályban 1,6%, a 25-29 éveseknél 3,5%, 30-39 évesnél 1,8%, a 40-49 éveseknél 1,1%, 50 éves korban és felette 0,8%. A második legmagasabb prevalenciájú a HPV52 volt 1% prevalencia értékkel a teljes korosztályban vizsgálva. Bruni metaanalízise szerint a HPV típusok eloszlása ugyan változó a világ különböző régiójában, azonban megállapítható, hogy az 5 leggyakoribb típus a világban a HPV-16 (3,2%), a HPV-18 (1,4%), a HPV-52 (0,9%), a HPV-31 (0,8%) és a HPV-58 (0,7%), míg a többi hrHPV típusok prevalenciája 0,6% vagy alatti értéket mutat (46).

Az 1999-ben publikált magyarországi adatok szerint az egészséges nők körében átlagosan 17,5% volt a HPV prevalenciája és a vizsgált régiókban nagy szórást mutatott (Szeged környéke 27%, Budapest 15%) (49). A tanulmányban a korosztályi eloszlás szerinti HPV prevalencia adatok a 20 év alattiakban 32% volt, majd folyamatosan csökkent és 42 év felettekben 10,2%-ot ért el. A HPV típusok citológiai diagnózisok szerinti eloszlásáról Szentirmay készített tanulmányt 2048 Linear Array-HPV teszttel

(Roche, Mannheim, Germany) 2006-2016 között gyűjtött magyarországi citológiai mintán, ahol a HPV16 előfordulása méhnyakrák megelőző állapotokban 30%-kal a leggyakoribb genotípus volt, és a HPV18 a 9. helyen volt ezen listán (50).

Ismert, hogy a HPV prevalencia a cervikális elváltozások súlyossági fokával együtt emelkedik (51). Egy 423 vizsgálatot összefoglaló tanulmányban összehasonlították a HPV prevalenciákat a normál citológiájú (n=230 000) és kóros cervikális elváltozásokat mutató citológiájú betegek mintáiban (n= 103 000, köztük 36 000 invazív rákos eset). A normál citológia, az ASCUS, az LSIL vagy a CIN1 között nem volt jelentős különbség a HPV-genotípus eloszlásban. A HPV16 pozitivitása azonban meredeken emelkedett a normál/ASCUS/LSIL/CIN1 (20-28%), a CIN2/HSIL (40/47%) és a CIN3/CIS (58/63%) citológiai diagnózisok között (52). A három leggyakoribb rákot okozó HPV típust (16, 18, 45) tanulmányozva, a HPV16, 18 és 45 nagyobb vagy egyenlő arányúak voltak a CIS-ben, a normál citológiához képest (CIS: normál arány = 3,07, 1,87 és 1,10), ugyanez a CIN3 esetében más értéket adott (CIS: CIN3 arány 1,08, 2,11 és 1,47). Megállapítható, hogy ez egyes HPV típusok jelenléte különböző arányban változott a rákmegelőző állapotok előrehaladtával: míg a HPV16 esetében megháromszorozódott, a HPV18 esetében kétszerese lett, addig a HPV45 esetében nem változott. Egy másik publikációban is leírták a méhnyaki elváltozás progressziójának függvényében megfigyelhető HPV típusok eloszlásában bekövetkező hasonló változásokat (2).

1.4. A méhnyakrák megelőzés és szűrés jelentősége

A méhnyakrákos esetek számának jelentős csökkenését eredményezte a fejlett országokban (53) a méhnyakrák elsődleges megelőzése, a HPV oltás, illetve a másodlagos megelőzése, a rákmegelőző elváltozások kimutatását célzó méhnyakrák szűrési protokollok alkalmazása. Világviszonylatban azonban a méhnyakrákos esetek száma a rendelkezésre álló hatékony prevenciós módszerek ellenére folyamatosan növekedik, mely 2008-ban a nők körében a harmadik leggyakoribb rák volt, a mellrák és a vastagbélrák után (25). Összességében évente félmillió méhnyakrákot regisztrálnak a világon és nagyjából ezek fele halálos kimenetelű [www.who.int/hpvcentre/en]. A méhnyakrák előfordulása szoros összefüggést mutat a gazdaság fejlettségi szintjével (Human Development Index, HDI). A rákok száma négyszeres különbséget mutat az

alacsony és a magas HDI országok között és az 5 éves túlélés esélye is erősen korrelál a HDI értékkel. Az újabb méhnyakrákos esetek körülbelül 86%-ban és a halálesetek 88%-ban a világ kevésbé fejlett országaiban fordulnak elő (54). Az európai unió (EU) 28 tagállamában 34 000 új méhnyakrákos esetet és 13 000 halálesetet regisztráltak 2012-ben (55). Az EU-hoz 2003 után csatlakozott országokban, köztük Magyarországon is magasabb a méhnyakrák mortalitása az EU átlaghoz képest <http://eco.iarc.fr/eucan/CancerOne.aspx?Cancer=25&Gender=2> (Magyarország: 6.9/100000, EU: 3,7/100000), és a méhnyakrák incidenciája is hasonló képet mutat (Magyarország: 20,5/100000, EU:11,3/100000).

A méhnyakrák szűrés diagnosztikájában a hisztológia a „gold standard” módszer. A cervikális hisztológia a cervixről nyert szövettani minta (biopszia, konizátum) metszeteinek, HE-festéssel végzett mikroszkópos vizsgálata (56, 57). A CAP (College of American Pathologists) - ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) Konszenzus Konferencia munkacsoportjai megállapították, hogy a 2-tagú terminológia (low grade squamous intraepithelial lesion, LGSIL and high grade squamous intraepithelial lesion, HGSIL) tükrözi a legjobban a HPV fertőzés kétféle kimenetelét, az átmeneti, produktív és a perzisztáló, precancerosus elváltozásokat. (58).

A cervikális carcinoma szűrési programok célja, hogy a lehetőleg legkevesbé invazív módszer alkalmazásával, időben felismerjék a magas fokú rákmegelőző hámelváltozásokat (CIN2, CIN3 vagy újabban HGSIL), melyek kezelése sikeresen megakadályozza a rák kialakulását. A szűrés hatékonysága a szűrőteszt szenzitivitásán túl számos egyéb faktortól függhet: (1) CIN 2, 3 léziók különbözősége, melyek közül az adott szűrőmódszer esetleg nem mutatja ki mindegyiket; (2) az idő, ami szükséges ahhoz, hogy a CIN 2, 3 lézióból invazív rák alakuljon ki; (3) a szűrés gyakorisága; (4) a célpopulációban a szűrési lefedettség.

A legelterjedtebben alkalmazott másodlagos prevenciós méhnyakrákszűrő módszer az évenkénti, vagy 2-3 évenkénti (országoként változó gyakorisággal) citológiai kenetvétel a méhnyakról (hagyományos citológiai teszt, Pap teszt vagy folyadék alapú citológiai teszt, liquid based cytology, azaz LBC), mely számos fejlett országban hatékonyan bizonyult a rákos esetek csökkentésére (53). A méhnyaki citológiai kenetvizsgálat során a cervix (endo és ecto) területéről mintavevő eszközzel levett

sejtkenet mikroszkópos vizsgálata történik. A Bethesda klasszifikáció a citológiai elváltozásokat az alábbi kategóriákba sorolja:

Kóros laphámsejtek:

- ASCUS, atípusos laphámsejtek meghatározható ok nélkül (atypical squamous sells (ASC) of undetermined significance)
- ASCH, atípusos laphámsejtek, nem zárható ki HSIL (atypical squamous cells, cannot rule out HSIL)
- LSIL, enyhe fokú laphám-eredetű intraepitheliális lézió (CIN1)
- HSIL, súlyos fokú laphám-eredetű intraepitheliális lézió (CIN2, CIN3, CIS)
- carcinoma planocellulare (laphám sejt eredetű carcinoma)

Kóros mirigyhámsejtek:

- endocervicalis eredetű AGC (atypical glandular cells)
- endometriális eredetű AGC
- mirigyhámsejtek-NOS (not otherwise specified; máskülönben nem részletezett) AGC
- endocervicalis eredetű mirigyhám, inkább rosszindulatú daganat AGC
- mirigyhámsejtek-NOS, inkább rosszindulatú daganat AGC
- mirigyhámsejt eredetű korai rák AIS (adenocarcinoma endocervicalis in situ)
- endocervicalis eredetű adenocarcinoma
- endometriális eredetű adenocarcinoma
- méhen kívüli eredetű adenocarcinoma
- adenocarcinoma-NOS

A citológia legfontosabb limitációja az alacsony szenzitivitása. Egyetlen Pap teszt szenzitivitása a CIN2+ hisztológiára nézve egy európai és észak-amerikai tanulmányokat összefoglaló analízisben 53% volt (59). Azonban ismert, hogy a CIN2/3 lézióból hosszú évek alatt fejlődik ki az invazív rák, ami lehetővé teszi, hogy a citológia alacsony szenzitivitását részlegesen kompenzálni tudjuk a szűrési intervallum csökkentésével, ami viszont megnehezíti annak elérését, hogy minden nő rendszeresen részt vegyen a szűrésben. A fejlett országokban ingyenesen elérhető szűrőprogramok ellenére vannak

nők, akik soha nem jelennek meg méhnyakrák szűrésen (60). A citológia alapú méhnyakrák szűrés korlátozott szenzitivitása miatt a szűrés gyakori ismétlése szükséges, mely ezáltal drága és nehezen fenntartható (61).

A méhnyakrák etiológiájában a HPV ismert szerepét tekintve (3, 4), valamint számos nagy populáción végzett randomizált kontrollált klinikai vizsgálat eredményei alapján (62, 63) elsődleges HPV alapú szűrés a javasolt méhnyakrák szűrő módszer. A primer HPV teszt előnye a magas szenzitivitása és ebből eredően a magas negatív prediktív értéke, miszerint a HPV negativitás extrém alacsony kockázatot jelent a súlyos fokú rákmegelőző lézióra és a rákra (cervical intraepithelial neoplasia, CIN3+) (64). Mindemellett a HPV negativitás a citológiánál hosszabb védelmet nyújt, ugyanis a CIN3+ kockázata nagyon alacsony marad negatív HPV teszt után még 6 évvel is (65). Dillner utánkövetéses tanulmányában a CIN3+ kumulatív előfordulási aránya 6 év után lényegesen alacsonyabb volt a kiinduláskor HPV negatív (0,27%, 95% CI: 0,12% - 0,45%), mint a kiinduláskor negatív citológia eredménnyel bíró nők körében (0,97%, 95% CI: 0,53% - 1,34%). A legújabb európai és amerikai ajánlások a HPV tesztet önállóan, mint elsődleges szűrő tesztet ajánlják, és negatív szűrőteszt eredmény esetén 5 évente, illetve korosztálytól függően, akár 10 évente javasolják alkalmazni (62, 66). A problémát a HPV teszt alacsony CIN3+ specificitása okozza, ugyanis az egyszer elvégzett HPV teszt nem ad információt arról, hogy HPV pozitív esetén átmeneti, produktív vagy perzisztáló fertőzésről van-e szó, ezért kiegészítő (triage) teszt alkalmazása, illetve utánkövetés javasolt HPV pozitívást követően (67).

Az amerikai szakmai kollégiumok által publikált legújabb HPV szűrési protokoll javaslat a HPV pozitív teszt eredményt citológia és HPV16/18 tipizálás tesztekkel egészíti ki (62). A citológia teszt nagy specificitása mutatkozik a legalkalmasabb módszernek az átmeneti HPV fertőzések elkülönítésére a beavatkozást igénylő, nagyobb rák kockázattal járó esetektől, míg a HPV16 és HPV18 típusok magas pozitív prediktív értéke (positive predictive value, PPV) indokolja az alkalmazásukat, és pozitívitásuk esetén kolposzkópia javasolt (62). Az amerikai protokoll a HPV 16/18 típusok meghatározása mellett az egyéb magas kockázatú HPV csoport pozitívítása esetén citológia triage teszt végzését javasolja (62). Az európai javaslatokban a citológia tesztet javasolják minden HPV pozitív esetben kiegészítő vizsgálatként alkalmazni (66). A citológia kellően specifikus teszt, ezért megfelel triage tesztnek, azonban nem elég szenzitív, így nem talál meg minden beteget.

Az amerikai protokollban citológia triage kombinációja a HPV 16/18 tipizálással javítja a citológia szenzitivitását (68).

Magyarországon jelenleg a citológia alapú szűrés a javasolt módszer, melyet az opportunista és szervezett szűrés kombinációjaként alkalmaznak. Boncz és szerzőtársai az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (OEP) által, Magyarországon rutinszerűen gyűjtött finanszírozási adatait elemezte. A 25-64 év közötti női korosztályi adatokat gyűjtötték ki a 2000 és 2002 közötti 3 éves periódusban, mint az opportunista szűrést magába foglaló referencia-időszakot és a 2003 és 2005 közötti 3 évet, mint a szervezett szűrés első szűrési ciklusát (69). A szervezett szűrés első ciklusában minimális (3,7%) szűrési lefedettség növekedést tapasztaltak az opportunista szűréshez képest, az elvégzett citológia vizsgálatok száma 1 667 618-ról 1 749 498-re emelkedett a vizsgált időszakban. Megállapítható, hogy a szervezett szűrés nem eredményezett jelentős hatékonyságbeli növekedést (69). Az európai méhnyakszűrési ajánlásokat követve 2017-ben publikált, és több szakmai fórumon elhangzott javaslat a hrHPV vizsgálat önálló szűrőtesztként való alkalmazására a méhnyakszűrésben Magyarországon (70).

A méhnyakrák megelőzés elsődleges módszere, a HPV oltás széleskörű bevezetése hatékonyan csökkenti a két leggyakoribb rákot okozó HPV típus (HPV16, HPV18) okozta fertőzések és az adott HPV típusok okozta elváltozások, illetve várhatólag a rákok számát. Számos publikáció foglalkozott 2 komponensű (HPV16/18) és a 4 komponensű (HPV6/11/16/18) HPV fertőzést megelőző oltások biztonságosságával és hatékonyságával (71-73). Az European Medicines Agency (EMA) mindkét oltást engedélyezte (4 komponensű: 2006-ban; 2 komponensű: 2007-ben) és 2014-ig az EU 21 tagállamában nemzeti oltó program keretében bevezették a HPV oltást (74). 2016-ban bevezetésre került 9 komponensű HPV oltás, mely 7 hrHPV (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) és 2 lrHPV (6, 11) típust tartalmaz (75). A 7 hrHPV típus együtt a méhnyakrákok 90%-át okozza (76), így az oltottak körében mind a HPV fertőzések mind a méhnyakrákos esetek számának jelentős csökkenése várható. A legújabb EU guideline a méhnyakrák HPV szűrése és HPV oltás témában kiemeli az oltási programok folyamatos monitorozásának és értékelésének szükségességét (66). A HPV oltás hatékonysága ellenére szükséges a méhnyakrák szűrés további fenntartása, mivel a jelenleg alkalmazott oltások a 14 hrHPV típus közül 7 rákot okozó HPV típus ellen nyújtanak hatékony prevenciót (77). A HPV oltás széleskörű elterjedésének hatására idővel a citológia és a

HPV szűrőtesztek teljesítőképessége csökkenni fog az oltott populációban, a betegségek csökkent esetszáma és megváltozott jellege miatt. Az oltott populációban megfigyelhető súlyos fokú esetek csökkenése miatt a citológiai elváltozások várhatóan eltolódnak majd a bizonytalan és alacsonyfokú elváltozások irányába. A HPV teszt esetében is észlelünk majd PPV csökkenést, mivel az oltási típusok okozta fertőzések csökkent száma miatt a rák jelentősen ritkább esemény lesz az oltás hatására, viszont a fertőzések számának csökkenése a HPV teszt pozitivitási rátájában csak kisebb mértékű csökkenést eredményez. Ezek a hatások együttesen a pozitív HPV teszt eredmény PPV-jének csökkenését eredményezik majd. Tehát a jövőbeli szűrési stratégiák tervezésékor érdemes figyelembe venni a szűrő tesztek oltás okozta csökkent hatékonyságát (78).

1.5. HPV teszt jelenleg javasolt alkalmazásai

Számos tesztet fejlesztettek ki a HPV nukleinsav kimutatására cervikális mintából (79), melyek közül a legelterjedtebbeket és a publikációban említett HPV tesztek főbb jellemzőit az 1. táblázatban foglaltam össze. A HPV DNS tesztek közül négy az FDA (Food and Drug Administration) által is elfogadott: Hybrid Capture 2 (HC2) (Qiagen, Hilden, Germany), Cervista HPV HR (Hologic, Marlborough, Massachusetts, United States) (80, 81), Cervista HPV 16/18 (Hologic, Marlborough, Massachusetts, United States), cobas[®] HPV (Roche, Mannheim, Germany). A HC2 egy szilád fázisú hibridizációs teszt, amely szignál amplifikációval, speciális próbák segítségével mutatja ki a 13 onkogén HPV-t. A HC2 teszt az FDA engedélyt ASCUS triageban és primer szűrésben citológiával együttes alkalmazásra kapta (82). A forgalomban lévő HPV tesztek közül a szakirodalom a HC2 tesztet tekinti klinikailag validáltnak, mert a HC2 teszttel végezték a legnagyobb mintaszámú és a leghosszabb utánkövetéses klinikai vizsgálatokat (12 év) eddig (83). A cobas[®] HPV HPV egy real-time PCR alapú teszt, mely a korábban engedélyezett ASCUS triage felhasználás mellé 2014-ben kapott FDA engedélyt, a világon elsőként primer HPV szűrésben való alkalmazásra citológiával vagy anélkül (84, 85). A HPV E6 és E7 mRNS-ét kimutató teszt APTIMA (Hologic, Marlborough, Massachusetts, United States)(86) szintén FDA engedélyt kapott ASCUS triageban és a primér szűrésben citológia melletti alkalmazásra.

1. táblázat: A legelterjedtebben alkalmazott és a dolgozatban tárgyalt HPV tesztek főbb jellemzői. *HR*-high risk; *LR*-low risk; *NHR*-non HR; *IVD CE*-In Vitro Diagnostics- EU certified; *FDA*- Food and Drug Administration; *L1*-late1; *DNS*- desoxyribonukleinsav; *HPV*- human papilloma vírus

Teszt	Gyártó	Target	HPV kimutatás	HPV genotipizálás	IVD CE
cobas® HPV	Roche	L1 DNS	13 HR & 66	16 & 18	✓ (FDA)
Cervista	Hologic	L1 DNS	13 HR & 66	16 & 18	✓ (FDA)
HC 2	Qiagen	teljes genom	13 HR	-	✓ (FDA)
RT HPV	Abbott	L1 DNS	13 HR & 66	16 & 18	✓
Linear Array	Roche	L1 DNS	13 HR & 24 NHR	HR & NHR	✓
APTIMA	GeneProbe	E6/E7 mRNS	13 HR & 66	-	✓ (FDA)
NucliSens EasyQ	Biomerieux	E6/E7 mRNS	5 HR	5 HR	✓
Full Spectrum HPV	GenoID	L1 DNS	13 HR & 66 & 33 NHR	HR & 66 in house	✓
MBRT-HPV	GenoID	L1 DNS	13 HR & 66, 26; 5LR	-	✓
MRRT-HPV_ABI	GenoID	L1 DNS	13 HR & 66, 26; 5LR	16 & 18	in house

A HPV tesztet széles körben alkalmazzák a citológia alapú szűrésben triage tesztként, a bizonytalan citológia diagnózisok esetében, illetve a kezelés utáni surveillance módszereként is (51, 87-89).

Különböző klinikai vizsgálatok eredményei azt igazolták, hogy a HPV teszt a citológiához képest tovább javítja az elsődleges szűrés hatékonyságát (82, 59). A HPV egy érzékeny marker a méhnyakrák kockázatának meghatározására és a citológiánál érzékenyebben képes a magas fokú elváltozásokat kiszűrni (90, 91), így a citológia szűrés alternatívájaként bekerült az ajánlott szűrési protokollokba (62, 66).

1.6. Biomarkerek a cervikális carcinoma és rák megelőző állapotaiban

Elméleti oldalról a progresszió és regresszió háttérében álló biológiai folyamatok azonosítása szolgálhat az objektív cervikális rákdiagnosztika alapjául. A kutatások számos biomarker jelöltet azonosítottak, azzal a céllal, hogy a vírusfertőzés és a cervikális carcinoma progressziójának különböző stádiumait kimutassák. Ezek közé sorolhatóak a vírus nukleinsav, vírus fehérje, illetve a vírus onkoproteinek által indukált gazdasejt változások kimutatása (92, 79, 68, 93) (2. táblázat). Ezek között számos csak tudományos publikáció szintjén ismert, és kereskedelmi forgalomban nem elérhető.

2. táblázat: Biomarkerek módszertani összefoglaló táblázata a méhnyaki patológiában.

Virális markerek	Humán celluláris markerek
• HPV protein <i>L1, E6</i>	• protein (immuncitokémia, immunhisztokémia) <i>p16/Ki67, claudin1, MCM2, TOP2A, MYBL2</i>
• HPV mRNS <i>E6/E7</i>	• microRNS <i>miR-9, miR-127, miR-145</i>
• HPV DNS <i>L1, E1</i>	• génexpresszió, mRNS <i>MCM3, MCM5, CDC6</i>
• HPV DNS-metiláció <i>L1, L2, E2, E4 ORFs</i>	• humán DNS-metiláció <i>DAPK1, CADM1/MAL, SOX1, PAX1</i>

A biomarker tesztek fejlesztése során a magas specificitású és egyúttal kellően szenzitív biomarker tesztek részesítik előnyben, mert alkalmazásukkal lehetségessé válhat az utánkövetéses vizsgálatok visszahívási idejének növelése vagy akár a negatív biomarker teszt eredmény esetén a beteg normál szűrési rendbe való visszatérése (92). A jelenlegi ajánlások szerint az optimális HPV triage teszt kiválasztásához ismernünk kell a tesztek baseline és 3 éves follow-up (utánkövetés) eredményeit. Meg kell határozni az adott triage stratégiára vonatkozóan a kolposzkópiára küldött nők arányát, a baseline és a legalább 3 vagy 5 éves follow-up CIN3+ szenzitivitást, a CIN3+ kockázatot a teszt pozitív és negatív esetekben. A HPV triage protokollok kialakításakor a legújabb ajánlások szerint az adott vizsgálati eredmény vagy eredmények kombinációja alapján a fent említett kockázat alapú elven történik a klinikai döntéshozatal arról, hogy mely esetben kell a beteget kolposzkópiára utalni, mely esetben utánkövetni és mikor térhet vissza a beteg a normál szűrési protokollba (94-96)

1.7. Virális markerek

1.7.1. HPV tipizálás

Egy 1000 rákos szövetet HPV genotipizáló tanulmányban, HPV 16 és 18 genotípusok összesen a méhnyakrákok 64%-ban volt kimutatható (HPV16 50%, HPV18 14%). A laphámsejtes daganatokban a HPV 16 túlsúlyban volt (51%), míg a HPV 18 túlsúlya volt kimutatható az adenokarcinómákban (56%) és jelentős arányban volt jelen az adeno-laphám vegyes daganatokban (39%) is (97).

A citológia negatív és HPV16 genotípussal két évig tartó perzisztáló fertőzés esetében egy 12 éves utánkövetéses vizsgálatban tapasztalt 47%-os (95% CI: 34,9-57,5%) CIN3+ abszolút kockázat alátámasztja a HPV tipizálás jelentőségét a méhnyakrák szűrésben (többi HPV genotípus adatait lásd a HPV fertőzés kockázati tényezői fejezetben) (22). A HPV típusok okozta CIN3+ kockázat az ATHENA studyban vizsgált adatok szerint egyes típusoknál korosztályi különbségeket mutatnak (43). Az ATHENA study három éves utánkövetésben a teljes populációban vizsgálva a HPV16 okozta a legnagyobb CIN3+ abszolút kockázatot mind a nők 25-29 éves és \geq 30 éves korosztályaiban (14,2% és 15,1%), majd ezt követte a HPV31 (8,0% és 7,9%), a HPV52 (6,7% és 4,4%) és a HPV18 (2,7% és 9,0%)(43). Mindez felveti a HPV-tipizálás alapú triage stratégiák korosztályi kategóriákba sorolásának szükségességét a 30 éves és feletti, illetve a 30 év alatti korcsoportokra (98).

1.7.2. E6/E7 mRNS

Az átmeneti fertőzéstől a transzformáló HPV fertőzés progresszióját az E6/E7mRNS és fehérje erősen emelkedett expressziója jellemzi (26). Számos tanulmány vizsgálta az E6/E7mRNS kimutatás szerepét a cervikális kenetmintából a rákmegelőző állapotok diagnosztikájában, melyet Burger és kollégái foglaltak össze a közelmúltban (99). Jelenleg három kereskedelmi forgalomban beszerezhető E6/E7mRNS kimutató technológia érhető el. Az egyik a 14 HPV típust csoportban kimutató APTIMA® (Hologic), melynek klinikai szenzitivitása kicsit alacsonyabb, mint a Hibrid Capture 2 hrHPV (Qiagen), a specificitása viszont magasabb (100). A másik az 5 hrHPV típus kimutatására és tipizálására alkalmas PreTect® Proofer (Norchip), vagy más néven NucliSENS EasyQ® (BioMerieux), mely az adatok alapján specifikusabb, mint az

APTIMA és a HC2, ám kevésbé szenzitív (100). A harmadik az Oncotect (IncellDx) teszt, mely a 13 hrHPV E6/E7 mRNS-ét fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH) és flow citometriával mutatja ki (101). Két kolposzkópos klinikán begyűjtött 1173 mintán hasonlították össze az Oncotect teszt klinikai teljesítőképességét CIN2+ végpontra vonatkoztatva egy hrHPV DNS teszttel, a CLART HPV 2 kittel (Genomica) végzett összehasonlításban (102). A CLART hrHPV 2 kicsit szenzitívebb volt, mint az Oncotect (89,8% vs. 85,8%), azonban az az Oncotect jelentősen specifikusabb eredményt adott (81,5% vs. 57,4%). A 30 év alatti korosztályban ugyan a specificitása 76,6%-ra csökkent, de így is jelentősen meghaladta a HPV DNS teszt specificitását ebben a korosztályban is (54,1%), míg a szenzitivitása megközelítette a HPV DNS teszt teljesítményét (90,2% vs. 91,8%).

1.7.3. HPV DNS-metiláció

Az epigenetikai változások egyik aspektusa a DNS-metiláció (DNSme), mely a génexpresszió fontos szabályozó eleme, és amelyet leginkább a CpG szigeteken tanulmányoztak. Általánosan elfogadott, hogy ha a CpG sziget a gén promóteréhez közel, vagy a promóterben helyezkedik el, a metilációs mintázata összefüggést mutat a génexpresszió szabályozásával.

A HPV genom DNSme mintázatát leginkább a HPV16 esetében tanulmányozták, melyen kb. 113 CpG pár található. Több kisebb mintaszámot alkalmazó vizsgálat eredménye megegyezik abban, hogy erős összefüggés mutatható ki a HPV16 L1 és L2 ORF DNSme szintje és a CIN2+ kockázat között (103, 104), míg más régiók esetében eltérnek az eredmények (E4, E6, E2, E7) (105-107). Amennyiben a HPV16 L1 és L2 ORF DNSme teszt diagnosztikai teljesítőképessége megfelelőnek bizonyul HPV-triage tesztként, a HPV16 mellett a többi hrHPV típus, mint a HPV18, 31, 33, 45 esetében is igazolni kell ezeket az összefüggéseket (104).

1.7.4. HPV fehérjék

Vizsgálatok folynak a HPV által kódolt fehérjét kimutató tesztekkel is a méhnyakrák kutatásokban. Jelenleg Kínában klinikai validálás alatt áll az OncoE6 teszt (Arbor Vita Corporation), mely a HPV 16, 18 és 45 által kódolt E6 fehérjét mutatja ki,

míg a Cytoactiv (Cytoimmun Diagnostics) tesz a HPV L1 fehérje expresszió csökkenését méri, melyet összefüggésbe hoztak a lézió progressziójával (108, 109)

1.8. Humán celluláris markerek

1.8.1. Fehérje expresszió

Az utóbbi évek kutatásai több HPV fertőzés indukálta molekuláris változást azonosítottak, melyek a replikáció, transzkripció, DNS-repair mechanizmusok, apoptózis, proliferáció, invázió és metasztázis folyamatokban játszanak szerepet és alkalmazásuk potenciális biomarkerként is felvetődött. A méhnyakrák szűrésben a klinikai hatékonyságot mutató targetek a p16^{INK4a} (CDKN2A/p16), survivin (BIRC5), topoisomerase 2 alpha (TOP2A), metalloproteinase 9 (MMP9), minichromosoma maintenance 5 (MCM5), cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A (CIP2A) vagy a pKi67 fehérje (MKi67) (110-115). A vizsgálatok többségében szövettani mintákon végzett immunhisztokémiai (IH) módszerrel határozták meg a fehérjék expressziójának változását a patológiás szövetekben. A méhnyakszűrés citológiai kenet mintára a p16^{INK4a} a legelterjedtebben alkalmazott immuncitokémiai biomarker. Az immunkémiai-tesztek segítséget nyújtanak a patológiás folyamatok molekuláris változásainak kimutatására, így alkalmazásukkal pontosabb diagnózist lehet felállítani, azonban a módszer értékelése szubjektív, többnyire nem automatizált, nehezen kvantifikálható, ezért véleményem szerint nem optimális módszer a sejten belüli változások mértékének objektív meghatározására.

1.8.2. p16^{INK4a}

A p16^{INK4a} fehérje (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A – CDKN2) egy tumor szupresszor protein, mely a CDK4 és CDK6, a D-típusú ciklin-függő kinázok inhibitoraként működik, melyek aktív állapotukban a retinoblastoma tumor szupresszor fehérje, pRB foszforilációját inicializálják. A p16^{INK4a} képes leállítani a sejteket a sejtciklus G1-fázisában. A p16^{INK4a} gén vagy downstream mediátorai gyakran dereguláltak számos típusú humán rákban.

A p16^{INK4a} overexpressziója a HPV-fertőzés okozta sejtttranszformáció markere, amely jelzi a HPV E7 onkogén okozta retinoblastoma (RB)/E2F útvonal zavarát a sejten.

A p16^{INK4a} overexpressziója szoros összefüggést mutat a cervikális neopláziával (116). A p16^{INK4a} immunfestés klinikai alkalmazhatóságát számos tanulmányban vizsgálták a cervikális hisztológiai és citológiai értékelés kiegészítő diagnosztikai módszereként.

A 2014-ben publikált LAST hisztológiai terminológiában a bizonytalan CIN2 hisztológia besorolására javasolják alkalmazni (58). A p16^{INK4a} alkalmazása javítja a hisztológiai értékelés helyességét, megbízhatóságát és reprodukálhatóságát (117-119).

A p16^{INK4a} immucitokémia (CINtec®, CE, mtm Laboratories) tesztet, mint önálló méhnyakrák szűrőtesztet vagy a citológia (120, 121); Guo, 2010 #147; Denton, 2010 #142} illetve a HPV kiegészítő tesztjeként (triage) (122, 121, 123) vizsgálták. Összefoglaló tanulmányok jelentek meg a p16^{INK4a} immucitokémia szűrő illetve triage teszt alkalmazásáról (124-126, 116). A p16^{INK4a} immucitokémia a HPV-hez képest ASCUS vagy LSIL triageban közel azonos szenzitivitás mellett nagyobb specificitást mutat (ASCUS szenzitivitás: 92,6% (84,6-97,2) vs. 90,1% (81,5-95,6); LSIL szenzitivitás: 92,0% (86,1-95,9) vs. 95,7% (91,0-98,4); ASCUS specificitás: 63,2% (57,5-68,6) vs. 37,8% (32,4-43,5) és LSIL specificitás: 37,1% (31,4-43,0) vs. 18,5% (14,2-23,5) (127). Egy 17 tanulmányt összefoglaló metaanalízis értékelése szerint a p16^{INK4a} teszt pontosabban határozza meg ASCUS triageban a CIN2+ eseteket, mint a HC2 teszt. Az LSIL p16^{INK4a} triage kevésbé szenzitív, de specifikusabb, mint az LSIL HC2 triage (126). A p16^{INK4a} fehérje immunfestés az NTCC ("New technologies for cervical cancer screening") vizsgálat archív mintáin végzett baseline és 3 éves follow-up eredményei alapján kellően szenzitív a HPV triageban a CIN3+ esetek kiszűrésére (baseline szenzitivitás 91%, 3 éves follow-up szenzitivitás 82%). A p16^{INK4a} pozitív baseline eredmény azonnali CIN3+ kockázata 7,7% volt, ami a 3 éves follow-up során kimutatott CIN3+ esetekkel kiegészítve 9,7% CIN3+ kockázatra emelkedett (122, 128, 68). Több szerző is megállapította, hogy a p16^{INK4a} immunfestés értékelése nem egységes, ami megnehezíti az eredmények összehasonlítását (129), illetve egyes metapláziás sejtekben is pozitív festést ad, ezért a sejtek morfológiáját is ajánlott figyelembe venni kenetek értékelésekor a specificitás növelése érdekében.

A p16^{INK4a} fehérje immunfestés magában, illetve a Ki-67-tel kombinálva a transzformáló HPV fertőzés során aktivált HPV onkogén expresszió (E7) és a vírus indukálta sejtciklus szabályozás deregulációjának markerei (130, 131). Néhány éve bevezetették a p16^{INK4a} és a Ki-67 kettős festést alkalmazó immucitokémia kitet (CINtec®

Plus, Roche, Mannheim, Germany), ami jelentősen egyszerűsítette és standardizálta a festett kenetek értékelését. A kóros sejteket a két immunfestődés egyazon sejtben való megjelenése jelzi. A pozitivitás kimondásához elegendő az egy vagy több sejtben kimutatható kettős festődés. A p16^{INK4a}/Ki-67 kettős festés kifejlesztésének a célja az volt, hogy a kenetek értékelését kevésbé szubjektívvé és még specifikusabbá tegyék.

A p16^{INK4a}/Ki-67 kettős festést számos populáción diagnosztikus szerepben vizsgálták, mint biomarkert az ASCUS, LSIL citológia triageban, HPV triageban illetve elsődleges szűrő tesztként (132, 124, 133, 121, 134-137). A tanulmányok eredményei következetesen igazolták a kettős festés nagyobb CIN3+ szenzitivitását a citológiához képest, illetve nagyobb specificitását a hrHPV teszthez képest.

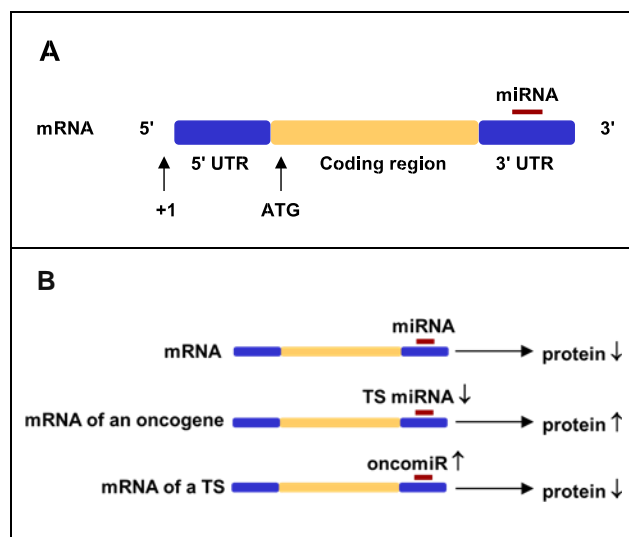
1.8.3. Claudin-1

A daganatos átalakuláskor jól ismert, hogy a sejtkapcsolatok közvetítő struktúrák megváltoznak, és ez az egyes sejtkapcsoló rendszereket alkotó fehérjék összetételének a megváltozásával is együtt jár (138). Az egyik jellegzetes sejtkapcsoló rendszer, mely a sejtek polaritását, a sejtek közötti ion- és folyadékjárást szabályozza, a tight junction (TJ), amelyet számos fehérje alkot, ezek között található meg a claudinok (CLDN) (139). A claudinok a transzmembrán fehérjék nagy családjába tartoznak, mint funkcionális és strukturális komponensei a TJ-oknak, melynek szerepe van a paracelluláris permeabilitás szabályozásában, a sejt polaritásának fenntartásában és szerepet játszik a sejt jelátviteli folyamataiban is. Kimutatták, hogy a sejt TJ-alapú barrier rendszerének szerepe van a sejt proliferáció szabályozásában, valószínűleg az epithel sejtet körülvevő mikrokörnyezet szabályozása által (140, 141). A claudin fehérje expresszió változásait számos nőgyógyászati rákban kimutatták, mint a méhnyak-, endometrium-, ováriumrákokban illetve rákmegelőző állapotokban (142-144, 138). Először Sobel és mtsai (143, 144) bizonyították, hogy e fehérjék egyikének, a claudin-1-nek (CLDN1) a mennyisége jelentős mértékben fokozódik a rákmegelőző és rosszindulatú méhnyaki elváltozásokban. Ezek az eredmények összhangban állnak azzal a ténnyel, hogy a TJ-ok fellazulása megfigyelhető a tumorigenézis során (138). A claudin fehérjék fokozott expressziója a sejtek növekedett motilitását, inváziós képességét és túlélését segítheti elő, mely kedvez a daganatos átalakulásnak. A legfrissebben publikált tanulmányunkban vizsgáltuk a CLDN1 és a p16^{INK4a} immuncitokémia és

immunhisztokémia festések teljesítőkéességét a méhnyaki diagnosztikában szűrés és triage alkalmazásokban - az eredményeket összehasonlítottuk a citológia és HPV tesztek ugyanezen felhasználása során kapott értékeivel (145). Egy 2017-ben publikált tanulmányunkban a CLDN1/Ki-67 kettős festést alkalmaztuk a CLDN1 immunfestés specificitásának növelésére, és a kapott eredményeket összehasonlítottuk a p16^{INK4a}/Ki-67 kettős festéssel LBC és szövettani mintákon. Ereményeink szerint nem volt szignifikáns különbség a két kettős immunfestés között (146)

1.8.4. micro-RNS-ek

A micro-RNS-ek (miR) kis, endogén, nem kódoló RNS molekulák, amelyek a génműködést poszttranszkripciós szinten szabályozzák (1. ábra) és jelenleg számos típusuk ismert (1000 feletti). Kórismézési felhasználhatóságuk alapja az, hogy a miRNS mintázat jellemző az egyes sejtekre, szövetekre, illetve jellegzetes változása a daganatos átalakulás során is megfigyelhető (147). Onkogénként és antionkogénként érvényesülhet a hatásuk, mintázatuk tükrözheti a daganat szöveti eredetét, a daganat típusát, sőt egyes esetekben a klinikai kimenetelt is (147-152).



1. ábra: A miRNS poszttranszkripciós szinten befolyásolja a génextpressziót. (A) A szabályozáshoz a miRNS a target gén mRNS-én az 3'-UTR (untranslated region) szakaszhoz kötődik. (B) A gén expressziót zavaró miRNS hatására a gén mRNS translációja leáll és csökken a fehérje expresszió mértéke. *mRNA* Messenger RNS, *UTR* Untranslated region, *ATG* Start codon, *miRNA* micro-RNS, *ORF* Open reading frame, *TS* Tumor szupresszor (gén) *Coding region* Kódoló szakasz, *Oncogene* Onkogén, *Protein* Fehérje, (153)

Az elmúlt években több munkacsoport vizsgálta a miRNS mintázat változását a méhnyakrák kialakulása során annak egyes stádiumaiban. Megállapították, hogy egyes miR-ek felülszabályozottak (upreguláltak), (pl. miR-199, -133, -214), míg mások alulszabályozottak (downreguláltak) (pl. miR-149, -203, -218) (153-157, 150, 158, 152, 159). Bár jelenleg még csak a kutatás szintjén folynak vizsgálatok, ám ettől a gyorsan növekvő kutatási területtől várható, hogy az új diagnosztikus entitások mellett segítséget nyújtanak a progresszió meghatározásában is, sőt kezelési célpontok azonosításához is vezethetnek az ezen a területen nyert megfigyelések (160).

1.8.5. Humán géneexpressziós biomarkerek – mRNS

Kevés adat áll rendelkezésünkre az mRNS-alapú technikák alkalmazhatóságáról, mint humán géneexpressziós biomarkerek kimutathatóságáról a cervikális LBC mintákból. A módszernek az értékét a méhnyakrák megelőzésben még nem igazolták nagyobb prospektív vizsgálatokban. Egy kisebb mintaszámú (n=120) kolposzkópos populációban az LBC mintából végzett tanulmányban a HGSIL hisztológia klinikai végpontra vonatkozó legjobb eredményt a TOP2A és a CDKN2A/p16 kombinációja adta (szenzitivitás: 96% (95% CI: 88-99); specificitás: 71% (95% CI: 55-82)) (161). A dolgozatom téziseibe nem sorolt publikációinkban bemutatott esettanulmány vizsgálatban 562 kolposzkópiára utalt nő vett részt, illetve 140 betegségmentes, kontroll nő mintája, melyek klinikai végpontjai szövettani és/vagy citológiai vizsgálatokkal lettek igazolva. A tanulmány kiemeli annak a lehetőségét, hogy a géneexpressziós panelek alkalmazhatóak a HPV alapú méhnyakrák szűrésben biomarker triageként, illetve az elváltozások aktuális prognosztikai markereként is. A kialakított diagnosztikai panel (PIK3AP1, TP63 és DSG3) képes arra, hogy hatékonyan megkülönböztesse az hrHPV pozitív nők citológiailag normál eseteit a hrHPV pozitív CIN2/3 esetektől. A prognosztikus génpaletta (KRT78, MUC5AC, BPIFB1 és CXCL13, TP63, DSG3) képes megkülönböztetni az hrHPV+ CIN1 és carcinoma eseteket (162).

1.8.6. Humán metilációs biomarkerek

A gazdasejt DNS metilációja a genom CpG lokuszain változik a karcinogenezis során. A tumor szupresszor gének promóter régiója hipermetilálódhat, aminek hatására a szabályozott fehérje expressziója csökken. A DNS metilációja stabilan vizsgálható

számos mintából és a daganatképződés korai stádiumától kezdve az invazív tumor kifejlődéséig, ezért a méhnyakrák szűrésben potenciálisan alkalmazható biomarker fejlesztés egyik iránya lehet (163-165). Azonban az eddigi vizsgálatok kis mintaszámúak voltak, ezért a metilációs biomarkerek klinikai alkalmazhatósága még nehezen megítélhető. A HPV pozitív esetek triage tesztjeként ígéretes eredményt adott a CADM1 és a MAL gazdasejt specifikus metilációs teszt (166-171). A legújabb kombinációban a CADM1 és MAL mellett a miR-124-2 metilációs teszt alkalmazhatóságát is vizsgálták (167).

Ezek mellett metilomikai módszerrel számos más potenciális gén metilációját kimutatták (ADRA1D , AJAP1 , COL6A2 , EDN3 , EPO , HS3ST2 , MAGI2 , POU4F3 , PTGDR , SOX8 , SOX17 , ST6GAL2 , SYT9 , ZNF614 (172), SOX1 és PAX1 (173)). A felsorolt metilált gének HPV-triageban való klinikai teljesítőképességének meghatározására további vizsgálatok szükségesek (174).

A dolgozatom téziseibe nem sorolt későbbi publikációmban bemutatott keresztmetszeti esettanulmány vizsgálatban a POU4F3 gén metilációját hasonlítottuk össze az LBC citológiával a TRACE (Triage and Risk Assessment of Cervical Precancer by Epigenetic Biomarker) study HPV pozitív eseteinek mintáin, CIN2+/CIN3+ klinikai végpontra vonatkozóan. A HPV-triage tesztként a POU4F3 gén metilációja 64%-kal több CIN3+ esetet detektált, mint az LBC citológia (ASCUS+) (175).

2. Célkitűzések

A méhnyakrák és premalignus elváltozásainak vizsgálatát tűztük ki célul, amelyet a molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztésével, a klinikai adatok tükrében vizsgáltunk.

A következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A HPV fertőzések epidemilógiai kérdéseinek tanulmányozása a HPV tipizálási eredmények tükrében, a Genoid laboratóriumba magyarországi beküldő intézményektől érkezett mintákon, illetve a női szexmunkások magas rizikójú csoportjában gyűjtött cervikális garat és anális mintákon.
2. Újonnan kifejlesztett real-time PCR alapú HPV teszt klinikai teljesítőképességének meghatározása klinikailag validált HPV teszttel végzett összehasonlító vizsgálattal.
3. Új potenciális biomarkerek klinikai teljesítőképességének meghatározása a Claudin1 és p16^{INK4a} fehérje immunkémia festésével.
4. További új molekuláris technológiájú biomarker kutatás méhnyakrákban megfigyelhető micro-RNS expressziós mintázat változás cervikális patológiában betöltött szerepének feltérképezésére.

3. Módszerek

Célkitűzés 1: A GenoID Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumba 2005/2006-ban 6447 HPV genotipizálást végeztünk a laboratóriumba HPV vizsgálatra érkezett cervix, urethra, ondó, anus, condyloma, hámkaparék, hüvelyváladék mintákból (totál: n=12345). A HPV DNS kimutatását a laboratórium által fejlesztett Full Spectrum HPV Amplifikációs és Detektáló teszttel végeztük, majd a hrHPV (high risk, magas kockázatú) pozitív minták PCR termékeit egyedileg genotipizáltuk. Erre a HPV detektáló és genotipizáló rendszerre Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztként (Genoid, Hungary, Budapest) hivatkozom a dolgozatomban. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt egyedileg genotipizálja a 14 hrHPV típust: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 és 68; csoportban detektálja a következőket: (1) az 5 lrHPV (low-risk, alacsony kockázatú) típust: 6, 11, 42, 43, 44; (2) a 29 NA-HPV (NA, kockázati csoportba nem sorolt) genotípust: 2a, 3, 7, 10, 13, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 40, 53, 54, 57, 61, 67, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 89, 90 és 91.

A női szex munkások („female sex workers” – FSW) illetve kontroll csoport összehasonlító vizsgálatában tanulmányoztuk a szexuális szokások és a cervikális, anális, és pharyngeális HPV fertőzés előfordulásának gyakorisága közötti összefüggéseket. A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán történt a minták gyűjtése. A FSW (n=34) és kontroll csoport (n= 52) minden vizsgálati alanyának mindhárom testtájáról mintát gyűjtöttek, és szexuális és egyéb szokásaikról kérdőívet töltöttek ki. A HPV genotipizálást a Genoid Laboratóriumban a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel végeztük, értékeltük.

Célkitűzés 2: A dolgozat második célkitűzése a megnövekedett HPV diagnosztikai kapacitás igényeknek kielégítésére alkalmas, nagy áteresztőképességű HPV kimutatási eljárás kifejlesztése, klinikai validálása. A dolgozatomban vizsgáljuk a Genoid laboratórium által újonnan kifejlesztett multiplex, egylépéses, HPV típus-specifikus próbákat alkalmazó real-time-PCR alapú HPV teszt (molecular beacon real-time- HPV, MBRT-HPV, Genoid, Hungary, Budapest), illetve egy ABI7900 platformra adaptált verziójának (MBRT-HPV-ABI, Genoid, Hungary, Budapest) klinikai teljesítőképességét klinikailag validált HPV teszttel végzett összehasonlító vizsgálattal. A MBRT-HPV teszt a 14+1 hrHPV típust csoportban mutatja ki (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,

58, 59, 66, 68 és a feltételezetten magas kockázatú HPV26) és csoportban detektálja az 5 lrHPV típust (6, 11, 42, 43, 44). A vizsgálatok során a Genoid laboratóriumba Full Spectrum L1F/L1R-HPV vizsgálatra érkezett maradék mintákat (n=161), illetve egy írországi laboratóriummal együttműködésben a CERVIVA study (Irish Cervical Screening Research Consortium) keretén belül kolposzkópiára utalt betegektől levett LBC (liquid based cytology) cervix mintákat (n=241) vizsgáltunk. Az MBRT-HPV teszt összehasonlító vizsgálatában a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszthez, míg a MBRT-HPV-ABI teszt esetében a HC2 (Qiagen, Hilden, Germany), és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV (Genoid, Hungary, Budapest) tesztekhez képest vizsgáltuk az új HPV teszt teljesítményét, az eltéréseket e CERVIVA study minták esetében Linear Array-HPV (Roche, Mannheim, Germany) teszttel tovább vizsgáltuk, genotipizáltuk. Az eredményeket, ahol lehetséges volt a klinikai végpontok (citológia, hisztológia) függvényében is elemeztük.

Célkitűzés 3: A dolgozat harmadik célkitűzéseként a citológia- illetve HPV triage-ban alkalmazott immunkémiai biomarkereket vizsgáltam. A szerzőtársaimmal együtt a már publikált biomarker, a p16^{INK4a} és egy új biomarker, a claudin1 (CLDN1) immunhisztokémiai/immuncitokémia tesztek adatait értékeltem a gold standard szövettanhoz képest, egy eset-kontroll tanulmányban hagyományos kenetcitológia és LBC citológia mintákon (n=502). Az immunfestések értékelése bizonyos esetekben a morfológia figyelembe vételével történt, az immunfestések citológia és HPV triage elrendezésben való alkalmazásával. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV vizsgálatokat a Genoid laboratóriumban én értékeltem, a rutin citológia. hisztológia értékelést szerzőtársaim végezték. Az immunfestéseket szerzőtársaim értékelték a közösen kialakított szempontok szerint.

Célkitűzés 4.: A dolgozat negyedik célkitűzéseként egy kisebb mintaszámú vizsgálatban vettem részt, melyben molekuláris biomarker vizsgálatokat végeztünk retrospektív módon a Pécsi Tudományegyetem archív méhnyakrákos mintáin. Elsődleges célunk az volt, hogy feltérképezzük micro-RNS (miR) expressziós mintázat változásainak cervikális patológiában betöltött szerepét, illetve másodlagos célként a különböző típusú rákos szövetminták HPV fertőzöttségével mutatott korrelációit is tanulmányoztuk. A humán méhnyakrák formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintáit (AC: n = 22, SCC: n = 25) a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának

Pathologiai Intézetének archívumából véletlenszerűen választották ki elemzésre, a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán 2007-2010 között diagnosztizált betegek mintái közül. A méhnyakrákok miR expressziós profiljainak vizsgálatát Pécsi Tudományegyetemen végezték, a mintából preparált DNS mintákból a Full Spectrum L1F/L1R-HPV vizsgálatokat a Genoid laboratóriumban végeztük, az eredményeket én értékeltem.

3.1. PhD dolgozat tárgyában végzett saját munka

3.1.1. Full Spektrum HPV Amplifikációs és Detektáló teszt és genotipizálás (Full Spectrum L1F/L1R-HPV) epidemiológiai vizsgálatai

3.1.1.1. Genoid Laboratórium HPV tipizálási eredményei 2005/2006-ban (176)

Populációk, minták: A GenoID Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumba 2005/2006-ban 6447 HPV genotipizálást végeztünk a laboratóriumba HPV vizsgálatra érkezett cervix, urethra, ondó, anus, condyloma, hámkaparék, hüvelyváladék mintákból (total: n=12345).

Módszerek: A HPV DNS kimutatását a laboratórium által fejlesztetett Full Spectrum HPV Amplifikációs és Detektáló tesztel végeztük, majd a hrHPV (high risk, magas kockázatú) pozitív minták PCR termékeit egyedileg genotipizáltuk. Erre a HPV detektáló és genotipizáló rendszerre Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztként (Genoid, Hungary, Budapest) (177) hivatkozom a dolgozatomban. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt egyedileg genotipizálja a 14 hrHPV-t: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 és 68, csoportban detektálja az 5 lrHPV típust (6, 11, 42, 43, 44); és a 29 NA-HPV (NA, kockázati csoportba nem sorolt) genotípust (2a, 3, 7, 10, 13, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 40, 53, 54, 57, 61, 67, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 89, 90 és 91). A különböző transzport közegben: - PBS, azaz phosphate buffered saline pH 7,4 (Sigma), és - PreservCyt (Cytoc, jelenleg Hologic) érkezett sejtes mintákat (cervix, urethra, hüvelyváladék, hámkaparék) centrifugáltuk (5000g, 10 min) és mostuk PBS-oldattal. A sejttöledéket megemésztettük 250 µl proteinase-K (2,5 mg/ml proteinase-K, 0,01 M TRIS-HCl pH 8, 0,001 M EDTA pH 8, Sigma) jelenlétében 56 °C-on 1 órán keresztül, melyhez

standard mennyiségű végkoncentrációban 200 kópia belső kontrollt (IC) adtunk. DNS preparálása a proteinase-K emésztett mintákból, TECAN RSP150 robotikus platformon, 96 lyukú lemez formátumban, módosított szilika-alapú technológiával történt. A PCR minőségű DNS termékből (150µl) a PCR reakciók összemérését a TECAN RSP150 robotikus platform végezte 10 µl DNS és 15µl HPV Full Spectrum HPV Amplifikációs és Detektáló kit PCR Master mix pipettázásával. Továbbiakban a PCR vizsgálat és a hr/lr HPV detektálása a Full Spectrum kit leírás szerint történt, ahol a detektálás lépését fluorescens jelre változtatott protokollra módosítottuk, mely röviden a következő lépésekből állt: a biotinilált amplikonokat streptavidinnel érzékenyített 96 lyukú mikrotiter lemezekre kötöttük, majd fluoresceinnel jelölt próbákkal, csoportokban detektáltuk: alacsony kockázatú (low-risk, lr), magas kockázatú (high-risk, hr) és a közös (mind a 48 HPV genotípus). Minden mintával együtt preparálódott az ismert mennyiségben a mintához adott belső kontroll (internal control, IC; egy mesterséges DNS darabot tartalmazó plazmid), amit szintén egy specifikus próbával detektáltunk. A csoport detektálást követően a HPV tipizálás során minden hrHPV pozitív mintát típus specifikus próbákkal, a fent említett hibridizációs módszerrel egyedileg genotipizáltuk. Az lrHPV pozitív és NA-HPV pozitív mintákat nem genotipizáltuk.

3.1.1.2. A női szexmunkások illetve egy kontrollcsoport összehasonlító vizsgálata a szexuális szokások és a cervikális, anális és pharyngeális HPV fertőzés előfordulásának gyakorisága közötti összefüggések tanulmányozása céljából (178)

A HPV genotipizálást a Genoid Laboratóriumban a Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztel végeztük, értékeltük.

A mintavételek HPV vizsgálatra a Genoid Laboratórium útmutatója alapján történtek. A cervikális mintát a cytobrush mintavételi eszköz körbeforgatásával vették le a nemibeteg szakrendelőben a cervix endo- és ectocervikális felszínéről. Anális mintavétel során egy második cytobrush mintavételi eszközt kb. 1 cm mélyen a végbélbe tolva körbe forgaták majd óvatosan kihúzták a végbélből. A garat mintát egy harmadik cytobrush mintavételi eszközzel a garat-nyálkahártya hátsó faláról vették le. A mintavevő keféjét PBS mintatároló közegbe (GenoID laboratórium) helyezték és -20°C-on tárolták a vizsgálat megkezdéséig.

3.1.2. Új real-time PCR alapú HPV teszt fejlesztése és klinikai vizsgálatai

3.1.2.1. MBRT-HPV (179)

A MBRT-HPV teszt klinikai vizsgálatban az összehasonlító HPV teszt, a Full Spectrum L1F/L1R-HPV vizsgálatait én értékeltem, a klinikai vizsgálatban és eredményeinek értékelésében vettem részt.

Populációk, minták: Citológia pozitív cervikális minták (n = 161) az STD- és nőgyógyászati ambulanciákról kerültek begyűjtésre konzekutív módon. A MBRT-HPV keresztreakcióit elemző vizsgálatokhoz célzottan kiválogatottunk további cervikális mintákat (n=75), melyek közül 25 minta az a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel IrHPV pozitív volt, és 50 minta NA-HPV pozitív eredménnyel rendelkezett.

Klinikai vizsgálatok: A MBRT-HPV teszt klinikai vizsgálat keretében a citológia pozitív (ASCUS+) klinikai mintákon (n=161) illetve 25 IrHPV pozitív és 50 NA-HPV pozitív mintán hasonlítottuk össze a MBRT-HPV teszttel és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel kapott eredményeket.

Statisztikai módszerek: A two-tailed Fisher exact probability tesztet használtuk a Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszerrel és a MBRT-HPV teszt eredményeiből készített kontingencia táblázat adatainak elemzésére.

3.1.2.2. MBRT-HPV-ABI (180)

A Full Spectrum HPV vizsgálatokat a Genoid Laboratóriumban én értékeltem az irországi partnerükkel közösen. A klinikai vizsgálat eredményeinek értékelésében részt vettem.

A vizsgálatban Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztet alkalmaztuk a HPV fertőzés kimutatására és genotipizálásra. A PreservCyt mintatároló közegbe levett cervikális mintából 5 ml DNS-t preparáltunk a M48 BioRobot (Qiagen, Hilden, Germany) és a MagAttract RNA Cell Mini Kittel (Qiagen, Hilden, Germany) egy a PreservCyt mintára módosított protokoll szerint, ahol a sejt üledéket a lízis előtt 400µl Buffer RLT (Qiagen, Hilden, Germany) pufferrel mostuk. A DNS-t 50µL Buffer TE (Qiagen, Hilden, Germany) oldatban eluáltuk és két részre osztottuk a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV-ABI vizsgálatokhoz.

3.1.3. HPV triage-ban potenciálisan alkalmazható biomarker vizsgálatok

3.1.3.1. Caludin1 (145)

A minták gyűjtése a HPV_SCREEN multicentrikus klinikai vizsgálat és a KT121128 KMR_BIOMARKER vizsgálat keretében történt a Genoid Laboratóriumban. A Full Spectrum HPV vizsgálatokat Genoid Laboratóriumban én értékeltem. Az eredmények értékelését én végeztem.

Populáció, minták: A Genoid Laboratórium kutatásvezetésével Magyarországon zajló HPV_SCREEN multicentrikus klinikai vizsgálat és a KT121128 KMR_BIOMARKER vizsgálat mintái közül 502 beteg mintát válogattunk be a vizsgálatba. Ebből 352 minta volt a citológiai eredmény alapján konizációra indikált (loop vagy kés) betegektől a beavatkozás előtt levett cervikális LBC minta, továbbá ugyanazon beteg konizátumának hisztológiai mintája. A beválogatott minták másik csoportja rutin méhnyakrák szűrésen egymást követően megjelent 150 nő cervikális LBC mintája volt. Csak valid citológiai vagy hisztológiai eredményű eseteket elemeztünk a vizsgálatban. Minden klinikai mintát a Nemzeti Etikai Bizottság engedélyével gyűjtöttünk be és minden beteg írásos beleegyezését adta a vizsgálatokhoz.

A citológiai kenet maradék LBC mintáit használtuk a HPV és immuncitokémiai vizsgálatokhoz.

A HPV vizsgálathoz a DNS-t az AmpliLute Liquid Media Extraction kittel (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) preparáltuk 4 ml PreservCyt mintából. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztet alkalmaztuk a HPV fertőzés kimutatására és genotipizálásra.

Immuncitokémia (IC) reakciókhoz a citológiai lemezeket cytospin centrifugálással készítettük 2 ml LBC PreservCyt mintából. A CINtec p16^{INK4a} Cytology kitet (Hoffmann-La Roche) a gyártó útmutatója szerint alkalmaztuk egy kis módosítással. Röviden, fehérje blokkoló reagenst (Protein Block Serum Free, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) használtunk peroxidáz blokkolási lépés után; 30 percig inkubálva a lemezeket, majd kétszer mosva 5 percig. Minden LBC mintából egy második lemezt is készítettünk, melyből CLDN1 immunfestést végeztünk, szintén a CINtec p16^{INK4a} Cytology kitet alkalmazva azzal a módosítással, hogy a p16^{INK4a} antitest helyett a CLDN1 antitestet használtuk 1:100 hígításban (Zymed, San Francisco, CA, USA) egy órán keresztül

szobahőmérsékleten inkubálva. A lemezeket két szakképzett citopatológus értékelte a többi eredmény ismerete nélkül.

Immuncitokémiák (IC-CLDN1 és IC-p16^{INK4a}) értékelésére szemikvantitatív módszert alkalmaztunk, 10 látótérben kiválasztottunk olyan területet, ahol kb. 100 sejt volt látható látóterenként az objektív 40-szeres nagyításával. Különböző protokollokat használtunk a lemezek értékeléséhez, elemezve a festődés jellegét a citomorfológiai értékeléssel vagy anélkül. Az egyszerű értékelési módszer (simple scoring method (SM)) a festődés szemikvantitatív értékelése volt, citomorfológiai értékelés nélkül. Az alábbi értékeket alkalmaztuk: 0: nincs festődés, 1: gyenge festődés, 2: közepes festődés, 3: erős festődés. Az 1-es szint feletti festődéseket vettük pozitívnak (cut-off). A morfológiai vizsgálattal kiegészített értékelésben (morphological reading adjusted scoring method (MASM)) a fentiek szerint határoztuk meg a festődés intenzitását, amit kiegészítettünk azzal, hogy csak a citomorfológiailag pozitív (ASCUS+) sejteket értékeltük és meghatároztuk, hány százalékuk mutatott pozitív immunfestődést. A pozitívítás cut-off értékénél minden citomorfológiailag pozitív és immunfestéssel is pozitív esetet pozitívnak tekintettünk. CLDN1 és a p16^{INK4a} immunkémiákat kombináltan értékelve is meghatároztuk. Az eredményt pozitívnak tekintettük, ha bármelyik teszt kombinációja pozitív volt.

A citológia és a HPV triage vizsgálatokban a citológiailag illetve HPV tesztre pozitív (ASCUS+, hrHPV+) mintákon elemeztük a triageban alkalmazott tesztek diagnosztikai teljesítményét (HPV-triage, citológia-triage), illetve, ha a teljes populációra vonatkozóan is végeztünk számításokat, akkor azt külön jelöltük (PP - teljes populáció, TP - triage populáció)

Statisztikai értékelést a kontingencia analízissel végeztük. Az analízis során a Yatescorrected chi-square, Mantel-Haenszel chi-square, Fisher Exact Test módszereket alkalmaztuk. A statisztikai értékelést az alábbi paraméterekre végeztük: szenzitivitás, specificitás, pozitív prediktív érték, negatív prediktív érték. A becsült paraméterek konfidencia értékeit az általában használatos módon határoztuk meg. Az értékek számításakor gold standardnak a CIN2+ hisztológiailag konfirmált eseteket tekintettük, mint a pozitívítás klinikai kritériumát.

3.1.3.2. miRNS (154)

A minták gyűjtését a DNS preparálást és a miR vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem (PTE) laboratóriumában végezték a szerzőtársaim - a Full Spectrum HPV detektálást és genotipizálást én értékeltem. A publikációs eredmények értékelésében részt vettem.

A HPV kimutatási és tipizálási vizsgálatokat a Genoid Laboratórium a laboratóriumban alkalmazott Full Spectrum L1F/L1R-HPVtesztel végeztük. A vizsgálat célja az volt, hogy 8 különböző miRNS expresszióját (miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-196a, miR-203, miR-221) és HPV státuszát összevethessük a méhnyakrák két leggyakoribb szövettani típusában. A miRNS panelt szisztematikusan választottuk ki a közzétett adatok és az epitheliális tumorokban korábban szerzett tapasztalatok alapján.

3.2. PhD dolgozat tárgyában szerzőtársaim által végzett munka

3.2.1. A női szex munkások illetve egy kontroll csoport összehasonlító vizsgálata a szexuális szokások és a cervikális, anális, és pharyngeális HPV fertőzés előfordulásának gyakorisága közötti összefüggések tanulmányozása céljából (178)

Populációk, minták: A minták gyűjtése és a kérdőívek kiértékelése a pécsi Orvostudományi Egyetemen történt.

A minták vétele 2009. április és 2011. május között Pécs városában, Magyarországon történt 34 női szex munkás (female sex worker, FSW) (átlagéletkor: 28,4) és a kontroll csoportban 52 nő a lakosság köréből a FSW-ek átlagéletkorával hasonló korosztályból (átlagéletkor: 27,7). A szex munkásokat a nemibeteg szakrendelőben rutin STD szűrővizsgálaton való megjelenésük során vonták a be vizsgálatba.

Kérdőívek: 27 elemből álló önkitöltős anonim kérdőívet dolgoztak ki kifejezetten a tanulmány céljából, amit minden résztvevővel kitöltettek. A kérdőív az alábbi témákra kérdezett rá: demográfiai adatok, ismeretek a HPV és a méhnyakrák témáról, az STD prevenció és a HPV elleni védőoltás ismerete. Több kérdés középpontjában a résztvevők szexuális viselkedése és óvszer használata állt. A kitöltött kérdőíveket lezárt borítékokban

gyűjtötték be, amelyeken ugyanolyan vonalkód szerepelt, mint a mintákon, hogy a mintákat anonim módon össze tudják párosítani a kérdőívekkel.

Statisztikai elemzés: SPSS Windows Version 6.1.4 statisztikai csomagot használták az adatok elemzéséhez. Leíró statisztikákat és gyakorisági számításokat végeztek az összes változóval. A nominális változók közötti kétváltozós kapcsolatot Pearson χ^2 teszttel elemezték. A statisztikai szignifikancia szintjét 0.05-nél állapították meg az elemzés során.

Etikai engedély: A kérdőív tartalmát, olvashatóságát és érthetőségét orvosok és egészségügyi oktatók vizsgálták a Pécsi Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Tanszékén és az Orvosi Központ Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta az összes protokollt (hivatkozási szám: 3.440,316-8331 / KK41 / 2009).

3.2.2. Új real-time PCR alapú HPV teszt fejlesztése és klinikai vizsgálatai

3.2.2.1. MBRT-HPV (179)

A MBRT-HPV teszt fejlesztését a Genoid Laboratórium kutatás-fejlesztési részlegén dolgozó kollégáim végezték.

Alkalmazott technológiák: MBRT-HPV plazmid és belső kontrollokat HPV kontroll plazmidokból vagy HPV pozitív klinikai mintákból amplifikált 244-262 bp méretű PCR-termékek pCR2.1 TOPO vektorba (Invitrogen, Carlsbad, CA) történő szubklónozásával állítottuk elő. A szubklónozott fullL1F/L1R-HPV amplikon hossza a különböző HPV típusokban változó. Illetve szekvenálással igazolt klinikai mintákat használtunk egyes HPV típusok esetén (HPV típusok a 70, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91) kontrollként. Továbbá a MBRT-HPV belső kontrollja (IC) egy 140 bp hosszú mesterséges DNS-szekvencia, mely nem rendelkezik homológiával egyetlen ismert HPV típusal sem. Az IC DNS-t a lízis oldathoz adtuk a klinikai minta hozzámérése előtt (koncentráció: 4,8 ng/ ml). Így jelen volt a PCR során és párhuzamosan amplifikáltuk és specifikus internal kontroll próbával detektáltuk.

Primerek, beacon próbák: HPLC-tisztított oligonucleotid primereket az Integrated DNA Technologies szintetizálta (IDT, Coralville, IA). A molekuláris beacon próbákat Tyagi és Kramer (1996) által publikált paraméterek szerint terveztük (181). A próbák olvadási profiljait és lehetséges másodlagos szerkezetüket az Mfold (Version 3.2)

programmal a publikált leírás alapján vizsgáltuk (182), mely az alábbi Internet oldalon található: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>.

A próbák szerkezete általánosságban az alábbiak szerint lett kialakítva: 5'-szár-HPV komplementer szekvencia-szár-3' (beacon próba). A beacon loop részében helyezkedik el a HPV specifikus komplementer szekvencia. A két szárban a bázispárok komplementerei egymásnak, így oldatban kettős spirál szerkezetet vesznek fel. A próba két végén 4 vagy 5 bázisból álló szekvenciák általában palindrom szerkezetűek. A szár további szakaszán a nukleotidok C-G párokat alkotnak, bár ettől eltérő szerkezetű beacon próbákat is ismerünk. A beacon rendszerünket 10 konvencionális molekuláris beacon és 11 sharedstem molekuláris beacon alkotja. A sharedstem molekuláris beacon próbában a HPV komplementer szekvencia nem a loop szakaszban, hanem a beacon szárában helyezkedik el, így egyrészt részt vesz a target kötődésében, másrészt a beacon szárának kettősspirál képzésében. A specifikus próbákat úgy terveztük, hogy a szekvenciájukban a legnagyobb eltérés legyen a HPV típusok között. A loop optimális olvadáspontja (T_m) 52 °C és 56 °C között van, míg a szár T_m -je 48-52 °C közötti.

A quencher molekula, a DABCYL a 3' véghez kötött, míg a fluorofórok az 5' véghez kapcsolódtak. Az lrHPV típusok próbája TET-tel, a hrHPV típusok próbája FAM-mal jelölt. Az IC próba fluoreszcein - TEXASRED wavelength-shifting próba, ami emissziós hullámhossza mindkét másik próbától különbözik.

HPLC-tisztított molekuláris beacon próbákat az Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA) szintetizálta, az IC-próba kivételével (Sigma-Proligo, Boulder, CO). A 20 HPV típus specifikus próba elhelyezkedését a HPV DNS-n a 5. ábra tartalmazza.

MBRT-PCR: a reagenseket a Sigma (St. Louis, MO) gyártotta, ellenkező esetben jelöltük. A reakció végtérfogata 22 μ l, mely 7 μ l minta DNS-t tartalmaz. A reakció puffer az alábbi összetevőkből és végkoncentrációkból állt: 91mM Tris pH 8, 4,5mM MgCl₂, 0,008% Ficoll, 0,008% PVP, 0,68mM DTT, 36mM KCl, 227 μ M mindegyik dNTP-ből, 0,182 μ M mindegyik primerből (kivéve a KP-F/9 0,91 μ M), 7.5unit AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). A molekuláris beacon próbák 0,091-0,545 μ M koncentráció tartományban kerültek a reakciómixbe.

A reakciót a LightCycler 2.0 PCR thermal cycler-en (Roche, Mannheim, Germany) az alábbi paraméterekkel lett optimalizálva: 10 min 95 °C, 5 min 55 °C, majd 35 ciklus,

ami az alábbi lépésekből állt: 30 s 95 °C, 1 min 42 °C, 30 s 72 °C. A HPV kimutatás fluorescens jeleit az alábbi hullámhosszokon detektáltuk: hrHPV típusok 530 nm, lrHPV típusok 560 nm, IC 610 nm. A fluoreszcencia adatokat csak az utolsó 20 ciklusban detektáltuk. Az eredményeket a LightCycler Software 4.0 segítségével elemeztük. A színkompenzációt 3 szín alkalmazásával végeztük el (FAM-, TET-, illetve a wavelength-shifting FAM-TEXASRED-jelölt oligodT) a LightCycler 2.0 készülék kezelési útmutatója utasításai követve.

Az analitikai szenzitivitás és specificitás értékeket HPV típus specifikus plazmidok illetve szekvenálással verifikált diagnosztikai minták segítségével határoztuk meg. A 20 kimutatott HPV típusra vonatkozó szenzitivitást a legkisebb kimutatható DNS kópia/reakció értékre számoltuk ki (95% logit analízis). A specificitás vizsgálatkor 45-féle HPV típust alkalmaztunk (HPV 2a, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91).

Szekvenálás: A klinikai mintából amplifikált PCR termékeket a High Pure PCR Product Purification kittel (Roche, Mannheim, Germany) preparáltuk. Ezeket a templátokat a BigDye Terminator Cycle Sequencing kittel v3.1 (Applied Biosystems) szekveváltuk az ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készüléken. A DNS szekvenciákat az NCBI weboldalán található publikus adatbázison a BLAST algoritmussal elemeztük. A szekvenálást a reverz primer szett segítségével végeztük.

3.2.2.2. MBRT-HPV-ABI (180)

A MBRT-HPV teszt ABI7900 platformra fejlesztését (MBRT-HPV-ABI) a Genoid Laboratórium kutatás-fejlesztési részlegén végezték.

A minták gyűjtése, a citológia, a hisztológia és a Hybrid capture HR-HPV DNA és a Linear array HPV vizsgálatok, illetve a HPV vizsgálatokhoz a DNS preparálást a CERVIVA study írországi laboratóriumában dolgozó szerzőtársaim végezték.

Populáció és minták: a CERVIVA study keretében (Irish Cervical Screening Research Consortium), 2008-2010, Coombe Women and Infants University University Hospital, Dublin (CWIUH)) két vagy több tartósan abnormális kenettel rendelkező, kolposzkópiára utalt nőket válogattak be (n = 241). Minden beteg írásos beleegyezését adta, a vizsgálatot a CWIUH Etikai Bizottság jóváhagyta. A beteg kolposzkópia klinikán tett látogatásakor a beavatkozás előtt cervikális mintáját a PreservCyt LBC mintatárolóba

vették le, melyből rutin citológiai diagnózis készült a maradék citológia mintát használtunk a HPV teszthez. A betegek életkora 20-60 év, az átlagéletkoruk 33 év volt. Citológiai diagnózist a CWIUH specializált citotechnológusai és citopatológusai végezték. A kóros kenetek diagnózisa összhangban volt a brit Society for Clinical Citológia nevezéktanával, amelyet a Bethesda nevezéktanra konvertáltunk.

A betegek egy részpopulációjában (n=185) további cervikális biopszia vagy LEETZ konizáció hisztológiai vizsgálat készült. A hisztológiai eredmények a British Society for Colposcopy and Cervical Pathology irányelvei szerint készültek. A CIN2 és CIN3 eredményeket összevontan CIN2+ csoportnak neveztük ebben a vizsgálatban.

Hybrid capture HR-HPV DNA detection kit (HC2) (Qiagen, Hilden, Germany) vizsgálatban DNS-t preparáltunk a Sample Conversion Kitel (Qiagen, Hilden, Germany) konvertált 4ml PreservCyt mintából. A HPV DNS kimutatást a kit leírás szerint végeztük, mely 13 hrHPV típust (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 és 68) mutat ki. A gyártó által javasolt cut-off (RLU/CO >1) szerint határoztuk meg a pozitív eredményt.

A molekuláris beacon alapú real-time HPV detektáló kit (MBRT-HPV-ABI) (Genoid) a korábban publikált real-time „molekuláris beacon” alapú multiplex teszt (179) ABI 7900 platformra adaptált változata (180). A tesztben az 5-JOE-jelölt molekuláris beacon a HPV 16 vagy 18 jelenlétét mutatja ki, a többi 12 hrHPV típust (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) a 5-TET-jelölt „molekuláris beacon” csoportban detektálja, az hrHPV6,11 típusokat a 6-FAM-TEXASRED-jelölt oligodT (wavelength shifted) -jelölt molekuláris beacon mutatja ki és az IC-t az 5-FAM-jelölt molekuláris beacon detektálja. Az említett négy detektálási reakció egy reakcióban zajlik. A vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük el. Röviden, 3,5µl DNS-t adtunk a MBRT-HPV-ABI Master mixhez, melynek végtérfogata 11µl volt. A PCR reakció az AB7900 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) készüléken az alábbi hőprofilal futtatuk le: 95 °C 10 min, 55 °C 5 min (95 °C 15 s, 30 °C 20 s, 95 °C 15 s, 50 °C 1 min) ×25.

HPV genotipizálásra a Linear array HPV tesztet alkalmaztuk (LA) (Roche, Mannheim, Germany): A DNS preparálást 250 µl PreservCyt cervix mintából az Amplilute Liquid Media Extraction kittel (Roche, Mannheim, Germany) a kit leírása szerint végeztük. A PCR amplifikálás és a line blot kolorimetriás detektálás az alábbi HPV típusokat mutatta ki: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 és CP6108.

Statisztikai vizsgálatok: Az eredmények egyezését Cohen's Kappa (κ) teszttel vizsgáltuk és a McNemar's teszttel állapítottuk meg a statisztikai szignifikanciát. A szenzitivitás, specificitás és pozitív prediktív értékek számításánál a hisztológiailag konfirmált CIN2+ eseteket tekintettük „gold standard” eredménynek. A konfidencia intervallumot 0,95 értéknél határoztuk meg.

3.2.3. HPV triageban potenciálisan alkalmazható biomarker vizsgálatok

3.2.3.1. Caludin1 (145)

Citológia vizsgálatokat a Semmeweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézetében dolgozó szerzőtársaim a Bethesda klasszifikáció szerint értékelését a cervikális kenet, illetve PreservCyt LBC (Hologic, Bedford, USA) mintákból. A hisztológiai vizsgálatokat a Semmeweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézetében dolgozó szerzőtársaim értékelték. Az immunfestéseket szerzőtársaim értékelték a közösen kialakított szempontok szerint.

Citológia diagnózis a Bethesda klasszifikáció szerint készült a cervikális kenet, illetve PreservCyt LBC (Hologic, Bedford, USA) mintákból.

Immunhisztokémia (IH) reakciókhoz 4 μ m vastag formalinban fixált blokkból készült (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) metszetet használtunk. A CINtec p16^{INK4a} kítet (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) a gyártó útmutatója szerint alkalmaztuk. Párhuzamosan készült egy második metszet, amit CLDN1 immunfestésre használtunk fel az antitest 1:100 hígításában (Zymed, San Francisco, CA, USA) egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálva. A reakcióhoz a Ventana ES immunfestő automata (Ventana Medical System. Inc., Tucson, AZ, USA) HRP (horseradish peroxidase) multimer-alapú, biotin-mentes kimutatási technikát alkalmaztuk. A reagenseket és másodlagos antitesteket a Ventana forgalmazta (iView DAB Detection Kit, Ventana Medical System. Inc., Tucson, AZ, USA)).

3.2.3.2. miRNS (154)

A tanulmányt a Pécsi Tudomány Egyetem (PTE) Etikai Bizottsága (3440.316-8331 / KK41 / 2009) jóváhagyta. A humán primer méhnyakrák FFPE szövetmintákat (AC: n = 22 és SCC: n = 25) a PTE Patológiai Osztály archívumából véletlenszerűen választották

ki elemzésre a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán 2007-2010 között diagnosztizált betegek közül.

A méhnyakrákok miRNS expressziós profiljainak vizsgálata során, az első lépés a paraffinos szövettani minták deparaffinálása (három egyenként 8-10 µm metszet) xilol és abszolút alkohol alkalmazásával. A teljes miRNS-t a High Pure mikro-RNS Isolation kittel (Roche, Mannheim, Germany) a gyártó utasításainak megfelelően izoláltunk, majd ezt követte az 5 µl extrahált miRNS reverz transzkripciója random hexamer primerek és a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) használatával a LightCycler® 2.0 (Roche, Mannheim, Germany) készüléken. A preparált RNS tisztasága 1,9-2,1 közötti volt az A260/A280 arány szerint. A miRNS prekursorok expresszióját a standard kvantitatív real-time PCR reakcióval határoztuk meg a LightCycler® 480 SYBR Green I Master PCR kit protokollal a LightCycler® 480 készüléken (Roche, Mannheim, Germany). A 20 µl PCR mix az alábbi komponensekből állt: 5 µl cDNS templát, 10 µl PCR Master Mix, 2 µl pre-miRNA-specifikus primer (10 µM minden egyes primerből (Exiqon)) és 3 µl PCR minőségű víz. A reakciókat 96-well plétben futattuk az alábbi hőprofilal: 95 °C 10 min, 55 ciklus 95 °C 10 s denaturálás, 55 °C 20 s kapcsolódás (annealing) és 72 °C 15 s meghosszabbítás (extension). A PCR futások értékelése kvantifikálással zárult egy ciklusnyi olvadásgörbe analízissel (melting curve analysis, MCA) 95 °C 5 s, 65 °C 1 min, folyamatos adatgyűjtéssel 97 °C-ig. Minden vizsgálatot három párhuzamos mérésben végeztünk el, NTC (no template control, negatív kontroll) esetében is. A futások közötti kalibrátorokat alkalmaztunk, hogy ki tudjuk számolni a futások közötti ingadozásokat és korrigálni tudjuk az eredményeket. Az értékek normalizálását az 5S rRNS és az U6 snRNS endogén referenciákra vonatkozóan végeztük el. A normalizációs faktort a referencia gének threshold ciklus (Ct) (cycle threshold) értéke alapján számoltuk ki. A miRNS expresszió relatív kvantifikálását az alábbi módszerrel számoltuk ki, $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A normalizált relatív értékeket használtuk a továbbiakban a különböző változók hatásainak statisztikai elemzéséhez, melyhez az IBM SPSS Statistics Version 2.0 szoftvert $p < 0,05$ szignifikancia szint beállítással használtuk.

4. Eredmények

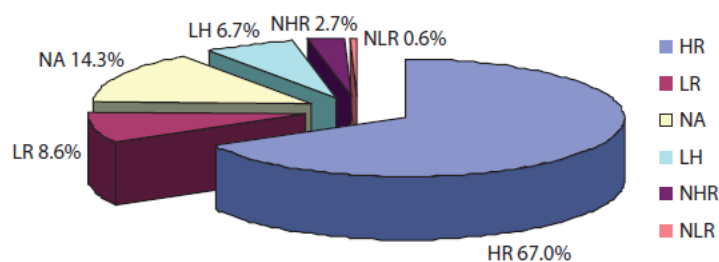
4.1. HPV tesztek klinikai alkalmazása, epidemiológiai eredmények

4.1.1. HPV genotípusok Magyarországon a Genoid laboratórium 2005/2006-ban végzett 12354 vizsgálata alapján (176)

A Genoid laboratóriumba a főleg nőgyógyászoktól, kisebb számban bőrgyógyászoktól, bőr és nemibeteg gondozókból, urológusoktól, proktológusoktól 2005/2006-ban HPV diagnosztikára érkezett magyar mintákon (n = 12354) készített epidemiológiai összefoglaló tanulmányunkban 6447 genotipizálás eredményéről számoltunk be.

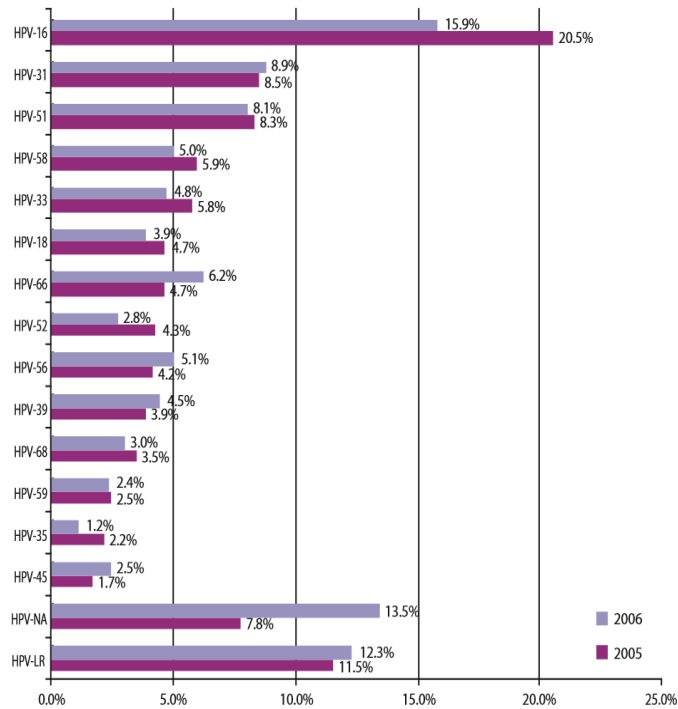
A HPV vizsgálatok HPV-DNS pozitivitási rátája 40% körül mozgott mind a két évben, ami egyértelműen magasabb, mint a korábban publikált random populációban, ahol átlagosan 17,5% volt (183). A különbséget a vizsgált populáció különbözősége okozhatja, mert míg Genoid laboratóriumba elsősorban a HPV fertőzés klinikai vagy citológiai gyanúja okán érkeztek a minták, addig a Kornya tanulmányban random lettek a nők beválogatva. A HPV kimutatásra elsősorban cervikális minták érkeztek a laboratóriumba (n=8033), melynek 41%-a HPV pozitív volt 2006-ban. Az egyéb típusú minták száma jelentősen alacsonyabb (n = 475) volt és a pozitivitási arányuk széles skálán mozgott. A HPV pozitivitási ráta a kondilóma/szövet (73-74%) és az anális (67%) mintákban volt a legmagasabb, míg az ondó (10%) esetében a legalacsonyabb.

2006-ban HPV-DNS-pozitív minták kockázati típusok szerinti eloszlása alapján (2. ábra) a HPV fertőzések legtöbbször magas kockázatú (67%) típusok voltak, míg az alacsony kockázatúak 8,6%-ban voltak kimutathatóak. A nem klasszifikált rizikójú (HPV-NA) típusok 14,3%-kal a második leggyakoribb csoportot képezték a pozitív mintákban. A multivalens fertőzések különböző kockázatú HPV típusok kombinációi, melyek közül a hrHPV és lrHPV együttes előfordulása volt a leggyakoribb (6,7%).

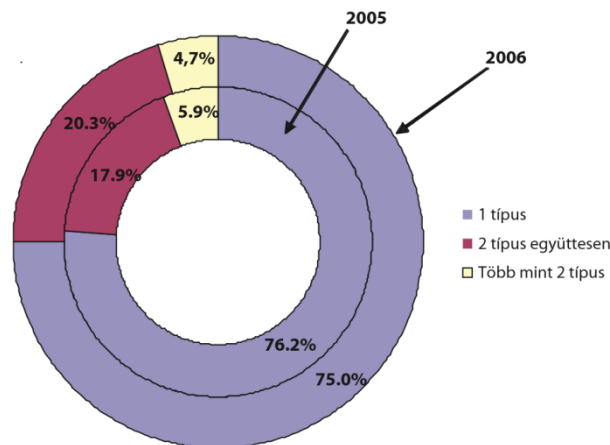


2. ábra: HPV-DNS-pozitív minták kockázati típusok szerinti eloszlása (2006). A HPV fertőzéseket legtöbbször egy típus okozza. A többszörös fertőzések lehetnek különböző kockázatú HPV típusok kombinációi, melyeket az alábbiak szerint jelöltük: HR: hrHPV; LR: lrHPV; NA: NA-HPV; LH: lrHPV és hrHPV; NHR: NA-HPV és hrHPV; NLR: NA-HPV és lrHPV [176].

A 2005/2006-ban végzett HPV tipizálási eredményeket genotípusonként csoportosítottuk (3. ábra). Mindkét évben, a legmagasabb százalékban a 16-os típus fordult elő a mintákban, 15,9% (2005) és 20,5%-ban (2006). Ezt követően 2006-ban a leggyakoribb HPV típusok a 31, 51, 66, 56, 58, 33, 39 és a 18 voltak. A HPV típusok eloszlásában kismértékű ingadozás mutatkozott a két évet összehasonlítva, azonban a HPV 16-ot kivéve az eltérés egyik típus esetében sem volt nagyobb két százaléknál. A HPV preventív vakcinálással megelőzhető HPV 16/18 genotípusok 19,8% (2005) és 25,2%-ban (2006) voltak kimutathatóak a HPV-DNS-pozitív mintákból. A tipizálási eredmény információt szolgáltat a multivalens fertőzések előfordulási gyakoriságáról is. Megállapítható, hogy nincs eltérés a két év közötti eredményekben és a monovalens fertőzések aránya mindkettőben magas (75%), a bivalens fertőzések képezik a minták 18-20%-át és 5% körüli a kettőnél több típus a mintákban (4. ábra).



3. ábra: HPV genotípusok eloszlásának változása 2005-2006-ban. A legmagasabb százalékban a 16-os típus fordult elő a HPV-DNS pozitív mintákban, 16% (2005) és 20% (2006)-ban. További leggyakoribb hrHPV genotípusok a 31, 51, 66, 56, 58, 33, 39 és a 18 voltak. A HPV típusok eloszlásában kismértékű ingadozás mutatkozott, mely a HPV 16 esetében volt a legnagyobb [176].



4. ábra: Több típusú fertőzések aránya 2005 és 2006-ban. Megállapítható, hogy nincs eltérés a két év között és a monovalens fertőzések aránya magas (75% körül), a bivalens fertőzések képezik a minták 18% és 20%-át és 5% körüli volt a kettőnél több típus a mintákban [176].

4.1.2. Human papillomavirus fertőzések a magyar női szexmunkások körében (178)

A HPV fertőzés különböző szervi lokalizációit és gyakoriságát vizsgáltuk a szexuális szokások függvényében Marek Erika és munkatársaival készült közös publikációban. A FSW-ek mintái közül legalább egy HPV DNS pozitív volt az esetek nagy többségében (82,4%), míg a kontroll nők mintáinak kevesebb, mint a fele (46,2%) volt HPV fertőzött (46,2% $p < 0,05$). A cervikális és anális minták gyakrabban voltak HPV pozitívak az FSW-eknél, mint a kontroll csoportban. A FSW-ek közel fele (44%) míg a kontrollok kevesebb, mint tíz százaléka egynél több régióban volt HPV pozitív. A szexmunkások hrHPV prevalenciája magasabb volt (55,9%), mint a kontroll csoporté (25%) és a cervikális és anális minták többségben hrHPV pozitívak voltak. Többes fertőzés a szexmunkások negyedében volt megfigyelhető, a kontroll csoportban kevesebb, mint 10%-ban ($p < 0,05$). A vizsgált két csoport hrHPV pozitív mintáiban a HPV31 volt a leggyakoribb (19,3%) - különösen a FWS mintákban -, ezt követték az alábbi típusok 16, 66, 18, 51, 58 és 56 (14%, 10,5%, 8,8%, 8,8%, 8,8%, 7,0%). A HPV31, 16, 18, 58, 66 és 33 főleg a FSW mintáiban volt pozitív, míg a HPV 51 elősorban a kontroll csoportban fordult elő, bár a két csoportban a genotípusok eloszlásában megfigyelt különbségek statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

A szexuális aktivitás kezdetének időpontja, illetve időtartama és a HPV prevalencia között nem volt kimutatható összefüggés egyik csoportban sem. Viszont szignifikáns összefüggés mutatkozott a HPV, a hrHPV és a többszörös HPV fertőzések és a jelenlegi, illetve napi szexuális partnerek száma között.

A FSW-ek hüvelyi közösülés során következetesen használtak óvszert (94,1%), azonban közel kétharmaduk HPV fertőzött volt, amelynek 75%-a hrHPV volt és fele többes fertőzésnek bizonyult. A kontroll csoportban a cervikális minták egyharmada volt HPV fertőzött, amelynek 44,4%-a volt hrHPV és többes fertőzést 27,7%-ban detektáltunk, ami érdekes, mert a kontroll csoport többsége (57,7%) nem használt óvszert hüvelyi közösülés során. Az FSW-ek garat mintája háromszor gyakrabban volt HPV fertőzött, mint a kontroll minták (20,6% vs. 7,7%), és a FSW csoportban az orális szexet gyakorlók száma kétszer akkora volt, mint a kontroll csoportban (21,2% vs. 10,5%). A kontroll csoportban a nők többsége kondom nélkül gyakorolt orális szexet, mégis csak tizből egy esetben (11,1%) volt HPV DNS pozitív a garat mintája. A FSW-ek többsége

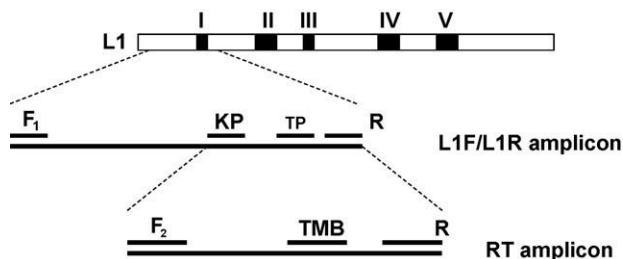
(54,4%) következetes óvszer használó volt orális szex közben vagy általában használt óvszert (33,3%), a negyedük (24,1%) mégis HPV fertőzött volt a garat területén. Az orális szexet nem gyakorlók garat mintái HPV DNS negatívak voltak. A FSW-ek fele és a kontroll csoport negyede gyakorolt anális szexet. A szexmunkások anális mintáinak a fele, míg a kontroll csoportnak csak a 15%-a volt HPV pozitív. Az anális HPV pozitív minták többsége az anális szexet nem gyakorlókhoz tartozott (FSW 58,8%, kontroll 75%). A FSW-ek nagy része (82,4%) következetes óvszer használó volt anális szex során, mégis a vizsgált személyek közel fele HPV pozitív volt.

Marek Erika munkacsoportja által összeállított és elemzett kérdőív adatai szerint a nemi úton terjedő betegségek megelőzése érdekében a FSW-ek jelentős számban (79,4%) fürödtek a nemi testtájékon két partner között és hasonló mértékben (78,8%) zuhanyoztak vagy fürödtek a kontroll csoportban a nők a szexuális aktusok után. A kontroll csoport tagjai tájékozottabbak voltak a HPV és a vírus okozta betegségek témájában; legtöbbjük (81%) hallott a HPV-ről és arról, hogy a vírus rákot okozhat (77%), míg csak a FSW-ek fele hallott a HPV-ről és körülbelül 40% ismerte a kapcsolatát a méhnyakrákkal. A HPV és a nemi szemölcs oki összefüggését még kevésbé ismerték mindkét csoportban: a FSW-ek egyharmada és a kontroll csoport fele ismerte ezt az összefüggést. A FSW-ek szignifikánsan nagyobb százalékban számoltak be korábbi genitális szemölcs fertőzésről (26,5% vs. 3,8%) és gyakoribb volt náluk a nemi úton terjedő fertőzés, mint a chlamydia vagy gonorrhoea, saját bevallásuk szerint. A HPV oltás ismertsége szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoportban, mint a FSW-eknél (73,1% vs. 41,2%). Ha ingyen hozzá lehetne jutni a HPV oltáshoz, szinte mindenki beoltatná magát a kérdőív szerinti válaszok alapján (FSW 100%, kontroll 94,2%)

4.1.3. MBRT-HPV teszt fejlesztése és klinikai validálása

A tudományos eredmények összegző tanulmányai alapján (51, 62, 66) a HPV kimutatás alkalmazási területei a méhnyakrák szűrésben kibővültek. A HPV kimutatás alkalmazása felmerült mind a citológia triage-ban mind, mint elsődleges szűrő teszt (citológiával vagy anélkül). Ezen új igények, új megközelítéseket tettek szükségessé, mivel az addigi tesztek nem voltak alkalmasak automatizálásra és az elvégezhető vizsgálatok száma is korlátos volt. Elképzelésünk szerint egy új real-time PCR technológiájú HPV teszt hatékony megoldást jelenthet, mivel teljesen automatizálható,

nagy áteresztőképességű. Ez az úgynevezett molekuláris beacon real-time-HPV teszt (MBRT-HPV teszt) (179), amely a korábban publikált Full Spectrum L1F/L1R-HPV primer rendszer alapú multiplex PCR rendszer (177) továbbfejlesztése. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV primer rendszert a HPV genom L1 génjén az első hipervariábilis régióban helyezkedik el (184) és magas variabilitást mutat lehetővé téve a klinikailag fontos HPV genotípusok megkülönböztetését. A kifejlesztett real-time HPV teszt 15 hrHPV és 5 lrHPV típust detektál. A rendszer 16 forward és 16 reverse primert alkalmaz, és ugyanazon primer kötő helyeket alkalmazza, mint a korábbi Full Spectrum L1F/L1R-HPV amplifikációs rendszer, a reverse primerek ugyanazok, a forward primerek újra lettek tervezve arra a szakaszra, ahová a korábbi rendszerben az univerzális próba kötődik (177) (5. ábra).



5. ábra: A primerek és próbák elhelyezkedésének sematikus ábrázolása Full Spectrum L1F/L1R-HPV és MBRT-HPV reakciókban. Mindkét rendszer targetjét az L1 ORF első hipervariábilis régiójára tervezték. A rövidebb RT amplicon a hosszabb Full Spectrum L1F/L1R-HPV ampliconon belül helyezkedik el. A HPV16 L1-ORF (5526-7154bp) esetében a Full Spectrum L1F/L1R-HPV amplicon 5609bp-tól az 5861bp-ig helyezkedik el, míg az RT amplicon s 5724 bp-tól az 5861bp-ig tart. Mindkét rendszer ugyanazt a reverz primer készletet használja. A forward primerek a RT rendszerben ugyanazokat a szakaszokat célozzák, ahol a L1F / L1R univerzális hibridizációs próbái helyezkednek el (179).

RT amplicon: real-time amplicon, azaz MBRT-HPV teszt amplicon, KP: közös próba, TP: típus specifikus próba, TMB: típus specifikus molekuláris beacon próba

Ez a multiplex rendszer a korábbi (Full Spectrum L1F/L1R-HPV) rendszerrel azonos HPV típusokat amplifikálja, viszont csak 20 típus-specifikus molekuláris beacon próbát tartalmaz a reakció, azért a rendszer csak 20 HPV típust képes kimutatni (15 hrHPV és 5 lrHPV csoportban) (5. ábra).

A MBRT-HPV reakció fejlesztői által végzett analitikai vizsgálatok adatai szerint a 20 kimutatott HPV legalacsonyabb detektálható kópiaszáma 22-700 között volt (3.

táblázat). Az analitikai specificitási vizsgálatokat 45-féle HPV genotípust hordozó plazmid és egyes esetekben klinikai minták segítségével vizsgáluk, ahol a MBRT-HPV rendszer egyes hrHPV és lrHPV típusai keresztreakciót mutattak. A hrHPV 31, 39 pozitív jelet adott a lrHPV csatornában, illetve a HPV82, 3, 70, 54 típusok hrHPV jelet adtak. Néhány ritka egyéb low-risk típus keresztreakciót mutatott a low-risk csatornában (27, 29, 30, 67, 89).

3. táblázat: A MBRT-HPV reakcióban kimutatott 20 HPV típus legkisebb detektálható kópia értékei (179).

HPV típus	Legkisebb detektálható kópia/reakció
HPV 6	44
HPV 11	44
HPV 42	22
HPV 43	44
HPV 44	22
HPV 16	44
HPV 18	44
HPV 26	700
HPV 31	88
HPV 33	88
HPV 35	44
HPV 39	22
HPV 45	22
HPV 51	22
HPV 52	175
HPV 56	44
HPV 58	612
HPV 59	44
HPV 66	44
HPV 68	350

Saját vizsgálataim szerint a MBRT-HPV teszt klinikai teljesítőképességének vizsgálatában 161 random klinikai mintát vizsgáltunk és az eredményeket összehasonítottuk a Full Spectrum L1F/L1R-HPV primer alapú multiplex PCR és

hibridizálás teszttel kapott eredményekkel. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszer 14 féle hrHPV genotípust egyedileg tipizál (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) és csoportban detektálja az 5 lrHPV genotípust (6, 11, 42, 43, 44) illetve a kockázati csoportba nem besorolt 29 HPV genotípusokat (NA-HPV). A MBRT-HPV teszt a 14+1 hrHPV típust csoportban mutatja ki (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 és a feltételezetten magas kockázatú HPV26) és csoportban detektálja az 5 lrHPV típust (6, 11, 42, 43, 44). A Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszerrel 80 pozitív és 71 negatív esetet és további 10 NA-HPV fertőzést detektált. A két tesztet összehasonlítva az egyezés 89,44%-os volt. A 144 MBRT-HPV teszt által helyesen detektált minta közül 50 minta volt hrHPV, 6 minta lrHPV, 11 minta hrHPV és lrHPV pozitív volt és 77 eset bizonyult negatívnak. Tíz eltérő eredményt adó minta (6,83%) a MBRT-HPV teszttel negatív eredményt adott. Ezek közül 6 esetben a Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszer hibridizációs jele alacsony volt. További 7 esetben a MBRT-HPV pozitív, eltérő eredményt adott, valószínűleg MBRT-HPV teszt ismert keresztreakciói miatt (4,34%). Ezekben az esetekben a hrHPV31 hrHPV és lrHPV pozitív lett, illetve a nem besorolt HPV típusok valamelyike hrHPV illetve lrHPV eredményt adott a vizsgált MBRT-HPV rendszerrel. Az összehasonlító vizsgálat alapján megbecsült szenzitivitás és specificitás értékeket a 4. táblázat tartalmazza, mely szerint a becsült szenzitivitás 95,45% (63/66) a becsült specificitás 91,57% (87/95) és a two-tailed Fischer exact probability teszt $p=4,65 \times 10^{-27}$ szignifikáns eredményt adott. A keresztreakciók további vizsgálatában a Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszerrel lrHPV eredményt adó 25 minta közül kettő minta mutatott hrHPV keresztreakciót, melyből egy szekvenálással HPV89 típusnak bizonyult, a másik eset kevert fertőzés volt. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszerrel nem besorolt (NA) HPV eredményt adó 50 minta közül a real-time rendszer 7 esetben adott hrHPV jelet. Szekvenálással ezek a minták az alábbi HPV típusokat tartalmazták: HPV70, 82, 87, 90, 91, további két minta HPV45 fertőzött volt.

4. táblázat: A Full Spectrum L1F/L1R-HPV és az MBRT-HPV tesztek hrHPV kimutatási eredményeinek összehasonlítása. A real-time PCR-alapú rendszer becsült szenzitivitása 95.45% (63/66) és becsült specificitása 91.57% (87/95) ($p=4.65 \times 10^{-27}$ (two-tailed Fisher exact probability teszt)(179).

	MBRT-HPV hrHPV pozitív	MBRT-HPV hrHPV negatív	Összes
Full Spectrum L1F/L1R- HPV hrHPV pozitív	63	8	71
Full Spectrum L1F/L1R- HPV hrHPV negatív	3	87	90
Összes	66	95	161

4.1.3.1. CERVIVA study eredmények: Full Spectrum L1F/L1R-HPV és MBRT-HPV-ABI összehasonlító vizsgálata (180)

A MBRT-HPV teszt automatizálhatóságának továbbfejlesztése érdekében a molekuláris beacon alapú real-time HPV detektáló teszt (179) egy új ABI 7900 platformra adaptált verzióját fejlesztették ki (MBRT-HPV-ABI). A teszt klinikai teljesítőképességének vizsgálatait nemzetközi együttműködés keretében végeztük (180) (CERVIVA study - Irish Cervical Screening Research Consortium, www.cerviva.ie). A studyba 2008-2010 között egy írországi kolposzkópos klinikán (Coombe Women and Infants University Hospital, Dublin (CWIUH) megjelent betegek közül azokat a nőket válogatták be a vizsgálatokba, akiknek legalább két egymást követő citológiai kenet eredményük pozitív volt. A betegektől PreservCyt (Hologic) LBC mintát vettek le a klinikán történő első megjelenésük alkalmával. A citológia vizsgálat után megmaradt mintákat használták fel a HPV összehasonlító vizsgálatokhoz. Három HPV DNS tesztet hasonlítottunk össze a kolposzkópia klinikára beutalt betegek mintáin: HC2, MBRT-HPV-ABI, Full Spectrum L1F/L1R-HPV. Minden mintát genotipizáltunk a LA-HPV teszttel (185), hogy meghatározzuk, a tesztek közötti eltérések okát. A vizsgált betegek citológiai eredményei a Bethesda értékelés alapján az alábbi eloszlást mutatták: negatív 14,5% (35/241), ASCUS 9,1% (22/241), LSIL 24% (58/241), HSIL 52,3% (126/241) a 20-60 éves korosztályban (átlag életkor 33 év). A hisztológiával konfirmált esetek száma 185 volt. A hisztológia diagnózisok az alábbiak voltak: 5,9% (11/185) normál, 23,2% (43/185) CIN1, 70,8% (131/185) CIN2+. Az LSIL a 30 év alattiak csoportjában több volt (31,1% (0,95CI 27,1-35,2%)), mint a 30 év feletiekben (17,8% (0,95CI, 15,3-20,2%)). A

HSIL előfordulása a 30 év felettekben volt gyakoribb (59,3% (0,95CI 55,2-63,3%)) a harminc év alattiakhoz képest (43,4% (0,95CI 38,7-48,0%)).

A PreservCyt mintán valid eredményt adó (n=241) három HPV DNS teszt a kolposzkópiára utalt betegek populációjában az alábbi hrHPV prevalenciája értékeket mutatta: 78,8 (186/236) Full Spectrum L1F/L1R-HPV, 83,3% (195/234) HC2, 78,8% (166/211) MBRT-HPV-ABI. Értékelhető eredményt 198 citológia minta adott mind a három HPV teszttel. Ebben a csoportban a tesztek egyezése a HC2 teszthez képest az alábbi volt: Full Spectrum L1F/L1R-HPV 94,6% ($\kappa = 0,792$), MBRT-HPV-ABI 87,4% ($\kappa = 0,532$). Nem volt szignifikáns különbség a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 teszt között a hrHPV detektálásában. A MBRT-HPV-ABI és a HC2 teszt között szignifikáns volt a különbség (McNemar's Test, $p = 0,0164$). A HPV prevalenciák szignifikáns korosztályi eltérést mutattak a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 tesztek esetében, a 30 év alatti (<30) és a 30. évüket betöltött (30+) nők csoportjaiban. A MBRT-HPV-ABI teszt HPV prevalenciája nem mutatott korosztályi eltérést. A három HPV teszt hrHPV prevalenciáit a citológiai kategóriákon belül vizsgálva megállapítható, hogy a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 mindenütt hasonlóan jó eredményt mutatott, míg a MBRT-HPV-ABI HPV kimutatási rátája alacsonyabb mindegyik citológiai kategóriában (5. táblázat). A Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 teszt hasonlóan magas HPV pozitivitást adott a NILM (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, negatív az intraepiteliális elváltozásra vagy malignitásra) citológiai mintákban (26,1%-30,4%), ezt követte az ASCUS, majd az LSIL (83,7%-85,7%) végül a HSIL (97,3-100%).

5. táblázat: Teljes HPV és hrHPV kimutatás a különböző citológiai kategóriákban a HC2, Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV-ABI teszttel (180).

Citológiai diagnózis	NILM ^a	ASCUS ^b	LSIL ^c	HSIL ^d	Összes HPV pozitív
hrHPV pozitív, HC2 ^e	30,4% (7/23)	86,7% (13/15)	85,7% (42/49)	100% (111/111)	87.4% (173/198)
HPV pozitív, Full Spectrum L1F/L1R-HPV	60,9% (14/23)	86,7% (13/15)	98,0% (48/49)	99.1% (110/111)	89.9% (178/198)
hrHPV pozitív, Full Spectrum L1F/L1R-HPV	26,1% (6/23)	80,0% (12/15)	83,7% (41/49)	97.3% (108/111)	84.3% (167/198)
HPV pozitív ^g MBRT-HPV-ABI	30,4% (7/23)	60,0% (9/15)	85.7% (42/49)	94.6% (105/111)	85.9% (170/198)
hrHPV pozitív, MBRT-HPV-ABI	30,4% (7/23)	60,0% (9/15)	79.6% (39/49)	94.6% (105/111)	80.8% (160/198)

- a. Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy - negatív az intraepiteliális elváltozásra vagy malignitásra
b. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance - ASC-US, atípusos laphámsejtek meghatározható ok nélkül
c. Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion - LSIL, enyhe fokú laphám-eredetű intraepiteliális lézió (CIN 1)
d. High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion - HSIL, súlyos fokú laphám-eredetű intraepiteliális lézió (CIN 2, CIN 3, invázió gyanúja)
e. Hybrid Capture által kimutatott HPV típusok: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 és 68.
f. Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszer által kimutatott HPV típusok: hrHPV:6, 11, 42, 43, 44; hrHPV:16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; NA-HPV: 2a, 3, 7, 10, 13, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 40, 53, 54, 57, 61, 67, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 89, 90 és 91.
g. MBRT-HPV-ABI teszt által kimutatott HPV típusok: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 6 és 11.

A különböző HPV tesztek klinikai teljesítőképességének megállapításakor a szenzitivitást és a PPV értékeket határoztuk meg, CIN2+ hisztológiailag konfirmált elsődleges klinikai végpontra számolva. A 241 nőbeteg ezen speciális kohortjában 185 esetben volt hisztológiai diagnózis elérhető. Értékelhető eredményt adó hrHPV tesztek CIN2+ végpontra (n = 122) vonatkoztatott szenzitivitásait és PPV-it a 6. táblázat foglalja össze. A HC2, Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV-ABI teszt szenzitivitásai 98, 3%, 97,4% és 93,9% voltak, míg a PPV a HC2, Full Spectrum L1F/L1R-HPV és MBRT-HPV-ABI teszt esetében 94,1%, 94,1% és 97,3% értékeket mutatott.

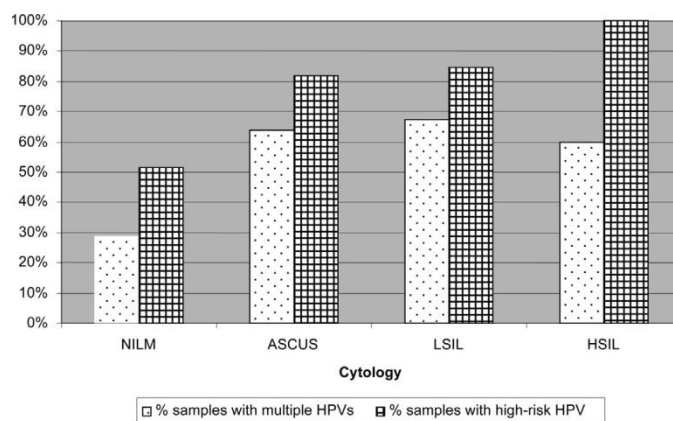
6. táblázat: A HPV tesztek szenzitivitása és pozitív prediktív értéke a CIN2+ betegség diagnózisára vonatkozóan (n=122) (180).

HPV teszt	CIN2+ hisztológia	
	szenzitivitás	PPV
HC2	112/114 (93,3%) 95% CI (97,9–98,3%)	112/119 (94,1%) 95% CI (93,1–95,1%)
Full Spectrum-HPV (hrHPV)	111/114 (97,4%) 95% CI (96,9–97,8%)	111/118 (94,1%) 95% CI (93,1–95,1%)
MBRT-HPV (hrHPV)	107/114 (93,9%) 95% CI (92,8–94,9%)	107/110 (97,3%) 95% CI (96,8–97,8%)

A HPV genotípusok LA-HPV teszttel végzett meghatározását használtuk a három vizsgált HPV-DNS teszt eltérő hrHPV eredményeinek a feloldására, nevezetesen, ha a minta két vagy több vizsgált teszttel egyező eredményt adott, akkor ezt tekintettük a valódi genotípusnak. Ha a két egyező eredmény közül az egyik a LA-HPV eredménye volt, akkor az LA-genotípus eredményét vettük figyelembe a minta genotípusának meghatározásakor. A negatív LA-HPV eredményt az álpozitív esetek meghatározására használtuk azokban az esetekben, amikor csak egy teszt adott pozitív eredményt és az LA-HPV teszt negatív lett az adott teszt által kimutatott típusokra. Álnegatív eredménynek tekintettük azokat a teszt eredményeket, amikor pozitív eredményt adott a másik két teszt vagy az egyik teszt és a LA-HPV teszt azokra a genotípusokra vonatkozóan, amelyeket az adott technológia kimutat. A HC2 4 álpozitív és 4 álnegatív esetet mutatott. Két eset keresztreakciót adott hrHPV típusokkal, a maradék két eset negatív volt mindegyik teszttel. A 4 álnegatív HC2 minta az alábbi genotípusokat tartalmazta 16, 39, 56, 51, 52. Négy az 5 mintából HPV16 fertőzést is mutatott. A MBRT-HPV-ABI teszt eredményei 16 esetben bizonyultak álnegatívnak és 3 esetben álpozitívnak. Az alábbi hrHPV típusokat tartalmazták az álnegatív minták: 35, 52, 16, 68, 39, 51, 56, 31, 58. A leggyakoribb álnegatív típusok a HPV16 (9/16) és a HPV51 (4/16) voltak a MBRT-HPV-ABI- teszt esetében. Az álpozitív minták hrHPV genotípusokat tartalmaztak (53, 73, 42, 54) és negatívak voltak a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 tesztekre. A Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt nem adott álpozitív eredményt, 5 álnegativitást mutatott. Az álnegatív minták a 16, 18, 31, 33, 52 genotípusokkal voltak fertőzve. Öt mintából 2 tartalmazott HPV16 genotípust. Az 5 álnegatív mintából négy esetben a MBRT-HPV-ABI és a HC2 is pozitív volt, míg egy esetben a MBRT-HPV-

ABI-negatív volt és a HC2-pozitív lett és a LA-HPV teszt a HPV52- genotípusra mutatott pozitivitást.

Az LA-HPV teszt HPV genotipizálási eredményeit (16 hrHPV és 21 lrHPV vagy egyéb nem klasszifikált HPV) a citológiai kategóriák szerinti csoportosításban a 6. ábrán összesítettük, a hrHPV mellett feltüntetve a többszörös fertőzések arányát is. A citológiai kategóriák súlyosságával emelkedett a hrHPV pozitív esetek aránya (NILM: 51,4%, ASCUS:81,8%, LSIL:84,5%; HSIL:100%). A többszörös fertőzések száma a legkisebb a NILM (28,6%) csoportban volt, majd ezt követte a HSIL (60,0%) az ASCUS (63,8%) és az LSIL (67,2%).



6. ábra: A hrHPV és a többszörös HPV fertőzések prevalenciája a Linear Array HPV Genotyping teszttel (37 HPV genotípust mutat ki: HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, and CP6108) a kolposzkópos kohortban vizsgált 239 nő mintáján (180).

*samples with multiple HPV*s: többszörös HPV pozitív minták; *samples with high-risk HPV*: hrHPV pozitív minták

4.2. CLDN1 immunfestés, mint a cervikális citológia és hisztológia biomarkere (145)

A méhnyakrák szűrés hatékonyságának növelését célzó tanulmányokban a HPV illetve citológia tesztek kiegészítő, úgynevezett triage módszereit, mint a méhnyaki elváltozások biomarkereit vizsgálják. Szerzőtársaimmal közösen a CLDN1

immunfestést, mint a cervikális citológia és hisztológia biomarkerét alkalmaztuk citológia, illetve HPV triage elrendezésekben.

A study populáción kapott vizsgálati eredményeket (citológia, HPV, hisztológia, IC-p16^{INK4a}, IC-CLDN1, IH-p16^{INK4a}, IH-CLDN1) a 7. táblázatban összesítettük. A cervikális betegségre vonatkozólag a CIN2+ hisztológiai eredményt tekintettük pozitívnak. Az eredményeket összehasonlító statisztikai számításokra csak abban az esetben választottuk be a mintát, ha a mintából elvégzett összes vizsgálat valid eredményt adott. Az összehasonlító vizsgálatra beválogatott esetek közül 45,7% CIN2+ (133/291), 41,7% (165/395) ASCUS+ eredményt adott és hasonlóan magas volt a HPV prevalencia is 45,5% (179/395). Az immuncitokémia tesztek teljesítményét kétféle szűrőteszt, a citológia, illetve a HPV triage tesztként vizsgáltuk.

7. táblázat: Multicentrikus vizsgálatban vizsgált minták eredményei (145).

a. Minták diagnózis szerinti csoportosításokban. Összesen 502 minta begyűjtése, melyből 352 citológiai indikációval végzett konizációs beavatkozás során levett minta (LBC és hisztológia minták) és 150 egy szűrő populációban egymást követően levett LBC minta. A citológia és a HPV teszt szenzitivitása és specifitása a gold standard hisztológia CIN2+ diagnózisra, mint klinikai cut-offra számolva.

b. Mintaszámok az elvégzett vizsgálatok szerinti felosztásban (citológia, hisztológia, HPV, immuncitokémia [IC-CLDN1, IC-p16^{INK4a}] és immunhisztokémia [IH-CLDN1, IH-p16^{INK4a}] diagnózisok). Azok a minták voltak statisztikai számításokba alkalmasnak ítélve, melyek esetében az adott számításhoz szükséges összes vizsgálat el lett végezve.

(LBC: liquide based cytology, CIN2+: cervical intraepithelial neoplasia grade 2 vagy súlyosabb, HPV: human papilloma vírus)

a.

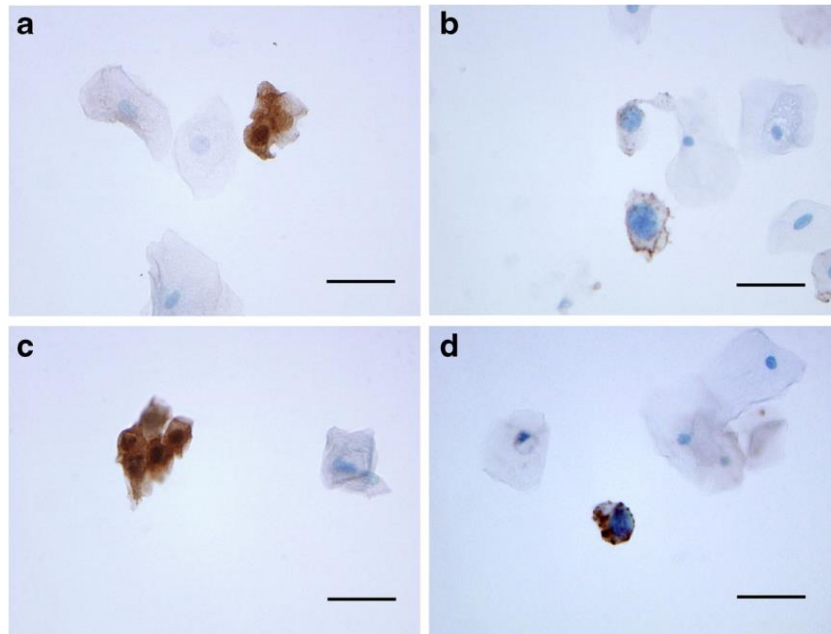
Hisztológia	n=291	Citológia	n=395	HPV	n=395
CIN1-	129	negatív	230	hrHPV pozitív	179
CIN1+	162	ASCUS	62	hrHPV negatív	216
CIN2-	158	LSIL	45		
CIN2+	133	HSIL	58		
		ASCUS+	165		
		szenzitivitás (CIN2+) (95%CI)	75,2 % (68,9-80,8)	szenzitivitás (CIN2+) (95%CI)	95 % (89,9-97,7)
		specifitás (CIN2+) (95%CI)	66,5 % (61,1-71,2)	specifitás (CIN2+) (95%CI)	61,4 % (57,4-63,6)

b.

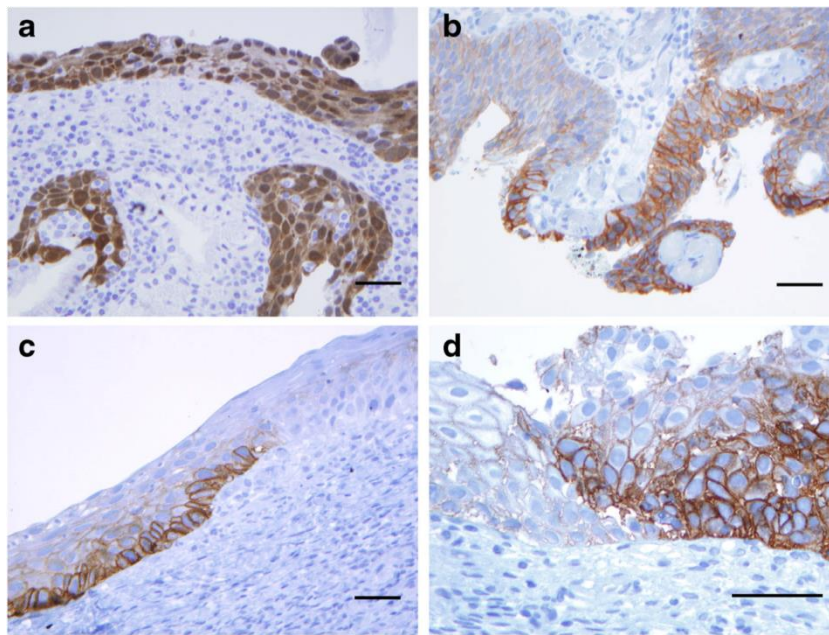
	Hisztológia	Citológia	HPV	IC- p16^{INK4a}	IC- CLDN1	IH- p16^{INK4a}	IH- CLDN1
összes teszt	342	458	452	202	194	288	280
statisztikára alkalmas	291	395	395	172	172	261	261
hisztológia eredménnyel		291	279	162	162	239	239
citológia eredménnyel	291		395	158	158	210	210
HPV eredménnyel	279	395		172	172	195	195

Az SM (scoring method, pontozás alapú módszer) értékeléssel a CLDN1 és p16^{INK4a} immunkémiai vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása (lásd a reprezentatív fotókat az immunfestődésekről CLDN1 (7b., 7d., 8b., 8c., 8d. ábra) és p16^{INK4a} (7a., 7c., 8a. ábra) CIN2+ klinikai végpontra nézve a 8. táblázatban szereplő eredményeket mutatta. Az immuncitokémia (IC) eredmények szerint az IC-CLDN1 kicsit érzékenyebb volt, mint az IC-p16^{INK4a} (77,3% (68,7-84,6) vs. 69,3% (60,9-76,3)), míg a specificitás tekintetében az IC-CLDN1 adott alacsonyabb értéket (60,9% (53,5-67,2) vs. 80,5% (73,2-86,5). Hasonló mintázat volt megfigyelhető az immunhisztokémia eredmények összehasonlításakor, azonban a specificitás értékek nagyobb eltérést mutattak (szenzitivitás: IH-CLDN1 88,2% (81,7-93,2) vs. IH-p16^{INK4a} 80,5% (73,2-86,5) és a specificitás: IH-CLDN1 33,3% (28,5-37) vs. IH-p16^{INK4a} 68,1% (96,2-73)). A IC-CLDN1 eredményét a citológiával összehasonlítva nem mutatkozott szignifikáns különbség (szenzitivitás: IC-CLDN1 77,3% (68,7-84,6) vs. citológia 75,2% (68,9-80,8) és a specificitás IC-CLDN1 60,9% (53,5-67,2) vs. citológia 66,5% (61,1-71,2). Azonban az IC-p16^{INK4a} eredmények alacsonyabb szenzitivitást és magasabb specificitást mutattak (szenzitivitás: 69,3% (60,9-76,3), specificitás: 80,5% (73,2-86,5)). Az IC-CLDN1 eredményeit a HPV teszttel összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy alacsonyabb lett a szenzitivitás hasonló specificitás értékekkel (szenzitivitás: IC-CLDN1 77,3% (68,7-84,6) vs. HPV 95% (89,9-97,7) és a specificitás IC-CLDN1 60,9% (53,5-67,2) vs. HPV 61,4% (57,4-63,6)). Az IC-p16^{INK4a} eredmények még alacsonyabb szenzitivitást és még magasabb specificitást mutattak (szenzitivitás: 69,3% (60,9-76,3), specificitás: 80,5% (73,2-86,5)). Az IH-CLDN1 magasabb szenzitivitással társulva (88,2% (81,7-93,2)

elfogadhatatlanul alacsony specificitású (33,3% (28,5-37)). Ezzel ellentétben áll az IH-p16^{INK4a} teszt, melynek kicsit nagyobb a specificitása, ugyanakkor jóval alacsonyabb a szenzitivitása, mint a HPV tesztnek (szenzitivitás: 75,5% (67-81,1), specificitás 68,1% (62,2-73)).



7. ábra: p16^{INK4a} és CLDN1 immunocitokémiai reakció LBC mintákon. Erős sötétbarna pozitív p16^{INK4a} reakció a diszpláziás sejtek sejtmagjában és citoplazmájában (a, c). Vékony lineális membrán CLDN1 reakció (b) és pontszerű membrán és citoplazma CLDN1 reakció (d). Számos normál sejt a mintában nem expresszálja az antigéneket, az ábrázolt skála 35 μ m (145)



8. ábra: p16^{INK4a} és CLDN1 immunhisztokémiai reakció cervikális mintákon. Erős sejtmagi és citoplazmatikus p16^{INK4a} reakció CIN3 (a) lézióban. A CLDN1 reakció membránhoz kötött a CIN3 (b, d) és CIN1 (c) léziókban. CLDN = claudin, az ábrázolt skála 50 μm (145)

A MASM (morphological reading adjusted scoring method, morfológiát figyelembe vevő értékelési módszer) szerinti immuncitokémiai festések értékelése során csak a morfológiailag pozitív sejteket vettük figyelembe. Általában jellemző volt, hogy a MASM értékeléssel az immuncitokémiák szenzitivitása csökkent, azonban az SM értékeléssel összevetve a CIN2- esetekre vonatkozóan észrevehetően jobb egyezést adtak az értékek (IC-p16^{INK4a} és az IC-CLDN1 SM és MASM értékeléssel a CIN2- esetekben az egyezés: SM (IC-p16^{INK4a} és az IC-CLDN1 69% (59,6-75,8) vs. MASM IC-p16^{INK4a} és az IC-CLDN1 85,1% (76,8-90,0). Az eredmények egyezése a CIN2+ esetekben alacsonyabb értéket adott, az eltérések a MASM értékeléssel kapott alacsonyabb szenzitivitásból erednek (IC-p16^{INK4a} és az IC-CLDN1 SM és MASM értékeléssel a CIN2+ pozitív esetekben az egyezés: SM (IC-p16^{INK4a} és az IC-CLDN1 84,0% (73,8-89,7) vs. MASM IC-p16^{INK4a} és az IC-CLDN1 69,3% (56,8-79,7). Ennél is fontosabb, hogy a markerek specificitása javult a MASM vizsgálati módszerrel, különösen a p16^{INK4a} esetén. Az IC-CLDN1 érzékenysége egyenlő volt az IC-p16^{INK4a} érzékenységgel [53,3% (95% (89,9-97,7) vs. 52,0% (43,8-58,6)], ennek ellenére az IC-CLDN1 specificitása javult az SM értékeléshez képest [77,0% (69,6-83,6) vs. 60,9% (53,5-67,2)], azonban

alacsonyabb volt, mint az IC-p16^{INK4a} értéke [77,0% (69,6-83,6) vs. 85,1% (78-90,8)]. Ugyanezt a mintázatot mutatta az IH-CLDN1 MASM értékelése a SM-hez képest a specificitás területén az IH-CLDN1 specificitás [33,3% (28,5-37) vs. 69,3% (63,6-74,8)], azonban ez a szenzitivitás csökkenésével járt: 88,2% (81,7-93,2) vs. 52,0% (44,3-59)].

Vizsgálatok		Értékelési protokollok	
		SM	MASM
IC- CLDN1	szenzitivitás (95%CI)	77,3 % (68,7–84,6)	53,3 % (44,7–61)
	specificitás (95%CI)	60,9 % (53,5–67,2)	77 % (69,6–83,6)
IC- p16 ^{INK4a}	szenzitivitás (95%CI)	69,3 % (60,9–76,3)	52 % (43,8–58,6)
	specificitás (95%CI)	80,5 % (73,2–86,5)	85,1 % (78–90,8)
IC-p16 ^{INK4a} és/vagy IC-CLDN1	szenzitivitás (95%CI)	NA	69,3 % (60,7–76,8)
	specificitás (95%CI)	NA	73,6% (66,1–80)
IH- CLDN1	szenzitivitás (95%CI)	88,2 % (81,7–93,2)	52 % (44,3–59)
	specificitás (95%CI)	33,3 % (28,5–37)	69,3 % (63,6–74,8)
IH- p16 ^{INK4a}	szenzitivitás (95%CI)	75,5 % (67–81.1)	54,9 % (48,8–59,8)
	specificitás (95%CI)	68,1 % (62,6–73)	91,2 % (86,4–94,4)
IH- p16 ^{INK4a} és/vagy IH-CLDN1	szenzitivitás (95%CI)	NA	85,3 % (78,4–90,7)
	specificitás (95%CI)	NA	67,2 % (62–71,2)
HPV	szenzitivitás (95%CI)	95 % (89,9–97,7)	NA
	specificitás (95%CI)	61,4 % (57,4–63,6)	NA

8. táblázat: Immunkémiai vizsgálatok szenzitivitása és specificitása a gold standard hisztológia CIN2+ diagnózisra, mint klinikai cut-offra számolva (145). SM: simple scoring method, egyszerű értékelés; MASM: morphological reading adjusted scoring method, morfológiai értékeléssel módosított pontozásos módszerrel, HPV (hr-HPV) és citológia (ASCUS+) szenzitivitás és specificitás adatok szintén fel vannak tüntetve; NA: not applicable, nem kezelhető eset

A citológia és a HPV és az immunkémia (mindkét IC és IH) tesztek teljesítményének összehasonlításában sokkal specifikusabbak voltak a biomarkerek, különösen a MASM értékeléssel, amely felülmúlta a citológia, vagy a HPV teszt specificitását [77,0% (69,6-83,6) a IC-CLDN1, 85,1% (78-90,8) az IC-p16^{INK4a}, 69,3% (63,6-74,8) IH-CLDN1, 91,2% (86,4-94,4) IH-p16^{INK4a} vs. 66,5% (61,1-71,2) citológia és 61,4% (57,4-63,6) HPV]. A MASM értékelési módszer másik fontos jellemzője a p16^{INK4a} és CLDN1 vizsgálatok rendkívül hasonló teszt eredménye az IH-CLDN1 észrevehető kivételével, melynek esetében az SM értékeléssel kapott eredmények sokkal specifikusabbak, azonban még mindig lényegesen alacsonyabb értékűek, mint az IH-p16^{INK4a} eredményei. Megvizsgáltuk, hogy a tesztek kombinációja mennyire javítja a teljesítményt. Elméletileg, ha bármilyen marker kombinációt alkalmazunk és bármelyik teszt pozitivitását tekintjük pozitív esetnek, azt a tendenciát tapasztaljuk, hogy a teszt érzékenysége nőni, míg a specificitása csökkenni fog. Az immunfestések MASM értékeléssel készült kombinációit kiszámoltunk (8. táblázat). Az eredmények változásának várt tendenciája beigazolódott; mind a IC mind az IH vizsgálatok kombinációi nagyobb érzékenységet mutattak együtt, mérsékelt specificitás csökkenés mellett [érzékenység: 69,3% (60,7-76,8) kombinált IC vizsgálat, 85,3% (78,4 -90,7) kombinált IH teszt; specificitás: 73,6% (66,1-80) kombinált IC vizsgálat, 67,2% (62-71,2) kombinált IH teszt]. A kombinált IH értékelés esetén magas szenzitivitás és elfogadható specificitás volt tapasztalható, míg a kombinált IC teszthez képest a nem kombinált SM értékelésű IC-p16^{INK4a} jobban teljesített, mint a kombinált IC-p16^{INK4a} MASM értékeléssel. Összességében a biomarkerek kombinációja javította a teszt érzékenységét, ami azt jelenti, hogy a CIN2+ esetek biológiailag vagy immunfestéssel eltérőek.

Citológia, illetve HPV triageban alkalmazott p16^{INK4a} és a CLDN1 immunfestések a nem triage esetekhez hasonlóan az SM értékeléssel általánosan magasabb szenzitivitásúak és alacsonyabb specificitásúak, mint a MASM értékeléssel. Összehasonlítási alapnak tekintettük a citológia triageban alkalmazott HPV tesztet, melynek a vizsgálatainkban a szenzitivitása 97,6% (92,3-99,6), specificitása 44,9% (36,0-48,3) értéket mutatott (9. táblázat). A triage tesztként alkalmazott biomarkerektől elvárjuk, hogy specifikusak legyenek. Ebben a tekintetben az IC-p16^{INK4a} specificitása magasabb (81-86% intervallumban az értékelési és triage algoritmustól függően), de szenzitivitása alacsonyabb (58-76%) volt, mint az IC-CLDN1. Ezek az eredmények az

IC-p16^{INK4a} triageban való alkalmazását támasztják alá. Mivel a biomarker tesztek közötti korreláció a minta szintjén csekély, az IC tesztek kombinációját megvizsgáltuk triage felállásban is. Csak a MASM értékelés szerint végeztünk számításokat (9. táblázat). A specificitások jelentősen emelkedtek gyenge szenzitivitásbeli csökkenés mellett. Elsősorban a citológia triageban alkalmazott IC-CLDN1-p16^{INK4a} kombináció adta a legmagasabb értékeket: szenzitivitás 70,5% (62,4-76,9), specificitás 72,7% (57,7-84,7), mely érték sokkal jobb, mint a citológia triageban alkalmazott HPV teszt specificitása 44,9% (36-48,3). Míg a szenzitivitásbeli csökkenés 97,6% (92,3-99,6)-ról 70,5% (62,4-76,9)-re triage esetében elfogadható veszteség lehet a méhnyakrák szűrésben.

9. táblázat: Szenzitivitás és specificitás adatok a citológia (ASCUS+) és a HPV (hrHPV) triage-ban kombinált biomarker vizsgálatokkal a gold standard hisztológia CIN2+ diagnózisra, mint klinikai cut-off-ra számolva. Az immunkémiai teszt eredményt pozitívnak tekintettük, ha bármelyik teszt kombinációja pozitív volt. A jobb összehasonlítás érdekében a táblázat ábrázolja a teljes vizsgálati populáció (PP) értékeit, illetve a citológia és a HPV teszt pozitív populáció, azaz triage populáció (TP) értékeit. Immunkémiákat MASM protokoll szerint értékeltük. A HPV és a citológia szenzitivitás és specificitás adatait is ábrázoltuk. MASM: morphological reading adjusted scoring method; NA: not applicable, nem kezelhető eset; (145).

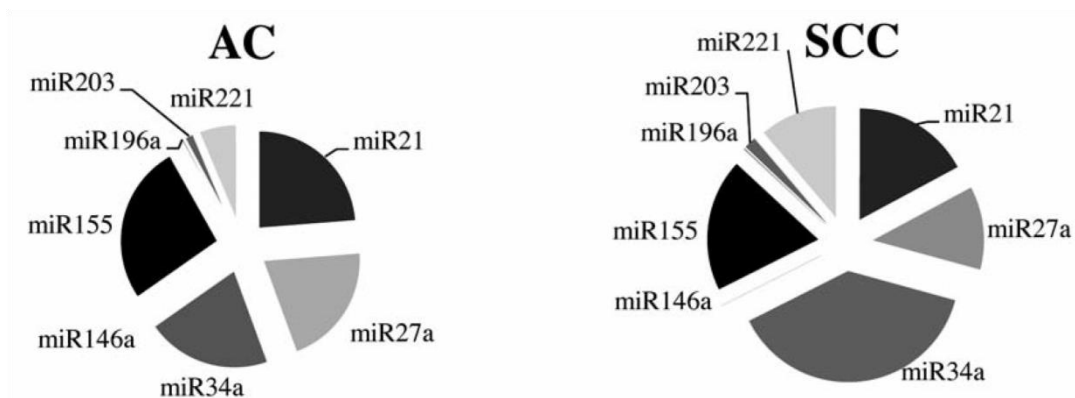
Triage módszerek	Értékelési protokollok				
		HPV TP MASM	HPV PP MASM	Citológia TP MASM	Citológia PP MASM
IC- p16 ^{INK4a} és/vagy IC-CLDN1	szenzitivitás (95% CI)	62,3 % (54,7–68,5)	58,1 % (50,1–64,1)	70,5 % (62,4–76,9)	63,9 % (55,9–69,7)
	specificitás (95% CI)	73 % (58,8–84,5)	88,5 % (81,7–93,6)	72,7 % (57,7–84,7)	88,3 % (80,9–93,7)
IH- p16 ^{INK4a} és/vagy IH-CLDN1	szenzitivitás (95% CI)	73,1 % (66,4–78,6)	66,9 % (62,6–75,2)	77,1 % (70,4–82,4)	53,9 % (47,2–58,5)
	specificitás (95% CI)	68,6 % (53,7–80,9)	90,7 % (85,1–94,8)	70,4 % (52,9–84,1)	92,7 % (87,3–96,4)
HPV	szenzitivitás (95% CI)	NA	NA	97,6 % (92,3–99,6)	75 % (68,3–80,7)
	specificitás (95% CI)	NA	NA	44,9 % (36–48,3)	79,8 % (74–84,8)
Citológia	szenzitivitás (95% CI)	81 % (75,4–86,3)	76,4 % (69,6–82,2)	NA	NA
	specificitás (95% CI)	43,8 % (32,1–54,7)	78,6 % (74–84,8)	NA	NA

4.3. A micro-RNS (miR) expressziós profilok vizsgálata az adenocarcinoma (AC) és a laphám carcinoma (SCC) mintákban (154)

A micro-RNS expressziós profil vizsgálatok a tumor diagnosztikában kutatott biomarkerek egy újabb feltörekvő ága. A méhnyakrák patológiájában betöltött szerepét Göcze és munkatársaival közösen végzett vizsgálatunkban tanulmányoztuk. A vizsgálatunkban célul tűztük ki a HPV kimutatása mellett az irodalomban publikált micro-RNS (miR) expressziós profilok vizsgálatát Göcze és mtsai által kiválogatott adenocarcinoma (AC) és a laphám carcinoma (SCC) méhnyakrákos esetek archív szövettani mintáin.

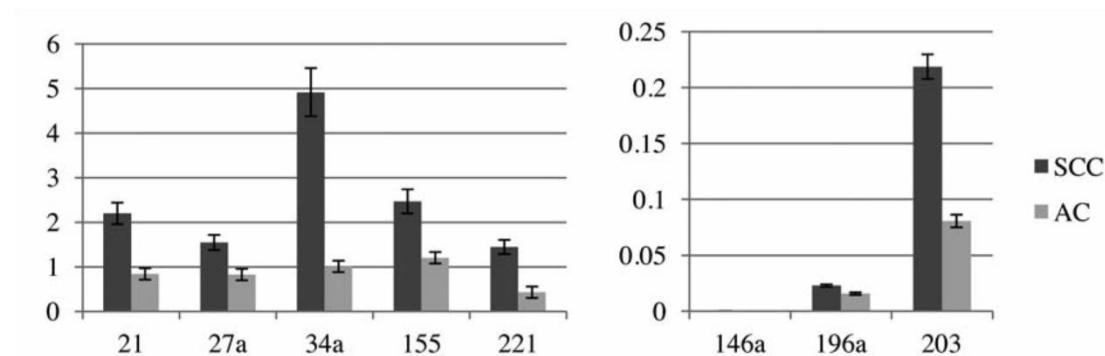
A medián életkor alacsonyabb volt AC betegeknél, mint SCC betegeknél és a magas kockázatú HPV aránya az SCC és az AC esetekben 76% illetve 68,18% értéket mutatott, ami alacsonyabb volt, mint amire számítani lehet a publikált adatok alapján (89). A HPV16 és 18 típusokat mutattuk ki a leggyakrabban, az összesített prevalenciájuk 78,95% volt az SCC és 86,67% az AC mintákban. A HPV16 sokkal gyakrabban (14:1), volt kimutatható a SCC mintákban az AC-hez képest, ahol HPV16 és 18 típusok aránya szinte egyenlő volt (7:6). A különbségek statisztikailag szignifikánsak voltak a két szövettani altípus között ($p=0,041$, Pearson χ^2 teszt)

A miRNS expresszió mintázat vizsgálataihoz 8 féle miRNS-t vizsgáltunk, a publikált miRNS profil adatokat figyelembe véve, a méhnyakrák hisztopatológiai elváltozásainak jellemzésére. A vizsgált 8 miRNS expresszió különböző eredményt mutatott a SCC és az AC esetekben (9. ábra). Mind a 8 féle miRNS expressziója magasabb volt az SCC esetekben, mint az AC-ben. Az eltérések szinte minden esetben szignifikánsak voltak (kétmintás t-teszt): miR-21, $p=0,004$; miR-27a, $p=0,018$; miR-34a, $p<0,001$; miR-155, $p=0,021$; miR-196a, $p=0,032$; miR-203, $p=0,037$; és miR-221, $p=0,017$; egyedüli kivétel a miR-146a, ahol a nem volt szignifikáns a különbség. (10. ábra).



9. ábra: A célzott miRNS expressziós profilok áttekintése cervix adenocarcinoma (AC) és laphám carcinoma (SCC) szövettani mintákon (154).

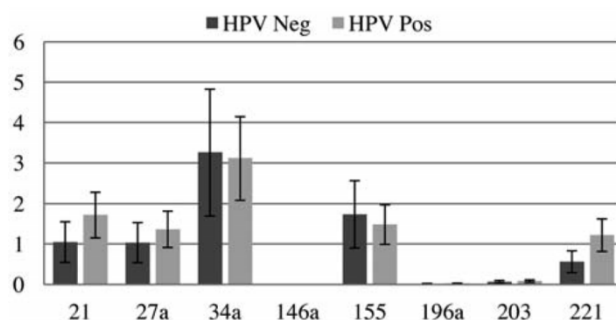
A HPV státusz és a miRNS expresszió között is vizsgáltuk az összefüggéseket. A miRNS expressziót összehasonlítottuk a HPV negatív és HPV pozitív méhnyakrákokban (AC+SCC), és azt tapasztaltuk, hogy a miR-21, miR-27a, miR-146a, miR-196a, miR-203, miR-221 expresszió magasabb, míg a miR-34a és miR-155 szint alacsonyabb volt a HPV pozitív csoportban, bár a különbség nem volt szignifikáns (11. ábra).



10. ábra: Célzott miRNS (x tengelyen) expresszió (miRNS expresszió relatív értéke, U6 snRNS normalizálás után, lásd y tengely) a cervikális laphám carcinoma (SCC) és adenocarcinoma (AC) szövettani mintákon (154).

A HPV státust tekintetében a célzott miRNS AC és SCC profilok között jelentős különbséget tapasztaltunk, mely statisztikailag szignifikáns szintet ért el a HPV pozitív AC és az SCC mintáknál a miR-21 ($p=0,004$), a miR-27a ($p=0,02$), miR34a ($p<0,001$), a miR-196a ($p=0,027$) és a miR-221 ($p=0,031$) (kétmintás t-teszt) expresszió vonatkozásában. A HPV negatív AC és az SCC mintákban, a fentiekben említett

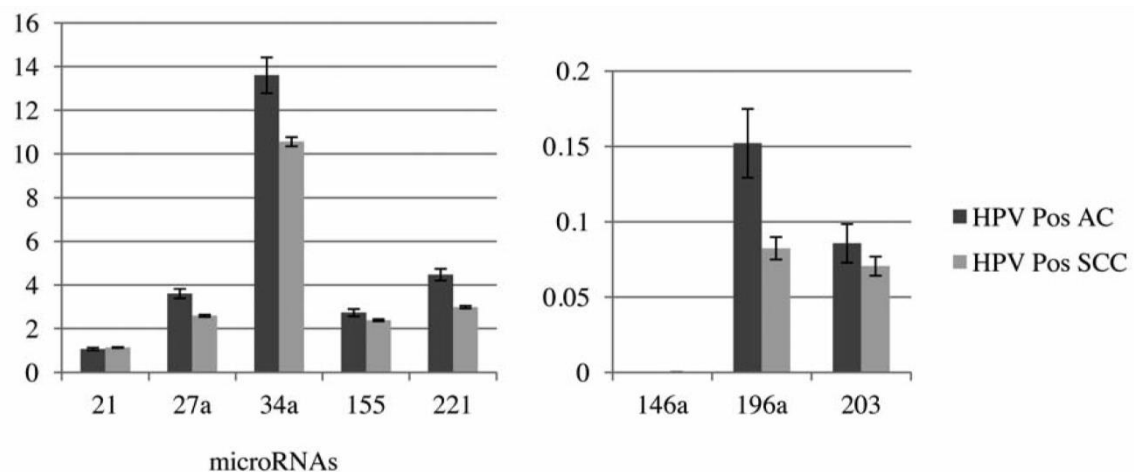
különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet (12. ábra). A kórszöveti diagnózissal párhuzamosan értékelve a HPV státuszt, a kiválasztott miRNS expressziók nagyobb változékonyságot mutattak. A HPV pozitív SCC esetében magasabb szintű volt a miR-21, miR-146a, miR-196a, miR-221 expressziója, mint a HPV negatív SCC esetekben, azonban egyik különbség sem érte el a statisztikai szignifikanciát. A miR-34a, miR-155 és miR-203, a HPV pozitív SCC esetekben alacsonyabb szintű expressziót mutatott. A különbség ismét nem volt statisztikailag szignifikáns. A HPV pozitív AC esetekben magasabb miRNS expresszió volt kimutatható, mint a HPV negatív AC esetekben. Az egyetlen kivételt a miR-146a képezte, a különbségek nem érték el a statisztikailag szignifikáns szintet.



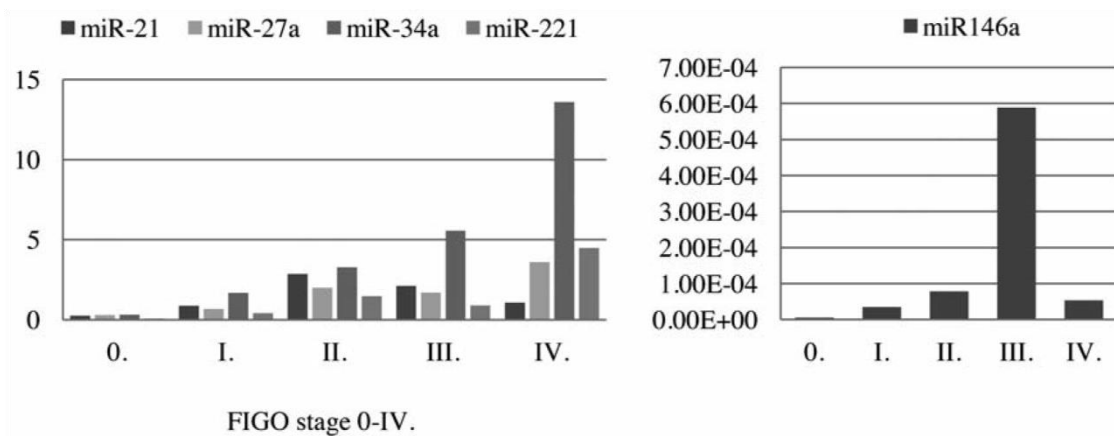
11. ábra: A célzott miRNS (x tengely) expressziós profilok (miRNS expresszió relatív értéke, U6 snRNS normalizálás után, y tengely) áttekintése a HPV pozitív és HPV negatív méhnyakrákos esetekben (154).

A miRNS expressziós profilt szerzőtársaim elemezték a rákok klinikai osztályba sorolása szerinti csoportosításban is. A klinikai állapot kiértékelésére a Szülészet és Nőgyógyászat Nemzetközi Szövetség (FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics) fokozatait alkalmazva a vizsgált betegek mintáit a méhnyakrák különböző klinikai stádiumaiba sorolták (FIGO 0: n=5, FIGO I: n=23, FIGO II: n=7, FIGO III: n=9, FIGO IV: n=2). Statisztikai kiértékelés szerint elkülönülő összefüggés mutatkozik a kórszöveti lelettől függetlenül a következő célzott miRNS expressziós szintek és a méhnyakrák FIGO stádiumai között: miR-21, $p < 0,001$; miR-27a, $p = 0,042$; miR-34a, $p = 0,016$; miR-146a, $p = 0,014$; és miR-221, $p = 0,036$ (one-way ANOVA) (13. ábra). A statisztikai elemzés következő fázisában összehasonlították a betegség különböző stádiumaiban a miRNS értékeket (kétmintás *t*-teszt). Statisztikailag szignifikáns

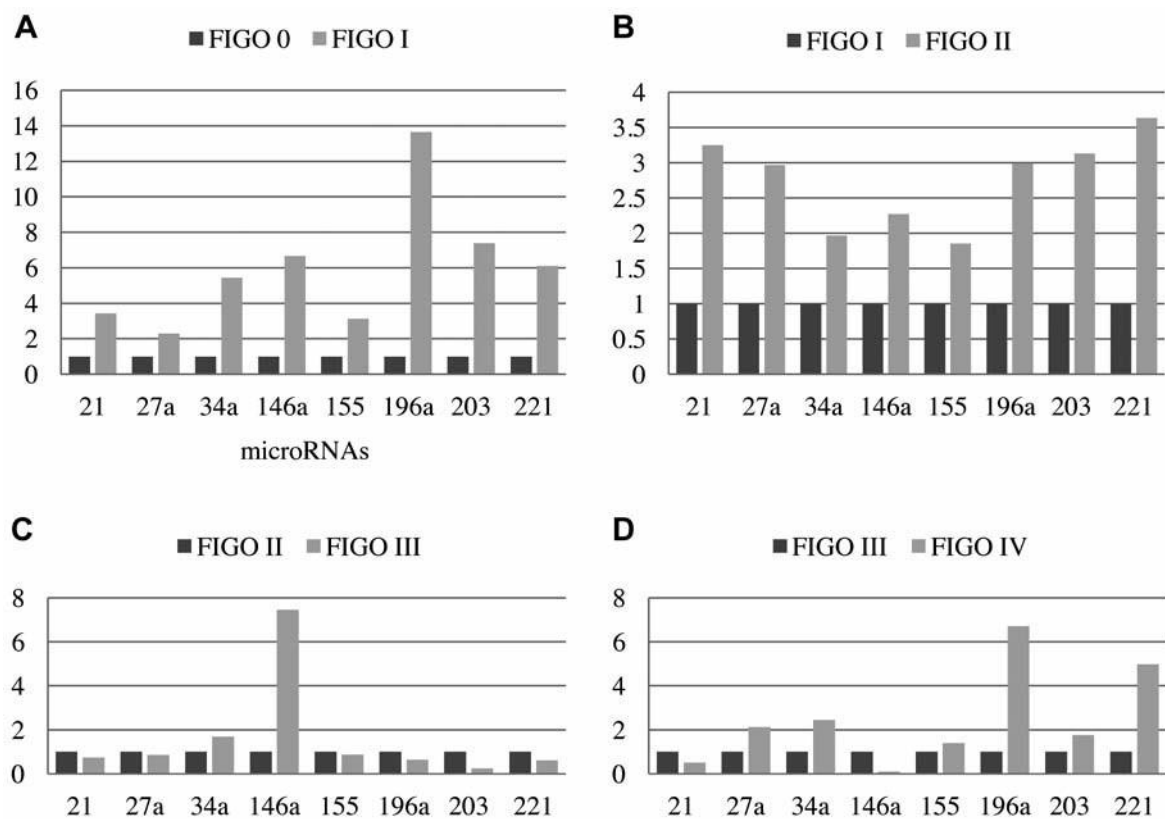
különbséget kaptak a miR-21 ($p=0,001$) és a miR-203 ($p=0,002$) esetében, FIGO 0 és a FIGO I összehasonlításakor, minden egyes miRNS magasabb szintű expressziót mutatott FIGO I esetén (14a. ábra). Ugyanez a mintázat megállapítható volt a FIGO I és II viszonylatában, ahol az expressziók következetesen magasabbak voltak FIGO II-ben. A statisztikailag szignifikáns különbséget a miR-221 ($p=0,015$) (14b. ábra) adott. Csak a miR-34a és miR-146a expressziója volt magasabb FIGO III-ban mint FIGO II-ben, azonban egyik eltérés sem volt statisztikailag szignifikáns (14c. ábra). A FIGO IV-ben a legtöbb miRNS expresszió (miR-27a, miR-34a, miR-155, miR-196a, miR-203 és miR-221) magasabb volt, mint FIGO III-ban. Az alacsonyabb miR-21 és miR-146a expressziók megkülönböztetik a FIGO IV-et FIGO III-tól. Az eltérések mértéke miR-34a ($p=0,037$) és a miR-196a ($p=0,007$) esetében elérte a szignifikancia szintet (14d. ábra). A többváltozós tesztek (two- and three way ANOVA, logisztikus regresszió) nem találtak szignifikáns kölcsönhatást a vizsgált paraméterek között.



12. ábra: A célzott miRNS (x tengely) expressziós profilok (miRNS expresszió relatív értéke, U6 snRNS normalizálás után, y tengely) áttekintése a HPV pozitív cervix adenocarcinoma (AC) és laphám carcinoma (SCC) szövettani mintákon (154).



13. ábra: A célzott miRNS expressziós profilok (miRNS expresszió relatív értéke, U6 snRNS normalizálás után, lásd y tengelyen) korrelációja a FIGO klinikai fokozatokkal (FIGO stage, x tengely) (154).



14. ábra: (A-D) FIGO klinikai fokozatok szerinti miRNS (x tengely) expresszió (miRNS expresszió relatív értéke, U6 snRNS normalizálás után, lásd y tengelyen) értékek (154).

5. Megbeszélés

A HPV fertőzés jelentős százalékban átmeneti jellegű és tünetmentesen elmúlik, azonban kis százalékban tartós maradhat, melynek talaján az évek során méhnyakrák alakulhat ki (186). A HPV fertőzések közül a jelenlegi diagnosztikai lehetőségek alapján nem szűrhetőek ki egyértelműen azok az esetek, amelyek méhnyakrák kialakulásának útjára léptek. Bizonyítottan a méhnyakrák kialakulásának feltétele és rizikó tényezője a perzisztáló HPV fertőzés (187) fokozott kockázatot hordoz a rák illetve rák megelőző állapotok kialakulására. Ezekben az esetekben más protokoll ajánlott a fertőzés követésére (188, 189) A fokozottabb rizikójú betegek követésének protokollja országonként változó és jelenleg is zajló vizsgálatok tárgya (62, 66)

Magyarországon a 2006-ban érvényes finanszírozási előírások szerint a HPV diagnosztikát meg kellett előznie két ASCUS vagy ennek megfelelő bizonytalan pozitív citológiai eredménynek. Egy részletes összefoglaló tanulmány adatai alapján felmerült az a lehetőség is, hogy az ASCUS/AGUS pozitív mintákat rögtön HPV vizsgálatra érdemes küldeni, mivel a bizonytalan citológia eredményt a HPV-DNS kimutatásával, sokkal pontosabban lehet megerősíteni a CIN-2+ (cervicalis intraepithelialis neoplasia II fokozat, vagy rosszabb) hisztológiával megerősített elváltozások detektálására, mint a citológia ismétlésével (51). Egy 7 metaanalízis összegzését adó tanulmány szerint a HPV-DNS teszt érzékenysége átlagosan 14%-kal volt nagyobb (arány:1,14; 95% CI: 1,08-1,20), mint az ismételt citológia, míg a két teszt specificitása hasonló volt (arány: 0,99; 95% CI: 0,88-1,10). Az ASCUS minták azonnali HPV tesztelésével tehát egy érzékenyebb módszerrel korábban ki lehet szűrni azokat az ASCUS és hrHPV pozitív betegeket, akiknél szorosabb utánpótlás van szükség (59), míg a HPV-DNS-negatív esetekben a beteg visszatérhet a rutinszűrési protokollba (190).

A tipizálást lehetővé tevő, nagy befogadóképességű, „high-throughput” technológiák kifejlesztése fontos lehet a perzisztáló fertőzések kimutatására, és ennek megfelelően kialakított protokoll szerinti utánpótlásban. A tipizálás áteresztőképességét nagymértékben fokozni képes a multiplex detektálás, melyre több megoldás is elérhető, azonban ezek nem terjedtek el diagnosztikai felhasználásban. A GenoID laboratóriumban alkalmazott Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt egy multiplex PCR és hibridizálás technológiájú HPV genotipizáló teszt, melynek klinikai teljesítőképességét citológia

pozitív mintákon vizsgálták Hybrid Capture 2 (HC2, Qiagen, korábban Digene) teszttel végzett összehasonlító vizsgálatban, melyben eltérő eredmények tisztázását tartalmazó számítások kiváló egyezést mutattak (96,2%)(177).

A GenoID laboratóriumban 2005/2006 években 12354 minta Full Spectrum L1F/L1R-HPV vizsgálatából 6447 HPV DNS pozitív minta genotipizálási eredményét összesítő elemzést végeztem a HPV típusok előfordulási gyakoriságának bemutatására (176). A vizsgált cervix minták nagy része már bizonyos fokú (ASCUS illetve magasabb fokú, ASCUS+) citológiai elváltozásokkal rendelkező betegektől származott, ezért a hrHPV pozitivitás aránya magasabb volt, mint 40%. Hasonló mértékű, azaz átlagosan 42,2%-os hrHPV-DNS pozitivitást mutattak ki egy tanulmányban, mely összefoglalta az ASCUS pozitív citológiájú esetekben alkalmazott hrHPV triage-ról publikált metaanalíziseket (51). A pozitív leletek ezekben az esetekben megerősítik a citológiai eredményt és segítik a klinikust a szükséges teendők meghatározásában. A hrHPV negatív eredménnyel a bizonytalan citológiai leletek kórokából kizárható a HPV jelenléte és ennek értelmében a rutin szűrési intervallumokban követhető a beteg állapota.

A HPV tipizálás egyben lehetőséget ad a beteg pontos követésére és rizikóbecslésére, illetve a HPV oltás során a már szexuális életet megkezdett nők körében az oltási típusokkal való fertőzöttség meghatározására. A 2006-ban GenoID laboratóriumban vizsgált HPV-DNS-pozitív mintákban kockázati típusok szerinti eloszlása alapján (2. ábra) a HPV fertőzések legtöbbször magas kockázatú (67%) típusok voltak, míg az alacsony kockázatúak 8,6%-ban voltak kimutathatóak. A kockázati csoportba nem sorolt rizikójú típusok 14,3 %-kal a második leggyakoribb csoportot képezték. A multivalens fertőzések lehetnek különböző kockázatú HPV típusok kombinációi, melyek közül a hr-HPV és lrHPV együttes előfordulása volt a leggyakoribb (6,7%).

A 2005/2006-ban a hrHPV tipizálási eredményeket genotípusonkénti csoportosításban összesítettük (3. ábra). Mindkét évben, a **legmagasabb százalékban a 16-os típus** mutattuk ki (15,9%, 20,5%) Ezt követően 2006-ban a leggyakoribb HPV típusok a 31, 51, 66, 56, 58, 33, 39 és a 18 voltak. A HPV típusok eloszlásában kismértékű ingadozás mutatkozott a két évet összehasonlítva, azonban a HPV 16-ot kivéve az eltérés egyik típus esetében sem volt nagyobb két százaléknál. A 16-os típus alacsonyabb előfordulási százalékát 2006-ban okozhatta a két év alatt HPV vizsgálatra küldött minták

citológiai elváltozásainak különbözősége, ugyanis, ha a 2006-os minták átlagos citológiai státusza alacsonyabb szintű volt, mint a 2005-ben érkezett, ennek megfelelően a HPV 16-os fertőzések számának statisztikai valószínűsége is alacsonyabb, mivel a HPV 16 előfordulási gyakorisága fordítottan arányos a citológiai státusszal. Ugyanis ismert, hogy míg a HPV 16 illetve 18 előfordulási gyakorisága a citológiai státusz romlásával az ASCUS-tól LSIL és HSIL-en keresztül a méhnyakrákig haladva emelkedik, addig a többi HPV típusé csökken. A nem HPV 16 és 18 típusok ASCUS-ban közel azonos gyakoriságúak, mint a HPV-16/18 valamint előfordulásuk a citológiai státusz romlásával csökkenő tendenciát mutat és a méhnyakrákos megbetegedésekben együttesen mindössze 23-35%-ban mutathatók ki, míg a HPV 16/18 típusok 65-77%-ban okoznak méhnyakrákot (191). A HPV preventív vakcinálással megelőzhető HPV 16/18 genotípusok 19,8% és 25,2%-ban voltak kimutathatók 2005/2006-ban a laboratóriumba küldött HPV-DNS-pozitív mintákból.

A tipizálási eredmény információt szolgáltat a multivalens fertőzések előfordulási gyakoriságáról is (5. ábra), mely a méhnyakrák kialakulásának további rizikófaktora lehet (186). Megállapítható, hogy nincs eltérés a két év eredményei között és a monovalens fertőzések aránya mindkettőben magas (75%); a bivalens fertőzések képezték a minták 18-20%-át és 5% körüli volt a kettőnél több típus a mintákban.

Egy másik epidemiológia tanulmányunkban HPV fertőzés magas prevalenciáját mutattuk ki a fertőzés kockázatának kitett szexmunkások cervikális, garat és anális mintáiban (178). A vizsgálatunk eredményei összhangban állnak a korábbi publikációkban foglaltakkal, amelyekben szignifikánsan magasabb a HPV fertőzés prevalenciája a női szexmunkások körében (female sex workers, FSW-ek), mint az általános népességben (192-199), a FSW-ek mintái közül legalább egy HPV DNS pozitív volt az esetek nagy többségében (82,4%), míg a rutin STD szűrésen megjelent nők kontroll csoportjának mintái kevesebb, mint a fele (46,2%) volt HPV fertőzött. A hrHPV típusok (elsősorban a HPV 16 és 18) szerepe a méhnyakrák kialakulásában ismert (200), a többes HPV fertőzés szerepe a betegség progressziójában nem teljesen tisztázott (186). Vizsgálatunk igazolni látszik az IARC tanulmányában közölt poolozott értékelést, melyben nem mutattak ki statisztikailag szignifikáns összefüggést a szexuális partnerek száma és az együttes HPV fertőzések száma között (201). A leggyakrabban kimutatott HPV típusok (gyakoriság szerint rendezve): HPV 31, 16, 66, 18, 51,58 és az 56 voltak.

A szexmunkások minden mintájában észlelt lényegesen magasabb HPV prevalencia (a teljes HPV (hrHPV+lrHPV+ NA-HPV), a hrHPV és a többszörös HPV fertőzések egyaránt) megerősíti a korábbi tanulmányok megállapítását, miszerint a promiscuális szexuális viselkedés a genitális HPV fertőzés megszerzésének domináns rizikó faktora. A promiscuális szexuális viselkedés mértékét a szexmunkás és minden férfi partnerének az élettartam alatti szexuális partner számával határozzák meg (202-205, 201, 206). A vizsgálatunkban résztvevőket arra kértük, hogy nevezzék meg a közelmúltban létesített szexuális partnereik számát napi felbontásban, mivel ez jobb előrejelzője a HPV fertőzés prevalenciájának és az incidenciájának, mint az élettartam alatti szexuális partnerek száma (196, 201, 206). Szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető a FSW-ek promiszkuítás mértéke és a teljes HPV, a hrHPV illetve a többszörös HPV fertőzés magasabb prevalenciája között. A vaginális szexpartnerek számán felül, a vaginális szex gyakoriságának mértéke (203, 204) és az anális szex gyakorlása is összefüggést mutat a HPV magas prevalenciájával (203). Ezekben a tényezőkön kívül a HPV prevalenciát növelte az újabb partnerrel létesített szexuális kapcsolatig eltelt intervallum rövideje is (206).

Nem mutattunk ki összefüggést a HPV prevalenciával a kontroll csoportba tartozó nők első közösülésének kezdeti életkora, illetve a szexiparban való szerepvállalás kezdeti életkora vagy FSW-ek szexiparban eltöltött ideje között. Ezért eredményeink megerősítik, hogy a fiatalon kezdett első közösülés nem független hatásként növeli a HPV prevalenciát (207, 201), melynek hatását befolyásolhatja a szexuális partnerek emelkedett száma (205).

A legújabb tanulmányok azt mutatják, hogy erős összefüggés mutatkozik a megnövekedett vaginális vagy orális szexpartnerek száma és az oropharyngeális rák kialakulása között (208). Azonban az orális HPV fertőzés prevalenciája elsősorban az élettartam során létesített szexuális partnerek számával mutat összefüggést (209), míg a szájüregi HPV fertőzés és az orális-pénisz érintkezés száma között nem volt egyértelműen kimutatható kapcsolat (209, 206). A magyar FSW-ek garatmintáiban kimutatható magasabb HPV prevalencia nem mutatott szignifikáns összefüggést az orális szex gyakorisággal. Eredményeink alátámasztják a promiszkuítás hatását a megnövekedett oropharyngeális HPV fertőzés gyakoriságára és megerősítik, hogy az óvszer használata orális szex során nem véd a HPV fertőzéstől. Ennek következtében az

FSWek a magas promiszkuitásuk miatt az átlagos női lakossághoz képest nagyobb kockázatnak vannak kitéve a garat HPV fertőzés és egyúttal a garatrák kialakulására.

Érdekes ellentmondást figyelhettünk meg az anális szex tekintetében, mivel magasabb HPV prevalencia volt kimutatható mind FSW-ek és a kontroll csoport végbél mintáiban az anális szexet nem gyakorolóknál, mint az anális szexet gyakorlóknál. Továbbá, az anális szexet gyakorlók között gyakrabban volt a HPV kimutatható azok mintáiban, akik konzekvens kondom használatról számoltak be anális szex közben. Ezek az eredmények megerősítik azt a megállapítást, hogy nem mutatható ki összefüggés az anális szex gyakorlása és a végbél nyálkahártya HPV fertőződése között (193).

Alacsony képzettségi szint bizonyítottan fokozott kockázatot jelent a méhnyakrákra (202). A szexmunkások többsége (76,4%) csak az általános iskolát fejezte be, míg a kontroll csoportban mindenkinek legalább középiskolai végzettsége volt. A hatékony megelőzés érdekében fontos a szexmunkások és ügyfelek fokozott szexuális kockázatát csökkentő célzott tájékoztatás megtervezése és hatékony végrehajtása, mivel a HPV fertőzés igen jelentős forrását képezik, mely lakossági szinten hozzájárul a magasabb méhnyakrák morbiditási és mortalitási rátához. Ford (195) jelentős HPV prevalencia csökkenést észlelt egy intenzív, sokrétű oktatási programot követő 18 hónapon belül (például STD kezelése, óvszer osztogatás, média kampány az ügyfeleknek).

A tanulmányunk korlátai közé tartozik a vizsgálatban résztvevő szexmunkások alacsony száma, csak 34 FSW-t sikerült bevonni a 2 éves toborzási időszak alatt, a kérdőívek saját bevalláson alapultak, ami kihathat a válaszok valódiságára, különös tekintettel az ilyen kényes kérdésekben, mint a szexuális szokások. Továbbá nem vizsgáltuk az egyéb kockázati tényezők hatásait a HPV prevalenciára, mint például a dohányzás vagy a szülések száma. Végül a kontroll nők egészségügyi központokban történő kiválasztása torzíthatta az eredményeket. A tanulmányunk fő előnye, hogy ugyanazon személy HPV fertőzöttségét több anatómiai régióban vizsgálta és a vizsgált csoporttal azonos korú kontroll csoport bevonásával elemezte a szexuális viselkedést és az óvszer használatot, valamint feltárta a résztvevők ismeretét a méhnyakrák megelőzési lehetőségekről. Jelen tanulmány eredménye, hogy Magyarországon elsőként nyújt betekintést a szexmunkások HPV prevalencia adataiba, mely megállapítások hasznosak lehetnek a közép- és kelet-európai szexmunkások nagyobb, átfogóbb elemzését célzó további vizsgálatok tervezése számára.

Egyre nagyobb a jelentősége a HPV pontos kimutatásának a méhnyakrák szűrésben. A HPV tesztet széles körben alkalmazzák a citológia alapú szűrésben triage tesztként, a bizonytalan citológia diagnózisok esetében, illetve a kezelés utáni surveillance módszereként (87-89). 2015 januártól amerikai és európai guideline-ok a HPV tesztet elsődleges szűrőtesztként is ajánlják, a citológia alternatívjaként alkalmazva (62, 66). Különböző klinikai vizsgálatok eredményei azt igazolták, hogy a HPV teszt a citológiához képest tovább javítja az elsődleges szűrés hatékonyságát (59). A HPV érzékeny marker a méhnyakrák kockázatának meghatározására és a citológiánál érzékenyebben képes a CIN 2, 3 diagnózisú betegeket kimutatni (90, 91).

Számos tesztet fejlesztettek ki a HPV nukleinsav kimutatására cervikális mintából (79). A forgalomban lévő HPV tesztek közül a szakirodalom a HC2 tesztet tekinti klinikailag validáltnak, mert a HC2 teszttel végezték az eddig legnagyobb mintaszámú és leghosszabb utánkövetéses klinikai vizsgálatokat (12 év) (83).

A legtöbb HPV kimutatására tervezett konvencionális PCR reakció degenerált és/vagy konszenzus primereken alapul, amelyek lehetővé teszik a HPV típusok széles spektrumának detektálását. A dolgozaomban tárgyalt Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt egy multiplex PCR és hibridizáció-alapú 48 HPV kimutatására tervezett rendszer, mely az L1 gén egy speciális régióját mutatja ki (177). Ebben a régióban található egy erősen változékony szekvenciájú génszakasz, melyet kétoldalt erősen konzervált szekvenciájú régiók határolnak. A HPV genom L1 régiója lehetővé tette a konszenzus primerekkel HPV-típusok széles spektrumának amplifikálását és egyúttal ugyanerre a régióra a típus-specifikus primerek és hibridizációs próbák tervezését is. Ugyanezt a régiót mutatja ki a dolgozatomban tárgyalt Genoid laboratórium új fejlesztésű real-time PCR-alapú MBRT-HPV tesztje is (179).

A real-time PCR megközelítéseknek számos előnye van a hagyományos PCR-alapú módszerekhez képest. Amellett, hogy kiküszöböli a PCR utáni kimutatási lépést, a real-time PCR egy érzékeny target amplifikációs módszer (210) A kezdetekben kifejlesztett valós idejű HPV kimutatási rendszer az úgynevezett „molecular beacon” primerekkel végzett amplifikációt real-time készülékben detektálta, mely lehetővé tette a HPV jelenlétének típus-független előszűrését a mintákban, és ezt követte a PCR termék típus specifikus detektálása line-blott módszerrel (211). A HPV targetre tervezett molecular beacon próbák rendkívül specifikusak és jól alkalmazhatóak multiplexált kimutatási

rendszerekben (212). Ezen kívül Wang és mtsai a „molecular beacon” próbákat érzékenyebbnek találták, mint a TaqMan próbákat (213, 214).

A MBRT-HPV reakció egy multiplex, egylépéses, HPV típus-specifikus „molecular beacon” próbákat alkalmazó real-time-PCR HPV detektáló rendszer, amely a 14+1 hrHPV és az 5 lrHPV típusok csoportban történő kimutatására alkalmas. A magas kockázatú és alacsony kockázatú HPV típusok különböző emissziós csatornában mutathatók ki, míg a hozzáadott belső kontroll reakció detektálása egy harmadik csatornán történik. Ez a beállítás lehetőséget teremt a HPV pontos kimutatására és emellett a reakció végrehajtásának belső minőségellenőrzésére. A real-time PCR módszerhez nem szükséges a minták post-PCR kezelése, ami csökkenti kontamináció kockázatát. A minták vizsgálati eredményei az alábbiak lehetnek: HPV DNS negatív, hrHPV DNS pozitív, hrHPV + lrHPV DNS pozitív, illetve lrHPV DNS pozitív. Míg a HPV kimutatásához és tipizálásához a Full Spectrum L1F/L1R-HPV PCR és a hibridizáció-alapú rendszerben 8 óra szükséges, a MBRT-HPV rendszer nagy előnye a gyorsasága, mely teszt már 3 óra elteltével eredményt szolgáltat.

A MBRT-HPV teszt a HPV L1 szekvencia egy gondosan kiválasztott régióját célozza, amely nagyon specifikus detektálást tesz lehetővé. A fejlesztők által végzett analitikai vizsgálatokban, illetve a Genoid laboratórium diagnosztikai mintáin végzett klinikai teljesítőképesség értékelésben a MBRT-HPV teszt specifitás vonatkozásában néhány keresztreakciót mutatott az alacsony kockázatú HPV típusokkal, melyek fontossága kisebb a méhnyaki patológiában. A rendszer korlátja, hogy keresztreakciót adott néhány alacsony kockázatú típus a magas kockázatú csatornában. Bár a primereket és próbákat gondosan választottuk ki, hogy megkülönböztessék a kimutatni kívánt HPV típusokat, mégis számos kevésbé gyakori típus keresztreakciókat adott, ami újabb, pontosabb molekuláris beacon próbák tervezését teszi még szükségessé. A HPV 82 pozitív volt a magas kockázatú csatornában, de a HPV 82 típust is a feltételezeten magas kockázatúak csoportba sorolják (200). A HPV 3 szintén keresztreakciót adott a magas kockázatú csatornában, de ezt a típust kevésbé tartják fontosnak a méhnyaki patológiában. A HPV 70 magas kockázatú jelet generált és bár alacsony kockázatú típus, azonban filogenetikailag a magas kockázatú típusok közé sorolják (200). A HPV 54 a magas kockázatú HPV csatornában volt pozitív, míg a 87 és 91 feltételezeten magas kockázatú és alacsony kockázatú keresztreakciókat adott.

A MBRT-HPV teszt klinikai vizsgálatában 161 random klinikai mintát vizsgáltunk és az eredményeket összehasonítottuk a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel kapott eredményekkel, ahol az egyezés 89,44%-os volt. Az összehasonlító vizsgálat alapján a MBRT-HPV teszt becsült CIN2+ szenzitivitása 95,45% (63/66) a becsült specificitása 91,57% (87/95) volt és a two-tailed Fischer exact probability teszt $p = 4,65 \times 10^{-27}$, szignifikáns eredményt adott.

Ami a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV rendszer közötti eltéréseket illeti, a különböző eredményeket magyarázhatja a felhasznált minta térfogatok különbsége, míg a Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszer 10 μ l mintát, addig a MBRT-HPV teszt csak 7 μ l mintát, tehát 30%-kal kevesebbet használ a PCR reakcióban. A 10 eltérő eredményt adó minta közül 6 esetben nagyon alacsony hibridizációs jelet kapunk a Full Spectrum L1F/L1R-HPV rendszerben. Elképzelhető, hogy a MBRT-HPV rendszerrel a csökkentett minta mennyiség miatt téves eredményt kaptunk a detektálható HPV DNS-szint alatti kópiájú mintákban.

Az MBRT-HPV rendszer számos olyan tulajdonsággal bír, amely hatékony eszközként való alkalmazását sugallja a HPV diagnosztika területén. Ez az új módszer alkalmas eszköze lehet a méhnyakrákszűrő programoknak és megvan az az előnye, hogy gyors, időtakarékos egylépéses megközelítést tesz lehetővé.

A Coombe Women and Infants University, Dublin kolposzkópia klinikán megjelent nők cervix LBC citológia mintáin Keegan és mksai együttműködésben vizsgáltuk HPV kimutatására szolgáló három módszer klinikai teljesítőképességét: HC2 (Qiagen), Full Spectrum L1F/L1R-HPV (Genoid) és a MBRT-HPV-ABI (Genoid), mely a teszt ABI7900 platformra adaptált verziója (180). A nők HPV fertőzéseinek genotípusait LA-HPV teszttel azonosították az ír laboratóriumban. Ez az első tanulmány, amely vizsgálja a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HP-ABI tesztek HPV kimutatás teljesítményét a kolposzkópiára utalt betegeknél, illetve ez az első vizsgálat a HPV genotípusok előfordulásáról az ír kolposzkópos populációban.

Ahogy ez várható volt ebben a betegcsoportban, ahol a nők tartósan abnormális méhnyak citológia kenet eredményt mutatnak, magas volt az egyes tesztekkel mért HPV prevalencia: 83,3% HC2, 91,9% Full Spectrum L1F/L1R-HPV és 80,1% MBRT-HPV, a korrigált, csak hrHPV kimutatás aránya 61,4% Full Spectrum L1F/L1R-HPV és 78,7% a MBRT-HPV-ABI.

Más tanulmányokban az alkalmazott hrHPV teszt kimutatási módszerétől függetlenül szintén kiugróan magas volt a hrHPV előfordulási aránya a vegyes, kolposzkópiára utalt populációkban (215, 216), ami azt jelzi, hogy a legtöbb kereskedelembe kapható teszt kellően érzékeny a hrHPV kimutatására ebben a cohortban. A HC2 teszt és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV hasonló HPV kimutatási arányt mutatott minden citológia fokozatban, míg a MBRT-HPV-ABI sokkal alacsonyabb arányban volt pozitív, ami valószínűleg a teszt HPV16 típusra vonatkozó alacsonyabb analitikai érzékenységének volt köszönhető, mivel a HPV 16 volt a leggyakrabban kimutatott HPV genotípus a mintákban.

A HPV vizsgálatok teljesítményét triage beállításban korosztály specifikusan javasolja értékelni Cuschieri és szerzőtársai (215). A HPV fertőzések ismert epidemiológiáját tükröző módon a LGCIN cervikális elváltozások a fiatalabb korosztályhoz társultak (<30 év), míg HGCIN-ek a 30 évnél idősebb nőknél voltak gyakoribbak. A jelen vizsgálatban a hrHPV DNS prevalenciája mindegyik vizsgált HPV teszttel a 30 év alatti nők körében volt a legmagasabb, rámutatva arra, hogy második, úgynevezett triage tesztre lehet szükség a HPV DNS teszt mellett a fiatalabb nők esetében a további kockázati besorolás érdekében.

A különböző tesztelő laborokban és különböző populációkon végzett vizsgálatokkal kapott eredmények, mint például Coombe Women and Infants University, Dublin kolposzkópia klinikával együttműködésben végezett tanulmányunk (180), a két Genoid laboratórium által fejlesztett HPV teszt teljesítményének még pontosabb értékelését tették lehetővé. Jeney és szerzőtársai publikációjában (177) a szerzők összehasonlították a Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztet a HC2 kimutatással 81 nő ASCUS/LSIL eredményű citológiai mintáin, ahol a hrHPV eredmények konkordancia aránya 83,9% volt. Ez összhangban áll a Coombe klinikán ugyanazon citológiai kategóriákban kimutatott 93,7% konkordancia értékkel. A MBRT-HPV teszt teljesítményéről megjelent első publikációban a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel végzett összehasonlító vizsgálatban a hrHPV konkordancia 89,44% értéket mutatott (179), mely hasonló a Coombe klinikán kapott eredményhez (83,8%). Meijer és mksai (217) azt javasolta, hogy az új HPV szűrővizsgálatokat a HC2 teszthez képest ajánlott értékelni. Ha összehasonlítjuk a HC2 teszttel a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV-ABI tesztek hrHPV típusokra vonatkozó eredményeit, a Full Spectrum L1F/L1R-

HPV nagyobb konkordanciát mutatott (94,6% (k=0,792)), mint a MBRT-HPV-ABI (87,4% (k=0,532)) és nem volt statisztikai különbség a HC2 vizsgálat és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV között a hrHPV kimutatásában.

Coombe klinika mintáin a HC2 tesz volt a legérzékenyebb a hrHPV kimutatására a CIN2+ betegség klinikai végpontra nézve (98,3%), ezt szorosan követte a Full Spectrum L1F/L1R-HPV (97,4%), majd a MBRT-HPV-ABI (93,9%). A tesztek specificitását nem volt lehetséges meghatározni, mert nem volt elég negatív szövettani eredményű nőbeteg a vizsgált csoportban és ezért nem volt elég valódi negatív eset a statisztikai számításokhoz.

A MBRT-HPV-ABI teszt statisztikailag szignifikánsan magasabb PPV (97,3%) értéket adott, mint a többi vizsgált HPV teszt (HC2 (94,1%); Full Spectrum L1F/L1R-HPV (94,1%)). A PPV kritikus paramétere a vizsgálat teljesítményének, mivel annak a valószínűségét tükrözi, hogy a pozitív teszt mennyire jól jósolja meg a magas fokú cervikális betegség jelenlétét. Ez azonban nagymértékben függ a betegség aktuálisan a vizsgálatban mért előfordulási arányától, és a vizsgált kolposzkópiára utalt betegek populációja magas HPV prevalenciával rendelkezik, ezért a diagnosztikai tesztek teljesítményének értékelésekor ennek torzító hatását figyelembe kell venni. Más vizsgálatok azt is kimutatták, hogy HC2 magas érzékenységet mutat a magas fokú CIN detektálására. Egy nemrégiben készült tanulmány összehasonlította számos különböző HPV kimutatási technológia CIN3+ esetek kimutatási a teljesítményét azon nőknél, akiknek egy vagy több borderline vagy enyhén kóros kenetük volt. A vizsgálat azt mutatta, hogy az HC2, Abbott RealTime, BD HPV és Cobas 4800 érzékenysége 100%-os volt és a HC2 érzékenysége a CIN2+ kimutatására vonatkozóan 96%-ot mutatott (218). Egy európai retrospektív tanulmányban Denton és mtsai eredményei szerint (127) a HC2 érzékenysége 90,1% volt a biopsziával igazolt a CIN2+ azonosítására azoknál a nőknél, akiknek ASCUS, illetve 95,7% azok körében akiknek LSIL citológiai elváltozásuk volt. Egy korábbi tanulmányban Dublin egyik szülőotthonában a kolposzkópos populáción mért HC2 érzékenység 90,5% volt a CIN2+ detektálására, ami valamivel alacsonyabb, mint az ebben a tanulmányban publikáltak, azonban abban a tanulmányban a nőknek kizárólag tartósan alacsony fokú citológiai elváltozásuk volt, a vizsgálatba nem voltak magas fokozatú citológiájú nők beválogatva (219).

A Coombe klinika mintáin a három HPV teszt hrHPV prevalenciáit a citológiai kategóriákon belül vizsgálva megállapítható, hogy a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 mindenütt hasonlóan jó eredményt mutatott, míg a MBRT-HPV-ABI HPV kimutatási rátája alacsonyabb mindegyik citológiai kategóriában. A HC2 és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt hasonlóan magas HPV pozitivitást mutatott a NILM citológia mintákban (26,1%-30,4%), ezt követte az ASCUS illetve LSIL (83,7%-86,7%) majd a HSIL (97,3-100%), ami hasonló értékeket mutat, mint egy korábbi tanulmányban publikált adatok (220).

Az ír laboratóriumban a LA-HPV tesztet alkalmazták a HPV genotípusok eloszlásának meghatározására. A tipizálás segítségével megvizsgáltuk, hogy a HPV genotípus befolyásolta-e az egyes HPV kimutatási eljárások klinikai teljesítményét. A MBRT-HPV-ABI teszt esetében találtunk alacsonyabb pozitívítási rátát a HPV16 genotípus esetében. A MBRT-HPV-ABI teszt alacsonyabb analitikai érzékenységgel mutatja ki a HPV16 genotípust, mint az egyéb vizsgálatok, amelyet a HC2 vagy Full Spectrum L1F/L1R-HPV vizsgálatokkal szemben kimutatott alacsonyabb klinikai érzékenysége is bizonyít. A HPV16 volt a leggyakoribb genotípus minden citológia elváltozásban, ami után a HPV 18 a 8. leggyakoribb HPV genotípus volt a mintákban és a 6. leggyakoribb HPV genotípus (6,1%) volt a CIN2+ hisztológiailag konfirmált minták csoportjában. A HPV 18 prevalenciája az ír laboratóriumban alacsonyabb volt a Castle és szerzőtársai által publikált ASCUS LSIL Triage eredményeihez képest (221), ahol a beválogatás során a hisztológiával konfirmált CIN3+ 608 kenet genotipizált mintából átlagosan 13,2% volt a HPV18 pozitív a LA-HPV teszttel és a HPV18 az 5. leggyakoribb HPV genotípus volt a CIN3+ kohortban. Egy másik írországi publikációban a 2001 és 2008 közötti, formalin fixált archív nagyfokú cervicalis intraepithelialis neoplasia szövettani mintákon végzett genotipizálás csak 6%-ban volt HPV 18 pozitív (222). Világszerte a HPV16 és HPV18 ~71%-ban kimutatható a méhnyakrákokban, azonban ismert, hogy a HPV18 gyakorisága földrajzilag nagyon eltérő, míg Európában és Észak-Amerikában az összes méhnyakrákos eset 7% -a, addig Óceániában 20% és Afrikában 23 % (223). Egy korábbi vizsgálatban azt vetették fel, hogy a rákot megelőző elváltozásokban a HPV18 vagy HPV45 jelenléte alulreprezentált lehet, mivel HPV18 vagy 45 típusokat tartalmazó rákoknak csak 57%-át sikerült kolposzkópiával diagnosztizálni, összehasonlítva ez az érték 84% volt a HPV16 típusal kapcsolatos

rákbetegségek esetében (224). Lehetséges, hogy a citológiai mintavétel nem elég hatékony a mirigyes léziókat tartalmazó HPV18 kimutatására, vagy a HPV18 vírus aktivitásának következtében a HPV 18 pozitív sejtek alulreprezentáltak lehetnek a citológiai kenetben. (222).

Összességében az írt tanulmány ismerteti a HC2 és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt hasonló teljesítményét kolposzkópiára utalt betegek körében. A MBRT-HPV-ABI teszt valamivel kevésbé volt érzékeny, mint akár a HC2 vagy a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt, azonban magasabb pozitív prediktív értéke van és mivel ez egy valós idejű PCR-alapú technológia, könnyen automatizálható. Mivel a Full Spectrum L1F/L1R-HPV PCR-terméket könnyen lehet genotípezálásra alkalmazni, a Full Spectrum L1F/L1R-HPV egy hasznos alternatívája lehet a HC2 tesztnek olyan populációk esetében, ahol HPV genotípus meghatározása szükséges, vagy, ahol a leggyakoribb genotípusok előfordulásának ellenőrzése szükséges.

Különböző klinikai vizsgálatok eredményei azt igazolták, hogy a HPV teszt a citológiához képest tovább javítja az elsődleges szűrés hatékonyságát (59). A HPV egy érzékeny marker a méhnyakrák kockázatának meghatározására és a citológiánál érzékenyebben képes a CIN 2, 3 diagnózisú betegeket kimutatni (90, 91). Azonban a HPV teszt kevésbé specifikus, mint a citológia, mert a fertőzések túlnyomó többsége átmeneti és elmúlik. (225, 226). Ennek bizonyítéka az írt kolposzkópos populációban a NILM citológia kategóriában tapasztalt magas HPV pozitivitási ráta (26,1%-30,4%).

2012 márciusában az US Preventive Services Task Force (USPSTF) és több szakmai szervezet (ACS, ASCCP, ASCP) közösen új irányelveket dolgozott ki a HPV, a citológia és a HPV 16/18 tipizálás alkalmazására a szűrésben és diagnosztikában (227, 228). Abban az időben még nem voltak elég meggyőző adatok az elsődleges HPV szűrésre önmagában, azonban az azóta eltelt idő alatt sikerült erős szakmai érvekkel alátámasztani az elsődleges HPV szűrés hatékonyságát. A legújabb európai és amerikai publikált vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a HPV teszt legalább olyan hatékony 3 évente alkalmazva, mint a citológia, ami a jelenleg is elfogadott szűrőmódszer a világban, így a citológia szűrés alternatívájaként bekerült az ajánlott szűrési protokollokba (62, 66). A jelenleg javasolt amerikai protokoll a HPV 16/18 típusok meghatározása és az egyéb magas kockázatú HPV csoport pozitivitása esetén citológia triage teszt végzése (62). A citológia kellően specifikus tesztként megfelel reflex

tesztnek, azonban nem elég szenzitív, így nem talál meg minden beteget. A citológia triage kombinációja a HPV 16/18 tipizálással növeli a HPV szűrés specificitását és egyúttal javítja a citológia szenzitivitását. Fontos megjegyezni, hogy számos vizsgálat jelenleg is zajlik, melyben a HPV pozitív nők különböző triage stratégiáit értékelik.

A legújabb kutatások tárgya az újabb generációs, a HPV illetve a citológia szűrésben alkalmazható, nagy specificitású kiegészítő tesztek kifejlesztése, melyek a méhnyakrák kialakulásában szerepet játszó, biológiai elkötelező lépések kimutatásán alapuló, úgynevezett biomarker tesztek csoportját képezik (92, 79). A nagy specificitású biomarker tesztek alkalmazásával lehetséges lehet az utánkövetéses vizsgálatok visszahívási idejének növelése vagy akár a negatív biomarker teszt eredmény esetén a normál szűrési rendbe való visszatérése (92).

A publikációkban számos biomarkert javasolnak méhnyakrák szűrésre (92, 79, 68, 93). Ezek között néhány kereskedelmi forgalomban is elérhető immunkémiai diagnosztikai platform, azonban több klinikai adatra van szükség, a tesztek klinikai használhatóságának becslésére, különösen, ami a jól kontrollált keresztmetszeti és longitudinális vizsgálatokat illeti, ahol a biomarker tesztet a patológiával egyidejűleg vizsgálják. Általában hiányzik a publikált irodalomban a vizsgált tesztek egymás melletti összehasonlítása.

Egy metaanalízis (126) megállapította a p16^{INK4a} használati értékét a méhnyak citológiai és szövettani mintákon. Bebizonyosodott, hogy a p16^{INK4a} fehérjét overexpresszáló cervikális kenetek aránya növekszik a citológiai rendellenesség és szövettani fokozat súlyosságával, és a pozitív festődés jellege a lézió súlyosságától függően változik. A vizsgálat szerint az immunhisztokémiai (IH)-p16^{INK4a} festés a cervikális biopszia mintákon mérsékelt diagnosztikai hozzáadott értéket mutatott a CIN2+ és anélküli diagnózisok megkülönböztetésére (érzékenység 86,7%, specificitás 82,8%) (116). Egy multicentrikus vizsgálatban (229 301) összehasonlították a szövettanilag kimutatható CIN2/3 esetekre a immuncitokémiai (IC)-p16^{INK4a} és a HPV teszt érzékenységét és specificitását az ASCUS és LSIL triageban. Az IC-p16^{INK4a} érzékenysége hasonló volt a HPV teszthez mindkét triage protokollban (ASCUS: 92,6% vs. 90,1%; LSIL: 92,0% vs. 95,7%). A p16^{INK4a} azonban, szignifikánsan jobb specificitást mutatott, mint a HPV önmagában az ASCUS Pap citológia (63,2% vs. 37,8% és az LSIL (37,1% vs. 18,5%) esetében (229 301). A szerzők megállapították azonban, hogy több

átfogó tanulmány szükséges a p16^{INK4a} vizsgálat méhnyakrák szűrésben való teljesítményének bizonyítására. Ezen kívül nagy változékonyságot mutat a szakirodalom p16^{INK4a} immunocitokémiai és immunhisztokémiai pozitivitás értékelő algoritmusát illetően (127-142).

Minden újonnan kifejlesztett méhnyakrák biomarker teljesítőképességét ajánlott összehasonlítani a meglévő módszerekkel, különösen a p16^{INK4a} immunkémiával. Tovább bonyolítja a képet, hogy a p16^{INK4a} teljesítőképességét számos tanulmány elemzi és változó következtetésekkel tárgyalja (127-142); továbbá nincs egyértelmű konszenzus, hogy mi lenne a legmegfelelőbb módszer az immunkémiai eredmények értékelésére. Tanulmányunkban a gold standard szövettanhoz képest vizsgáltuk a p16^{INK4a} és egy új biomarker, a claudin 1 (CLDN1) immunhisztokémiai/immunocitokémia tesztek teljesítőképességét eset-kontroll módon, bizonyos esetekben a morfológia figyelembe vételével.

A claudinok legújabb elemzése szerint a TJ-alapú (Tight Junction) permeabilitás-szelektív barrier rendszer részt vesz a sejtszaporodás szabályozásában (139, 141), illetve CLDN1 overexpressziót igazoltak méhnyakrák biopsziás cDNS array technológiával (230-302). Egy másik vizsgálatban a CLDN1 és claudin-7 expresszió fokozatosan emelkedett az LSIL esetektől CIS esetekig történő progresszió során, míg ezeknek a fehérjéknek az expressziója nagyon alacsony volt a normális cervikális hámban, így ezek a fehérjék a CIN diagnosztikai markereként szolgálhatnak (142-160, 143-156, 144-155).

Ami a CLDN1 immunocitokémiai festésről a tanulmányunkban figyelemreméltó, hogy a CLDN1 - p16^{INK4a} konkordancia (SM értékelés) igen magas volt (CIN2+ pozitív esetek egyezősége 84,0% (73,8-89,3); a CIN2- egyezősége 69,0% (59,6-75,8)). Ennek következtében CLDN1 egy ígéretes, új immunkémiai cervikális biomarker, mely nagyon hasonló teljesítményt mutat, mint a p16^{INK4a}, azonban általában kevésbé specifikus, mint p16^{INK4a}. A CLDN1 és p16^{INK4a} markerek alkalmazása, mint kombinációs triage teszt úgy tűnik, egy egyszerű stratégia lehet a kiegyensúlyozott érzékenység és specificitás elérésére.

Egy hatékony citológia triage megvalósítása lenne a következő nagy technológiai feladat a méhnyakrák szűrésben, mivel ennek hiányában a citológiát helyettesíteni kellene más szűrési technológiákkal, mint például a HPV teszttel, amivel elveszítenénk a kockázati besorolási információkat és ezáltal bizonytalanságot okozna a betegek

kezelésében. A tanulmányunkban vizsgált populáció különösen alkalmas volt a triage stratégiák értékeléséhez, mivel az ASCUS esetek száma magas volt (62/389). Tanulmányunkban a citológia HPV triage csak kis mértékben különbözik a HPV citológia triage-tól [érzékenység 97,6% (92,3-99,6%) vs. 81,0% (75,4-86,3%) és specificitás 44,9% (36,0-48,3) vs. 43,8% (32,1-54,7%)]. Ennél is fontosabb, hogy a citológia biomarker triage és a HPV biomarker triage nem mutatott szignifikáns különbséget egyik értékelési módszert alkalmazva sem, amely lehetővé teszi a biomarkerek használatát mindkét vizsgálat után.

Az immunfestéseket triage felállásokban vizsgáló összehasonlító tanulmányunk alátámasztja, hogy a HPV szűrés citológia triage, vagy a citológia szűrés és HPV triage stratégiák mindkét megközelítse alacsony specificitású. Ami az immunkémiai triage stratégiákat illeti, a hagyományos (SM) immunkémiai értékelés általában azt mutatja, hogy rosszabb az eset-kontroll összefüggés a CIN2- esetek citológiai és szövettani vizsgálata között, amelyet MASM értékelés javított. Ebben az esetben a citológia szűrés az IC-CLDN1-p16^{INK4a} MASM értékeléssel triage hasonló teljesítményt mutatott mint a HPV szűrés az IC-p16^{INK4a} SM triage értékeléssel, azzal az előnnyel, hogy az IC és az IH CIN2- esetek korrelációja jobb egyezést mutatott, mint az SM alapú p16^{INK4a} értékelés esetében (82,1% vs. 68%). Ez kiemeli a cervikális kenet immunkémiai morfológiai értékelés szerepét és arra hívja fel a figyelmet, hogy a citológia teljesítményét javítani lehet annak érdekében, hogy a state-of-art HPV alapú szűrés technológiákkal versenyképes maradjon, amely érdekes lehet a jövőben a szűrés protokollok számára.

Az immunkémiai biomarkerek klinikai teljesítőképességét vizsgáló tanulmányunkban az általános proliferatív markereket nem vizsgáltuk. Az újonnan alkalmazott immuncitokémiai kettős festési protokoll - amely a p16^{INK4a} és proliferációs marker Ki-67 immuncitokémia kombinációja (CINtec® Plus, Roche, Mannheim, Germany) – a pozitivitás új meghatározására épül (132, 231). A proliferatív marker bevezetése logikus lépésnek hangzik a rákkeltő folyamat természetéből eredően, azonban figyelembe véve a morfológiai eredményeinket a nem specifikus és változóan festődő beteg sejteket illetően, további vizsgálatokra van szükség. A tanulmányunkban tapasztalok szerint a p16^{INK4a} és CLDN1 festések között gyenge a korreláció, míg a diagnosztikus értékük hasonló, mely felveti a méhnyak rákmegelőző és rákos léziók génexpressziós változásainak további tanulmányozásának a szükségességét.

Vizsgálatunkban az immuncitokémiai és immunhisztokémiai értékelés morfológia pozitív sejtekre történő korlátozásával a pozitív teszt eredmények száma szignifikánsan csökkent mind a CLDN1 mind a p16^{INK4a} esetében, és csökkent a CIN2+ pozitív korreláció is. Bár azt találtuk, hogy bizonyos előnyöket nyújt a morfológia kombinációja immuncitokémiával, sem a morfológia, sem a biomarkerek egyedül vagy kombinációkban nem voltak képesek arra, hogy kiemelkedően jó teszt teljesítményt nyújtsanak. Összefoglalva, a különböző markerek kombinációja egy logikus lépés lehet a jövő méhnyaki diagnosztikája számára. A biomarkerek további kutatásai a cervikális carcinogenesis folyamatának jobb megértéséhez vezethetnek és végső soron a méhnyaki diagnosztikai tesztek jobb diagnosztikai teljesítményét eredményezhetik. Azonban az immunfestések munka és reagens igényes technológiák és az eredmények értékelése szubjektív, humán erőforrást, képzést igényel. A p16^{INK4a}/Ki-67 kettős festés értékelés reprodukálhatósági vizsgálatában 480 random kiválasztott citológia keneten 10 frissen képzett, vizsgázott értékelőt hasonlítottak össze egy tanulmányban referencia értékelő értékelésével és a két értékelés concordanciája jó és kiváló érték közötti tartományban mozgott ($\kappa=0,65-0,81$; átlagban $\kappa=0,71$) (136). Az értékelésbeli eltérések következtében az újonnan vizsgázott értékelők átlagos CIN2+ szenzitivitása kissé alacsonyabb volt, mint a referencia értékelőké (82% vs. 84%). Ugyanakkor, ha a pozitivitás kategóriákat 1 sejt, 2 sejt, 5 sejt 6-50 sejtnél állapították meg a referencia értékelők az alacsonyabb cut-off esetében az újonnan vizsgázott értékelők teljesítménye határozottan csökkent és 1 pozitív sejt esetén (ez jelenleg a CINtec teszt cut-off) csak 52%-ban nevezték az eseteket pozitívnak (136).

Az objektív méhnyaki diagnosztika alapjául számos új lehetőséget nyújthatnak a jelenleg fejlesztés és validálás alatt álló új, citológia kenet készítését nem igénylő, molekuláris módszerű biomarkerek, melyek a progresszió hátterében álló molekuláris elkötelező lépések objektív azonosítására szolgálnak. Jelenleg számos kutatás és klinikai vizsgálat tárgyát képezik a molekuláris biomarkerek, melyek a szűrés specificitásának növelését szolgálják azáltal, hogy képesek megkülönböztetni a produktív és a transzformáló HPV fertőzéseket, illetve megjósolni a betegség súlyosságát. A HPV pozitív esetek triage tesztjeként potenciálisan alkalmazható virális és humán celluláris molekuláris markerek ismertek. (232, 68, 93). Az egyik potenciális lehetőség a micro-RNS (miRNS) expressziós profil változásokat vizsgáló megközelítés (153). Ugyan az

eddig publikált adatok minősége változó, de összességében megállapítható, hogy a cervikális carcinogenesis során jelentős változások mutatkoznak a miRNS expressziós profilban és egyes miRNS-ek onkogénként, míg mások tumor szupresszorként hatnak. A miRNS expresszió up- és downregulációja a cervikális patológiás folyamatokban jellegzetes mintázatot mutathat, melynek pontos feltérképezése alkalmassá teheti biomarkerként való alkalmazásukat.

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a miRNS profilok segítségével meg lehet különböztetni a méhnyakrák két leggyakoribb szövettani típusát (AC, SCC) (154) és bár a méhnyakrák diagnózis alapját jelenleg klinikai és patológiai vizsgálatok képezik, eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a miRNS expressziós profilok a daganatok típusai között különbséget tegyenek. Kevés publikált adat áll rendelkezésünkre arról, hogy miként változik a kórszövettani diagnózisok függvényében a miRNS-profil. A miR profil változások hátterében a hrHPV E6 és E7 génjei által kódolt fehérjék okozzák a p53 és Rb fehérjék lebomlását és/vagy inaktiválását (233). Az E5-E7 onkogén fehérjék által közvetlenül vagy közvetve szabályozott HPV asszociált miRNS-ek (miR-34a, miR-146a, miR-203) (234, 235) fontos szerepet játszanak a méhnyakrák kialakulásában és progressziójában. Elemzésünk szerint a két vizsgált szövettani típus között lényeges eltérést mutattak a miRNS vizsgálatok: miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-155, miR-196a, miR-203, miR-221. Vizsgálatunk szignifikáns különbséget igazolt a HPV pozitív két szövettani típus között a miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-196a és miR-221 expressziójában. A miR-21 gén a 17q23.2 kromozómán található, amely a FRA17B (common fragile) szakaszon belül helyezkedik el. Ez a régió több szolid tumorban megsokszorozódik (236), amely összhangban áll a vizsgált rákokban általunk detektált emelkedett miR-21 expresszióval. A HPV16 egyik integrációs locusát 17q23.2 kromozómán mutatták ki (237, 34, 238), ami arra utal, hogy a celluláris miRNS gének expressziója a HPV integrációs helyén vagy annak közelében hozzájárulhat a tumor fenotípusához. Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a miR-21 expresszió emelkedett a HPV fertőzött betegekben, ez arra utal, hogy a HPV fertőzés indukálta karcinogenezis valószínűleg néhány oncomiR expresszióját megváltoztatja, mint például a miR-21-ét. Azt találtuk, hogy a miR-21 bőségesen kifejeződik a HPV pozitív mintákban általánosan és mindkét szöveti típusban külön-külön egyaránt. A miR-21 expressziója a rák klinikai fokozataival (FIGO 0-III) együtt növekszik. Yao és Lin kimutatták (239), hogy a miR-21

többfunkciós szerepet játszik a méhnyaki laphámrákok kifejlődésében, így igazolták, hogy a miR-21 jelentősen fokozza a sejtosztódást, gátolja az apoptózist és elősegíti a sejtek migrációját a HPV 16 pozitív méhnyaki laphámrákos sejtvonalakban. Ugyanebben a vizsgálatban azt is bebizonyították, hogy a miR-21 túltermelése a betegség előrehaladásával és nyirokcsomó-áttétekkel társult. Schmitz és mtsai a HPV integrációs helyeket vizsgálták (240) és arra a következtetésre jutottak, hogy az integráció nem egy teljesen véletlen esemény, hanem magában foglal preferált kromoszóma helyeket, például a miRNS közeli helyeket. Az integrációs helyek szomszédságában elhelyezkedő 75féle miRNS-ek közül sokukat összefüggésbe hozták már rákokkal és ezek közül a miR-34a, miR-21 és miR-27a fejeződnek ki a méhnyakrákos sejtekben.

Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a HPV E7-protein downregulálja a miR-203 expressziót a differenciálódás során, amely a mitogén-aktivált protein (MAP) kináz/protein kináz C (PKC) reakcióúton keresztül történhet (241). A miR-203 egyik célpontja a transzkripciós faktorok p63 családja és a HPV pozitív sejtek szignifikánsan magasabb szintet tartanak fenn ezekből a tényezőkből differenciálódásuk során, mint a normális keratinociták. Melar-New és Laimins arra a következtetésre jutottak, hogy a magas szintű miR-203 expresszió gátolja a HPV amplifikációt és a HPV fehérjék - annak érdekében, hogy elősegítsék a vírus produktív replikációját a differenciálódó sejtekben - gátolják a miR-203 expresszió. Ezen kívül McCluggage már korábban kijelentette, hogy a p63 a méhnyak laphám daganatok biomarkere (242), ami szintén alátámasztja a miR-203 jelentőségét. A miR-146a expressziója is méhnyakrák-specifikus, de bebizonyosodott, hogy független a rák szövettípusától vagy a HPV fertőzéstől. Ez utóbbit, Wang és mtsai szintén igazolták (243).

6. Következtetések

Célkitűzés 1: A HPV fertőzések epidemiológiai kérdéseinek tanulmányozása a HPV tipizálási eredmények tükrében, rutin diagnosztikai mintákon (2005/2006) (176), illetve a női szexmunkások magas rizikójú csoportjában gyűjtött cervikális garat és anális mintákon (178).

A méhnyakrák kialakulásának feltétele és rizikó tényezője a perzisztáló HPV fertőzés (188, 189, 187). A fokozottabb rizikójú betegek követésében a HPV genotípus specifikus adatok klinikai jelentősége jelenleg is zajló vizsgálatok tárgya (62, 66). A GenoID laboratóriumban 2005/2006 években alkalmazott Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt 6447 HPV genotipizálás vizsgálaton alapuló elemzésben a HPV genotípusok előfordulási gyakoriságáról számoltunk be, és a multivalens fertőzések gyakoriságát is meghatároztuk. A HPV tipizálás egyben lehetőséget ad a beteg pontos követésére és rizikóbecslésére, illetve a HPV oltás során a már szexuális életet megkezdett nők körében az oltási típusokkal való fertőzöttség meghatározására (188, 189, 66). A GenoID laboratóriumban vizsgált mintákban 2006-ban HPV-DNS-pozitív minták kockázati típusok szerinti eloszlása szerint a HPV fertőzések legtöbbször magas kockázatú (67%) típusok voltak, míg az alacsony kockázatúak 8,6%-ban voltak kimutathatóak. A nem klasszifikált rizikójú (HPV-NA) típusok 14,3 %-kal a második leggyakoribb csoportot képezték a pozitív mintákban. Hazánkban 2006-ban a klinikai gyakorlatban az ASCUS+ citológiai elváltozásokkal rendelkező betegektől származott mintákból kértek leggyakrabban HPV tipizálást, ezért a hrHPV pozitivitás aránya a 40%-ot meghaladta, mely hasonló mértékű az ASCUS pozitív citológiájú esetekben alkalmazott hrHPV triageról publikált metaanalízis adatokkal {Arbyn, 2006 #294}. A tipizálási eredményeket genotípusonkénti csoportosításban összesítve mindkét évben a legmagasabb százalékban a HPV16 fordult elő a legnagyobb százalékban a HPV-DNS-pozitív mintákban. Ezt követően 2006-ban a leggyakoribb HPV típusok a 31, 51, 66, 56, 58, 33, 39 és a 18 voltak. A HPV preventív vakcinálással megelőzhető HPV 16/18 genotípusok 25,2%-ban fordultak elő a HPV-DNS-pozitív mintákban. A tipizálási eredmény ezen kívül információt szolgáltat a multivalens fertőzések előfordulási gyakoriságáról. Megállapítottuk, hogy nincs eltérés a két év eredményei között, a monovalens fertőzések

aránya mindkettőben magas (75%); a bivalens fertőzések képezik a minták 18-20%-át és 5% körüli volt a kettőnél több típus a mintákban.

A HPV fertőzés magas prevalenciáját mutattuk ki a női szexmunkások cervikális, garat és anális mintáiban és kontroll csoport mintákhoz képest (178). A női szexmunkások mintái közül legalább egy testrégióban HPV DNS pozitív volt az esetek többségében (82,4%), míg a rutin STD szűrésen megjelent nők kontroll csoportjának mintái kevesebb, mint a fele (46,2%) volt HPV fertőzött. A szexmunkások minden mintájában észlelt lényegesen magasabb HPV prevalencia (mind a hrHPV és a többszörös HPV fertőzések esetében) megerősíti a korábbi tanulmányok megállapítását, miszerint a promiscuális szexuális viselkedés a genitális HPV fertőzés megszerzésének domináns rizikó faktora. A magyar FSW-ek garatmintáiban kimutatható magasabb HPV prevalencia nem mutatott szignifikáns összefüggést az orális szex gyakorisággal. Eredményeink alátámasztják a promiszkuitás hatását a megnövekedett oropharyngeális HPV fertőzés gyakoriságára és megerősítik, hogy az óvszer használata orális szex során nem véd a HPV fertőzéstől. Ennek következtében az FSWek a magas promiszkuitásuk miatt az átlagos női lakossághoz képest nagyobb kockázatnak vannak kitéve a garat HPV fertőzés és egyúttal a garatrák kialakulására. Érdekes ellentmondást figyelhettünk meg az anális szex tekintetében, mivel magasabb HPV prevalencia volt kimutatható mind FSW-ek és a kontroll csoport végbél mintáiban az anális szexet nem gyakorolóknál, mint az anális szexet gyakorlóknál. Eredményeink megerősítik azt a megállapítást, hogy nem mutatható ki összefüggés az anális szex gyakorlása és a végbél nyálkahártya HPV fertőződése között. Jelen tanulmány eredményei Magyarországon elsőként nyújtanak betekintést a szexmunkások HPV prevalencia adataiba, mely megállapítások hasznosak lehetnek a közép- és kelet-európai szexmunkások nagyobb, átfogóbb elemzését célzó további vizsgálatok tervezése számára.

Célkitűzés 2: Újonnan kifejlesztett real-time PCR alapú HPV teszt klinikai teljesítőképességének meghatározása klinikailag validált HPV tesztel végzett összehasonlító vizsgálattal (180, 179)

A Genoid laboratórium által újonnan kifejlesztett MBRT-HPV reakció egy multiplex, egylépéses, HPV típus-specifikus molecular beacon próbákat alkalmazó real-time-PCR HPV detektáló rendszer, amely a 14+1 magas kockázatú (hr) és az 5 alacsony

kockázatú (lr) HPV típusok csoportban történő kimutatására alkalmas. Az európai ajánlások szerint az új HPV tesztek klinikai teljesítőképességét a HC2 teszthez, vagy klinikailag validált teszthez képest ajánlott értékelni. Vizsgálatunkban az újonnan fejlesztetett MBRT-HPV tesztet a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel hasonítottuk össze, melyről ismert volt, hogy HC2 teszttel hasonló teljesítményt mutat, amit dolgozatomban tárgyalt írástudományban is igazoltunk. A MBRT-HPV teszt ABI7900 platformra továbbfejlesztett változatát (MBRT-HPV-ABI) és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztet a HC2 teszttel hasonlítottuk össze egy írástudatólaboratóriummal együttműködésben. A HC2 teszttel összehasonlítva a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV-ABI tesztek hrHPV típusokra vonatkozó eredményeit, a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a HC2 teszt nagyobb konkordanciát mutatott, mint a MBRT-HPV-ABI és a HC2 teszt, és nem volt statisztikai különbség a HC2 és a Full Spectrum L1F/L1R-HPV tesztek között a hrHPV kimutatásában. Összességében a MBRT-HPV-ABI teszt valamivel kevésbé volt érzékeny, mint akár a HC2 vagy a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt. A MBRT-HPV és MBRT-HPV-ABI tesztek korlátja, hogy keresztreakciót adott néhány alacsony kockázatú típus a magas kockázatú csoportban, illetve a vizsgált tesztekhez gyengébb szenzitivitást mutatott a HPV16 típus kimutatására. Ezért a MBRT-HPV teszt további fejlesztése szükséges lehet.

Célkitűzés 3: Új potenciális biomarker klinikai teljesítőképességének meghatározása történt CLDN1 immunreakcióval, összevetve a már korábban ajánlott p16^{INK4a} reakcióval (145).

A CLDN1 hasonló teljesítményt mutatott, mint a p16^{INK4a}, azonban annál kevésbé specifikus eredményt adott. A CLDN1 és p16^{INK4a} markerek alkalmazása, mint kombinációs triage teszt úgy tűnik, egy egyszerű stratégia lehet a kiegyensúlyozott klinikai érzékenység és specificitás elérésére. A citológia triage IC-CLDN1-p16^{INK4a} MASM értékeléssel hasonló teljesítményt mutatott, mint a HPV triage IC-p16^{INK4a} értékeléssel. Ez kiemeli a cervikális kenet immunkémiai morfológiai értékelés szerepét és arra hívja fel a figyelmet, hogy a citológia teljesítményét javítani lehet annak érdekében, hogy a HPV alapú szűrés technológiákkal versenyképes maradjon. Bár azt találtuk, hogy bizonyos előnyöket nyújt a morfológia kombinációja immuncitokémiával, sem a morfológia, sem a biomarkerek egyedül vagy kombinációkban nem voltak képesek arra, hogy kiemelkedően jó teszt teljesítményt nyújtsanak. Összefoglalva, a különböző

markerek kombinációja egy logikus lépés lehet a jövő méhnyaki diagnosztikája számára. A biomarkerek további kutatásai a cervikális carcinogenesis folyamatának jobb megértéséhez vezethetnek és végső soron a méhnyaki diagnosztikai tesztek jobb diagnosztikai teljesítményét eredményezhetik. Azonban az immunfestések munka és reagens igényes technológiák és az eredmények értékelése szubjektív, humán erőforrást, képzést igényel.

Célkitűzés 4: További új molekuláris technológiájú biomarker kutatásunkban kisebb mintaszámon feltérképeztük miRNS expressziós mintázat változásainak cervikális patológiában betöltött szerepét (154)

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a miRNS profilok segítségével meg lehet különböztetni a méhnyakrák két leggyakoribb szövettani típusát (SCC, AC) és bár a méhnyakrák diagnózis alapját jelenleg klinikai és patológiai vizsgálatok képezik, eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a miRNS expressziós profilok a daganatok típusai között különbséget tegyenek. Szignifikáns különbséget igazoltunk a HPV pozitív két szövettani típus között a miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-196a és miR-221 expressziójában. A miR-146a expressziója is méhnyakrák-specifikus, de bebizonyosodott, hogy független a rák szövettípusától vagy a HPV fertőzéstől.

7. Összefoglalás

Hazai mintákon végzett kiemelkedően magas mintaszámú elemzésünk bemutatja a HPV genotípusok gyakoriságát a Genoid laboratóriumban vizsgált mintákon. (totál: n=12345, HPV-DNS pozitív: n=6447) (176). A Genoid laboratóriumban 2005/2006-ban a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszttel (Genoid) HPV-DNS-pozitív minták közül 67% hrHPV pozitív volt, melyek közül gyakorisági sorrendben a HPV16, 31, 51, 66, 56, 58, 33, 39 és a 18 genotípusokat mutattuk ki. Egy speciális populáción bemutatott HPV genotipizálási eredményeink elsőként nyújtanak betekintést a szexmunkások cervikális, garat és anális minták HPV prevalencia adataiba (178). A FSW-ek mintái közül legalább egy HPV-DNS pozitív volt az esetek nagy többségében (82,4%), a leggyakrabban kimutatott hrHPV genotípusok: HPV 31, 16, 66, 18, 51, 58, 56.

Az újonnan fejlesztett real-time PCR alapú HPV tesztjeinket (MBRT-HPV, MBRT-HPV-ABI, Genoid) összehasonlítottuk két validált HPV teszttel, és meghatároztuk a további fejlesztési irányokat a teszt klinikai teljesítőképességének fokozása érdekében. A Genoid rutin mintákon (n=161) a Full Spectrum L1F/L1R-HPV és a MBRT-HPV tesztet összehasonlítva az egyezés 89,44%-os volt a hrHPV kimutatására (179). Az írországi kolposzkópiára utalt betegek cervix mintákon (n=241) a MBRT-HPV-ABI teszt valamivel kevésbé volt érzékeny, mint akár a HC2 (Qiagen) vagy a Full Spectrum L1F/L1R-HPV teszt a hisztológiai és citológiai klinikai végpontok tekintetében (180).

Egy új potenciális biomarker, a CLDN1 immunreakció eredményeit vetettük össze a már korábban ajánlott p16INK4a immunreakcióval citológiai mintákon (n=502) (145). Eredményeink szerint az CLDN1 immuncitokémia, mint új potenciális biomarker a citológia teljesítményét javítani képes, ha a p16INK4a teszttel kombináltan értékeltük.

Egy kisebb mintaszámú elemzésben további új molekuláris technológiájú biomarkert vizsgáltunk, melyben feltérképeztük a micro-RNS (miR) expressziós mintázat változásainak cervikális patológiában betöltött szerepét a Pécsi Tudományegyetem archív méhnyakrákos mintáin (adenocarcinoma, AC: n=22, laphámrák, SCC: n=25) (154). Elemzésünk szerint a két HPV pozitív szövettani típusú méhnyakrákban (SCC, AC) különbség volt a miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-196a és miR-221 expressziókban.

8. Summary

On domestic samples, our high number of genotyping analysis shows the frequency of HPV genotypes in the samples tested in the Genoid Laboratory by routine diagnostic service (total: n=12345, HPV-DNA positive n=6447) (176). We summarized the genotyping results obtained with the Full Spectrum L1F/L1R-HPV test (Genoid) in the Genoid Laboratory in 2005/2006. Of the HPV-DNA positive samples, 67% was hrHPV positive with the following most common hrHPV genotypes: HPV16, 31, 51, 66, 56, 58, 33, 39 and 18. Our HPV genotyping results presented in a special population of sex workers (FSW) provide insight into the prevalence of HPV infection and their genotypes of cervical, pharyngeal and anal samples collected from FSW-s (178). At least one FWS HPV-DNA sample was positive in most cases (82.4%). The most commonly detected hrHPV genotypes were HPV 31, 16, 66, 18, 51, 58 and 56.

Our newly developed real-time PCR based HPV tests (MBRT-HPV, MBRT-HPV-ABI, Genoid) were compared with two validated HPV tests and further development directions were defined to enhance their clinical performance. Comparing Full Spectrum L1F/L1R-HPV and MBRT-HPV tests on the Genoid Laboratory's routine samples, the match was 89.44% for hrHPV detection (179). On the cervix samples of patients referred to colposcopy collected in an Irish laboratory (n=241) the MBRT-HPV-ABI test was slightly less sensitive than either HC2 (Qiagen) or Full Spectrum L1F/L1R-HPV test for histological and cytological clinical endpoints (180)

The results of a new potential biomarker, the CLDN1 immunostaining, was compared with the previously known biomarker, the p16^{INK4a} immunostaining on cytological samples (n=502) (145). According to the results of our biomarker research, IC-CLDN1 as a new potential biomarker can improve the cytology performance when combined with the IC-p16^{INK4a} test.

In a smaller sample analysis, a new molecular biomarker was studied in which the role of changes in microRNA (miR) expression pattern in cervical pathology was mapped at the archive cervical cancer tissue samples of the University of Pécs (adenocarcinoma, AC n=22, squamous cell carcinomas, SCC n=25) (154). According to our analysis, the two HPV positive cervical cancers (SCC, AC) had a difference in the miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-196a and miR-221 expression.

9. Irodalomjegyzék

1. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55: 244-265.
2. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. (2006) Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/26-34.
3. zur Hausen H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384: 260-265.
4. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. (1975) Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*: 569-571.
5. Cueille N, Nougarede R, Mechali F, Philippe M, Bonne-Andrea C. (1998) Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol*, 72: 7255-7262.
6. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol*, 63: 4317-4324.
7. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, 3rd, Durst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP. (1987) Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *Embo J*, 6: 3745-3753.
8. Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. (1990) Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250: 1694-1699.
9. Bastien N, McBride AA. (2000) Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology*, 270: 124-134.
10. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352: 824-827.

11. Thomsen P, van Deurs B, Norrild B, Kayser L. (2000) The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene*, 19: 6023-6032.
12. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. (2008) Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol*, 173: 682-688.
13. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63: 1129-1136.
14. Boyer SN, Wazer DE, Band V. (1996) E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 56: 4620-4624.
15. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. (2004) DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res*, 10: 3059-3063.
16. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. (1998) The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol*, 72: 142-150.
17. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401: 70-79.
18. Parkin DM, Bray F. (2006) Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/11-25.
19. Halc G, Alemany L, Lloveras B, Schmitt M, Alejo M, Bosch FX, Tous S, Klaustermeier JE, Guimera N, Grabe N, Lahrmann B, Gissmann L, Quint W, Bosch FX, de Sanjose S, Pawlita M. (2014) Pathogenic role of the eight probably/possibly carcinogenic HPV types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82 in cervical cancer. *J Pathol*, 234: 441-451.
20. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/1-10.

21. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. (2001) Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Cmaj*, 164: 1017-1025.
22. Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. (2010) Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst*, 102: 1478-1488.
23. Giorgi Rossi P, Chini F, Bisanzi S, Burroni E, Carillo G, Lattanzi A, Angeloni C, Scalisi A, Macis R, Pini MT, Capparucci P, Guasticchi G, Carozzi FM. (2011) Distribution of high and low risk HPV types by cytological status: a population based study from Italy. *Infect Agent Cancer*, 6: 2.
24. Sturegard E, Johansson H, Ekstrom J, Hansson BG, Johnsson A, Gustafsson E, Dillner J, Forslund O. (2013) Human papillomavirus typing in reporting of condyloma. *Sex Transm Dis*, 40: 123-129.
25. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. (2012) Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30 Suppl 5: F12-23.
26. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5: F55-70.
27. Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. (1997) Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis*, 176: 1076-1079.
28. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. (1996) Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 2930-2935.
29. Hyland PL, McDade SS, McCloskey R, Dickson GJ, Arthur K, McCance DJ, Patel D. (2011) Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes. *J Virol*, 85: 10999-11006.
30. Laurson J, Khan S, Chung R, Cross K, Raj K. (2011) Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis*, 31: 918-926.

31. McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Munger K. (2011) Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 2130-2135.
32. Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatri H, Pater A. (1988) Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papilloma virus DNA. *Nature*, 335: 832-835.
33. Piccini A, Storey A, Romanos M, Banks L. (1997) Regulation of human papillomavirus type 16 DNA replication by E2, glucocorticoid hormone and epidermal growth factor. *J Gen Virol*, 78 (Pt 8): 1963-1970.
34. Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, Ding W, Yu L, Wang X, Wang L, Shen H, Zhang C, Liu H, Liu X, Zhao Y, Fang X, Li S, Chen W, Tang T, Fu A, Wang Z, Chen G, Gao Q, Li S, Xi L, Wang C, Liao S, Ma X, Wu P, Li K, Wang S, Zhou J, Wang J, Xu X, Wang H, Ma D. (2015) Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet*, 47: 158-163.
35. Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. (2002) HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol*, 67: 574-582.
36. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*, 69: 2989-2997.
37. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. (2012) A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 10516-10521.
38. Klingelhutz AJ, Roman A. (2012) Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*, 424: 77-98.
39. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. (2005) The

- carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 337: 76-84.
40. Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR, Rush BB, Demuth F, Schiffman M. (2002) Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer*, 95: 2145-2151.
 41. Elfstrom KM, Smelov V, Johansson AL, Eklund C, Naucler P, Arnheim-Dahlstrom L, Dillner J. (2014) Long-term HPV type-specific risks for ASCUS and LSIL: a 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial. *Int J Cancer*, 136: 350-359.
 42. Kovacs K, Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Szendy M, Speich N, Schmitt C, Pajor L, Bollmann R, Hildenbrand R. (2009) A 7.5-year prospective study of longer than 18 months type-specific human papillomavirus persistence in a routine cytology-based cervical screening population of about 31,000 women in West Germany. *Eur J Cancer Prev*, 18: 307-315.
 43. Monsonego J, Cox JT, Behrens C, Sandri M, Franco EL, Yap PS, Huh W. (2015) Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: data from the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*, 137: 47-54.
 44. Schiffman M, Glass AG, Wentzensen N, Rush BB, Castle PE, Scott DR, Buckland J, Sherman ME, Rydzak G, Kirk P, Lorincz AT, Wacholder S, Burk RD. (2011) A long-term prospective study of type-specific human papillomavirus infection and risk of cervical neoplasia among 20,000 women in the Portland Kaiser Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20: 1398-1409.
 45. Smelov V, Elfstrom KM, Johansson AL, Eklund C, Naucler P, Arnheim-Dahlstrom L, Dillner J. (2014) Long-term HPV type-specific risks of high-grade cervical intraepithelial lesions: a 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial. *Int J Cancer*, 136: 1171-1180.
 46. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. (2010) Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, 202: 1789-1799.

47. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. (2006) Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/52-61.
48. Wright TC, Jr., Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. (2011) The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol*, 206: 46 e41-46 e11.
49. Nyari T, Cseh I, Woodward M, Szollosi J, Bak M, Deak J. (2001) Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women in Hungary. *Hum Reprod*, 16: 2235-2237.
50. Szentirmay Z, Veleczki Z, Kasler M. (2017) [Human papillomavirus associated cervix uteri morbidity in Hungary: epidemiology and correlation with the HPV types and the simultaneous cytological diagnosis]. *Orv Hetil*, 158: 1213-1221.
51. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. (2006) Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/78-89.
52. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, Clifford GM. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*, 131: 2349-2359.
53. Quinn M, Babb P, Jones J, Allen E. (1999) Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *Bmj*, 318: 904-908.
54. Arbyn M, Castellsague X, de Sanjose S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J. (2008) Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*, 22: 2675-2686.
55. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2012) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49: 1374-1403.
56. Huh WK, Sideri M, Stoler M, Zhang G, Feldman R, Behrens CM. (2014) Relevance of random biopsy at the transformation zone when colposcopy is negative. *Obstet Gynecol*, 124: 670-678.
57. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW. (2013) 2012 updated consensus

- guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol*, 121: 829-846.
58. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC. (2012) The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 136: 1266-1297.
 59. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. (2006) Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 119: 1095-1101.
 60. Kinney W, Sung HY, Kearney KA, Miller M, Sawaya G, Hiatt RA. (1998) Missed opportunities for cervical cancer screening of HMO members developing invasive cervical cancer (ICC). *Gynecol Oncol*, 71: 428-430.
 61. Wright TC, Jr. (2007) Cervical cancer screening in the 21st century: is it time to retire the PAP smear? *Clin Obstet Gynecol*, 50: 313-323.
 62. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FA, Kinney WK, Massad LS, Mayeaux EJ, Saslow D, Schiffman M, Wentzensen N, Lawson HW, Einstein MH. (2015) Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*, 136: 178-182.
 63. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*, 383: 524-532.
 64. Carozzi F, Visioli CB, Confortini M, Iossa A, Mantellini P, Burroni E, Zappa M. (2013) hr-HPV testing in the follow-up of women with cytological abnormalities and negative colposcopy. *Br J Cancer*, 109: 1766-1774.
 65. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, de Sanjose S, Naucler P, Lloveras B, Kjaer S, Cuzick J, van Ballegooijen M, Clavel C, Iftner T. (2008) Long term predictive values of cytology and human papillomavirus

- testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*, 337: a1754.
66. Karsa L, Arbyn M, Vuyst H. (2015) European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus research*, 1: 22-31.
 67. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie G, Mirabello L, Carozzi F, Cubie H, Wentzensen N, Snijders P, Arbyn M, Monsonego J, Franceschi S. (2018) Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *Int J Cancer*.
 68. Wentzensen N. (2013) Triage of HPV-positive women in cervical cancer screening. *Lancet Oncol*, 14: 107-109.
 69. Boncz I, Sebestyen A, Dobrossy L, Kovacs A, Budai A, Szekely T. (2007) [The coverage of cervical screening in Hungary]. *Orv Hetil*, 148: 2177-2182.
 70. Koiss R, Boncz I, Hernadi Z, Szentirmay Z. (2017) [Proposal for the modernization of cervical screening procedure in Hungary]. *Orv Hetil*, 158: 2062-2067.
 71. WHO. (2009) Global advisory committee on vaccine safety, report of meeting held 17-18 June 2009. *Wkly.Epidemiol. Rec.*, 84: 325-332.
 72. WHO. (2014) Global advisory committee on vaccine safety, report of meeting held 12-13 December 2013. *Wkly.Epidemiol. Rec.*, 89: 53-60.
 73. WHO. (2014) Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014. *Wkly.Epidemiol. Rec.*, 89: 465-491.
 74. WHO. (2009) Human papillomavirus vaccines. WHO position paper. *Wkly.Epidemiol. Rec.*, 85: 118-131.
 75. Yang DY, Bracken K. (2016) Update on the new 9-valent vaccine for human papillomavirus prevention. *Can Fam Physician*, 62: 399-402.
 76. Pitisuttithum P, Velicer C, Luxembourg A. (2025) 9-Valent HPV vaccine for cancers, pre-cancers and genital warts related to HPV. *Expert Rev Vaccines*, 14: 1405-1419.
 77. Schiffman M. (2007) Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer*, 111: 145-153.

78. Castle PE, Solomon D, Saslow D, Schiffman M. (2008) Predicting the effect of successful human papillomavirus vaccination on existing cervical cancer prevention programs in the United States. *Cancer*, 113: 3031-3035.
79. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. (2013) Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int*, 2013: 519619.
80. Boers A, Wang R, Slagter-Menkema L, van Hemel BM, Ghysaert H, van der Zee AG, Wisman GB, Schuurung E. (2014) Clinical validation of the Cervista HPV HR test according to the international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical cancer screening. *J Clin Microbiol*, 52: 4391-4393.
81. Iftner T, Becker S, Neis KJ, Castanon A, Iftner A, Holz B, Staebler A, Henes M, Rall K, Haedicke J, Hann von Weyhern C, Clad A, Brucker S, Sasieni P. (2015) Head-to-head comparison of the RNA-based Aptima(R) HPV assay and the DNA-based HC2 HPV test in a routine screening population of women aged 30 to 60 years in Germany. *J Clin Microbiol*.
82. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucler P, Sankaranarayanan R, Peto J. (2012) Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*, 30 Suppl 5: F88-99.
83. Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, Hesselink AT, Snijders PJ. (2009) Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J Clin Virol*, 46 Suppl 3: S1-4.
84. Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J, van Kemenade F, Melchers WJ, Daalmeijer NF, Verkuijten M, Meijer CJ, Snijders PJ. (2011) Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol*, 49: 3983-3985.
85. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. (2015) Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol*, 136: 189-197.
86. Stathopoulou V, Koliopoulos G, Zygouris D, Pappas A, Spathis A, Karakitsos P, Kassanos D, Chrelias C. (2014) The diagnostic accuracy of E6 & 7 mRNA

- detection as a primary screening test for the detection of severe cervical lesions. *J Buon*, 19: 490-496.
87. Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Walboomers JM. (1998) HPV typing and testing in gynaecological pathology: has the time come? *Histopathology*, 33: 83-86.
 88. Uijterwaal MH, Verhoef VM, Snijders PJ, Meijer CJ. (2014) Arguments in favor of HPV testing for cervical screening and post-treatment CIN2+ monitoring. *Expert Rev Mol Diagn*, 14: 245-248.
 89. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189: 12-19.
 90. Anttila A, Kotaniemi-Talonen L, Leinonen M, Hakama M, Laurila P, Tarkkanen J, Malila N, Nieminen P. (2010) Rate of cervical cancer, severe intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage: randomised study within organised screening programme. *BMJ*, 340: c1804.
 91. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Ghiringhello B, Girlando S, Gillio-Tos A, De Marco L, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Schincaglia P, Zorzi M, Zappa M, Segnan N, Cuzick J. (2010) Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 11: 249-257.
 92. Sahasrabudde VV, Luhn P, Wentzensen N. (2011) Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiol*, 6: 1083-1098.
 93. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. (2007) Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, 111: 58-66.
 94. Castle PE, Sideri M, Jeronimo J, Solomon D, Schiffman M. (2007) Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 197: 356 e351-356.

95. Schiffman M, Wentzensen N. (2016) A Suggested Approach to Simplify and Improve Cervical Screening in the United States. *J Low Genit Tract Dis*, 20: 1-7.
96. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. (2015) p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*, 107: djv257.
97. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87: 796-802.
98. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Gravitt P, Jeronimo J, Lorincz AT, C JLMM, Sankaranarayanan R, P JFS, Szarewski A. (2012) New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine*, 30 Suppl 5: F107-116.
99. Burger EA, Kornor H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. (2011) HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 120: 430-438.
100. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. (2011) Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*, 49: 557-564.
101. Narimatsu R, Patterson BK. (2005) High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*, 123: 716-723.
102. Spathis A, Kottaridi C, Chranioti A, Meristoudis C, Chrelias C, Panayiotides IG, Paraskeva E, Karakitsos P. (2012) mRNA and DNA detection of human papillomaviruses in women of all ages attending two colposcopy clinics. *PLoS One*, 7: e49205.
103. Mirabello L, Sun C, Ghosh A, Rodriguez AC, Schiffman M, Wentzensen N, Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Lorincz A, Burk RD. (2012) Methylation

- of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J Natl Cancer Inst*, 104: 556-565.
104. Wentzensen N, Sun C, Ghosh A, Kinney W, Mirabello L, Wacholder S, Shaber R, LaMere B, Clarke M, Lorincz AT, Castle PE, Schiffman M, Burk RD. (2012) Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *J Natl Cancer Inst*, 104: 1738-1749.
105. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Grana O, Ballestar E, Ropero S, Espada J, Melo SA, Lujambio A, Fraga MF, Pino I, Javierre B, Carmona FJ, Acquadro F, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Pineau P, Dejean A, Lloveras B, Capella G, Quer J, Buti M, Esteban JI, Allende H, Rodriguez-Frias F, Castellsague X, Minarovits J, Ponce J, Capello D, Gaidano G, Cigudosa JC, Gomez-Lopez G, Pisano DG, Valencia A, Piris MA, Bosch FX, Cahir-McFarland E, Kieff E, Esteller M. (2009) The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res*, 19: 438-451.
106. Patel DA, Rozek LS, Colacino JA, Van Zomeren-Dohm A, Ruffin MT, Unger ER, Dolinoy DC, Swan DC, Onyekwuluje J, DeGraffinreid CR, Paskett ED. (2012) Patterns of cellular and HPV 16 methylation as biomarkers for cervical neoplasia. *J Virol Methods*, 184: 84-92.
107. Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Chen M, Badiga S, Edberg JC, Partridge EE, Johanning GL. (2011) A higher degree of methylation of the HPV 16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, 117: 957-963.
108. Rauber D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. (2008) Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 140: 258-262.
109. Schweizer J, Lu PS, Mahoney CW, Berard-Bergery M, Ho M, Ramasamy V, Silver JE, Bisht A, Labiad Y, Peck RB, Lim J, Jeronimo J, Howard R, Gravitt PE, Castle PE. (2012) Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*, 48: 4646-4648.

110. Barbosa LC, da Silva ID, Correa JC, Ribalta JC. (2011) Survivin and telomerase expression in the uterine cervix of women with human papillomavirus-induced lesions. *Int J Gynecol Cancer*, 21: 15-21.
111. Bourmenskaya O, Shubina E, Trofimov D, Rebrikov D, Sabdulaeva E, Nepsha O, Bozhenko V, Rogovskaya S, Sukhikh G. (2013) Host gene expression profiling of cervical smear is eligible for cancer risk evaluation. *J Clin Pathol*, 66: 282-285.
112. del Pino M, Garcia S, Fuste V, Alonso I, Fuste P, Torne A, Ordi J. (2009) Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol*, 201: 488 e481-487.
113. Huang LP, Adelson ME, Mordechai E, Trama JP. (2010) CIP2A expression is elevated in cervical cancer. *Cancer Biomark*, 8: 309-317.
114. Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kay HH, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J, Jr., Pecorelli S. (2005) Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology*, 331: 269-291.
115. Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N. (1998) Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 14932-14937.
116. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskeva E. (2009) p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*, 35: 210-220.
117. Gage JC, Schiffman M, Hunt WC, Joste N, Ghosh A, Wentzensen N, Wheeler CM. (2013) Cervical histopathology variability among laboratories: a population-based statewide investigation. *Am J Clin Pathol*, 139: 330-335.
118. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, von Knebel Doeberitz M, Arbyn M. (2014) p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol*, 142: 767-772.

119. Zhang Q, Kuhn L, Denny LA, De Souza M, Taylor S, Wright TC, Jr. (2007) Impact of utilizing p16INK4A immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening tests. *Int J Cancer*, 120: 351-356.
120. Passamonti B, Gustinucci D, Recchia P, Bulletti S, Carlini A, Cesarini E, D'Amico MR, D'Angelo V, Di Dato E, Martinelli N, Malaspina M, Spita N. (2010) Expression of p16 in abnormal pap-tests as an indicator of CIN2+ lesions: a possible role in the low grade ASC/US and L/SIL (Ig) cytologic lesions for screening prevention of uterine cervical tumours. *Pathologica*, 102: 6-11.
121. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Luthge A, Bergeron C, Kommos F, Loning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. (2011) Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*, 121: 505-509.
122. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, Giorgi-Rossi P, Pontenani G, Rosso S, Sani C, Sintoni C, Segnan N, Zorzi M, Cuzick J, Rizzolo R, Ronco G. (2008) Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 9: 937-945.
123. Zeng WJ, Li Y, Fei HL, Cheng XD, Ye F, Lu WG, Xie X. (2011) The value of p16ink4a expression by fluorescence in situ hybridization in triage for high risk HPV positive in cervical cancer screening. *Gynecol Oncol*, 120: 84-88.
124. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. (2015) The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer*, 136: 2741-2751.
125. Cuschieri K, Wentzensen N. (2008) Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 2536-2545.
126. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. (2012) p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol*, 120: 294-307.

127. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R, European CCSG. (2010) The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol*, 134: 12-21.
128. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, Girlando S, Rosso S, Naldoni C, Dalla Palma P, Zorzi M, Giorgi-Rossi P, Segnan N, Cuzick J, Ronco G. (2013) Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 14: 168-176.
129. van Bogaert LJ. (2012) P16INK4a immunocytochemistry/immunohistochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. *Ann Diagn Pathol*, 16: 422-426.
130. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM. (1996) Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 4350-4354.
131. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, Pater A. (1997) Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer*, 75: 1410-1416.
132. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, Alameda F, Keller T, Rehm S, Ridder R. (2015) Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol*, 123: 373-381.
133. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R, Group PS. (2013) Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst*, 105: 1550-1557.
134. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. (2011) p16/Ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytologies: results from

- the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol*, 119: 158-166.
135. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, Balfourt-van der Meij GA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ. (2014) Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer*, 136: 2361-2368.
 136. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN, Stiemerling E, Poitras N, Lorey T, Kinney W. (2014) Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol*, 122: 914-920.
 137. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M. (2012) Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res*, 18: 4154-4162.
 138. Szabo I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. (2009) Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol*, 24: 1607-1615.
 139. Lal-Nag M, Morin PJ. (2009) The claudins. *Genome Biol*, 10: 235.
 140. Morin PJ. (2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*, 65: 9603-9606.
 141. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S. (2008) Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, 27: 6930-6938.
 142. Lee JW, Lee SJ, Seo J, Song SY, Ahn G, Park CS, Lee JH, Kim BG, Bae DS. (2005) Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 97: 53-59.
 143. Sobel G, Nemeth J, Kiss A, Lotz G, Szabo I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Paska C. (2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 103: 591-598.
 144. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol*, 36: 162-169.

145. Benczik M, Galamb A, Koiss R, Kovacs A, Jaray B, Szekely T, Szekerczes T, Schaff Z, Sobel G, Jeney C. (2016) Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res*, 22: 179-188.
146. Szekerczes T, Galamb A, Kocsis A, Benczik M, Takacs T, Martonos A, Jaray B, Kiss A, Jeney C, Nyiri M, Schaff Z, Sobel G. (2017) Dual-Stained Cervical Cytology and Histology with Claudin-1 and Ki67. *Pathol Oncol Res*.
147. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle*, 7: 2643-2646.
148. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. (2011) miRNAs in human cancer. *J Pathol*, 223: 102-115.
149. Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Z. (2010) [Alterations in microRNA expression patterns in liver diseases]. *Orv Hetil*, 151: 1843-1853.
150. Reshmi G, Pillai MR. (2008) Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Lett*, 582: 4113-4116.
151. Ribeiro J, Sousa H. (2014) MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep*, 41: 1525-1531.
152. Tang T, Wong HK, Gu W, Yu MY, To KF, Wang CC, Wong YF, Cheung TH, Chung TK, Choy KW. (2013) MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 129: 199-208.
153. Galamb A, Benczik M, Zinner B, Vigh E, Baghy K, Jeney C, Kiss A, Lendvai G, Sobel G. (2015) Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Oncol Res*, 21: 503-508.
154. Gocze K, Gombos K, Juhasz K, Kovacs K, Kajtar B, Benczik M, Gocze P, Patczai B, Arany I, Ember I. (2013) Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res*, 33: 2561-2567.
155. Gocze K, Gombos K, Kovacs K, Juhasz K, Gocze P, Kiss I. (2015) MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Res*, 35: 523-530.
156. Pedroza-Torres A, Lopez-Urrutia E, Garcia-Castillo V, Jacobo-Herrera N, Herrera LA, Peralta-Zaragoza O, Lopez-Camarillo C, De Leon DC, Fernandez-Retana J, Cerna-Cortes JF, Perez-Plasencia C. (2014) MicroRNAs in cervical

- cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules*, 19: 6263-6281.
157. Rao Q, Shen Q, Zhou H, Peng Y, Li J, Lin Z. (2012) Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Med Oncol*, 29: 1242-1248.
 158. Saavedra KP, Brebi PM, Roa JC. (2012) Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics*, 4: 13.
 159. Tian Q, Li Y, Wang F, Li Y, Xu J, Shen Y, Ye F, Wang X, Cheng X, Chen Y, Wan X, Lu W, Xie X. (2014) MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. *J Natl Cancer Inst*, 106.
 160. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, Jr., Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X. (2010) A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res*, 70: 1441-1448.
 161. Del Pino M, Svanholm-Barrie C, Torne A, Marimon L, Gaber J, Sagasta A, Persing DH, Ordi J. (2015) mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer. *Mod Pathol*, 28: 312-320.
 162. Varga N, Mozes J, Keegan H, White C, Kelly L, Pilkington L, Benczik M, Zsuzsanna S, Sobel G, Koiss R, Babarczy E, Nyiri M, Kovacs L, Attila S, Kaltenecker B, Geresi A, Kocsis A, O'Leary J, Martin CM, Jeney C. (2017) The Value of a Novel Panel of Cervical Cancer Biomarkers for Triage of HPV Positive Patients and for Detecting Disease Progression. *Pathol Oncol Res*, 23: 295-305.
 163. De Strooper LM, Meijer CJ, Berkhof J, Hesselink AT, Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA. (2014) Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*, 7: 1251-1257.
 164. Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, Wang SS. (2009) Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol*, 112: 293-299.
 165. Yang N, Nijhuis ER, Volders HH, Eijnsink JJ, Lendvai A, Zhang B, Hollema H, Schuurin E, Wisman GB, van der Zee AG. (2010) Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. *Cell Oncol*, 32: 131-143.

166. De Strooper LM, Hesselink AT, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA. (2014) Combined CADM1/MAL methylation and cytology testing for colposcopy triage of high-risk HPV-positive women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23: 1933-1937.
167. De Strooper LM, van Zummeren M, Steenbergen RD, Bleeker MC, Hesselink AT, Wisman GB, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. (2014) CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J Clin Pathol*, 67: 1067-1071.
168. Kim MK, Lee IH, Lee KH, Lee YK, So KA, Hong SR, Hwang CS, Kee MK, Rhee JE, Kang C, Hur SY, Park JS, Kim TJ. (2016) DNA methylation in human papillomavirus-infected cervical cells is elevated in high-grade squamous intraepithelial lesions and cancer. *J Gynecol Oncol*, 27: e14.
169. Overmeer RM, Henken FE, Bierkens M, Wilting SM, Timmerman I, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD. (2009) Repression of MAL tumour suppressor activity by promoter methylation during cervical carcinogenesis. *J Pathol*, 219: 327-336.
170. Overmeer RM, Louwers JA, Meijer CJ, van Kemenade FJ, Hesselink AT, Daalmeijer NF, Wilting SM, Heideman DA, Verheijen RH, Zaal A, van Baal WM, Berkhof J, Snijders PJ, Steenbergen RD. (2011) Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*, 129: 2218-2225.
171. Verhoef VM, Bosgraaf RP, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Heideman DA, Hesselink AT, Bekkers RL, Steenbergen RD, Massuger LF, Melchers WJ, Bulten J, Overbeek LI, Berkhof J, Snijders PJ, Meijer CJ. (2014) Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Oncol*, 15: 315-322.
172. Chen YC, Huang RL, Huang YK, Liao YP, Su PH, Wang HC, Chang CC, Lin YW, Yu MH, Chu TY, Lai HC. (2013) Methyloomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of beta-catenin signaling in cervical cancer. *Int J Cancer*, 135: 117-127.

173. Lai HC, Lin YW, Huang TH, Yan P, Huang RL, Wang HC, Liu J, Chan MW, Chu TY, Sun CA, Chang CC, Yu MH. (2008) Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *Int J Cancer*, 123: 161-167.
174. Pun PB, Liao YP, Su PH, Wang HC, Chen YC, Hsu YW, Huang RL, Chang CC, Lai HC. (2015) Triage of high-risk human papillomavirus-positive women by methylated POU4F3. *Clin Epigenetics*, 7: 85.
175. Kocsis A, Takacs T, Jeney C, Schaff Z, Koiss R, Jaray B, Sobel G, Pap K, Szekely I, Ferenci T, Lai HC, Nyiri M, Benczik M. (2017) Performance of a new HPV and biomarker assay in the management of hrHPV positive women: Subanalysis of the ongoing multicenter TRACE clinical trial (n > 6,000) to evaluate POU4F3 methylation as a potential biomarker of cervical precancer and cancer. *Int J Cancer*, 140: 1119-1133.
176. Benczik M. (2008) [HPV genotypes detected by GenoID laboratory in Hungary at 2005/2006] HPV-genotípusok Magyarországon a Genoid laboratórium 2005/2006-ban végzett 12000 vizsgálata alapján STD és Genitális Infektológia, 2: 10-16.
177. Jeney C, Takacs T, Sebe A, Schaff Z. (2007) Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods*, 140: 32-42.
178. Marek E, Dergez T, D'Cruz G, Bozsa S, Cseh A, Szilard I, Benczik M, Kiss I, Varszegi D, Vilagi S, Ember I, Gocze P. (2013) Human papillomavirus infections among Hungarian female sex workers. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 23: 65-75.
179. Takacs T, Jeney C, Kovacs L, Mozes J, Benczik M, Sebe A. (2008) Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods*, 149: 153-162.
180. Keegan H, Pilkington L, McInerney J, Jeney C, Benczik M, Cleary S, von Bunau G, Turner M, D'Arcy T, S OT, Pal-Szenthe B, Kaltenecker B, Mozes J, Kovacs A, Solt A, Bolger N, O'Leary J, Martin C. (2014) Human papillomavirus detection and genotyping, by HC2, full-spectrum HPV and molecular beacon real-time HPV assay in an Irish colposcopy clinic. *J Virol Methods*, 201: 93-100.
181. Tyagi S, Kramer FR. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14: 303-308.

182. Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31: 3406-3415.
183. Kornya L, Cseh I, Deak J, Bak M, Fulop V. (2002) The diagnostics and prevalence of genital human papillomavirus (HPV) infection in Hungary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 100: 231-236.
184. Olcese VA, Chen Y, Schlegel R, Yuan H. (2004) Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol*, 4: 29.
185. Gravitt PE, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE. (2008) A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 1248-1254.
186. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/42-51.
187. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. (2005) The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, 97: 1072-1079.
188. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C, McGoogan E. (2005) Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol*, 58: 946-950.
189. Huh WK, Williams E, Huang J, Bramley T, Poulos N. (2015) Cost effectiveness of human papillomavirus-16/18 genotyping in cervical cancer screening. *Appl Health Econ Health Policy*, 13: 95-107.
190. Safaeian M, Solomon D, Wacholder S, Schiffman M, Castle P. (2007) Risk of precancer and follow-up management strategies for women with human papillomavirus-negative atypical squamous cells of undetermined significance. *Obstet Gynecol*, 109: 1325-1331.

191. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14: 467-475.
192. Brown B, Blas MM, Cabral A, Carcamo C, Gravitt PE, Halsey N. (2011) Oral sex practices, oral human papillomavirus and correlations between oral and cervical human papillomavirus prevalence among female sex workers in Lima, Peru. *Int J STD AIDS*, 22: 655-658.
193. Canadas MP, Bosch FX, Junquera ML, Ejarque M, Font R, Ordonez E, de Sanjose S. (2004) Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. *J Clin Microbiol*, 42: 1330-1332.
194. del Amo J, Gonzalez C, Losana J, Clavo P, Munoz L, Ballesteros J, Garcia-Saiz A, Belza MJ, Ortiz M, Menendez B, del Romero J, Bolumar F. (2005) Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex Transm Infect*, 81: 79-84.
195. Ford K, Reed BD, Wirawan DN, Muliawan P, Sutarga M, Gregoire L. (2003) The Bali STD/AIDS study: human papillomavirus infection among female sex workers. *Int J STD AIDS*, 14: 681-687.
196. Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. (2000) Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis*, 27: 438-445.
197. Mak R, Van Renterghem L, Cuvelier C. (2004) Cervical smears and human papillomavirus typing in sex workers. *Sex Transm Infect*, 80: 118-120.
198. Ortiz M, Torres M, Munoz L, Fernandez-Garcia E, Canals J, Cabornero AI, Aguilar E, Ballesteros J, Del Amo J, Garcia-Saiz A. (2006) Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. *J Clin Microbiol*, 44: 1428-1434.

199. Shikova E, Todorova I, Ganchev G, Kouseva-Dragneva V, Kalascheva-Zaimova P. (2011) Prevalence of human papillomavirus infection among female sex workers in Bulgaria. *Int J STD AIDS*, 22: 278-280.
200. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348: 518-527.
201. Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO, Hoang Anh PT, Ferreccio C, Matos E, Posso H, de Sanjose S, Shin HR, Sukvirach S, Lazcano-Ponce E, Ronco G, Rajkumar R, Qiao YL, Munoz N, Franceschi S. (2006) Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 2148-2153.
202. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, de Sanjose S, Ghaffari AM, Gonzalez LC, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Navarro C, Vergara A, Ascunce N, Guerrero E, Shah KV. (1996) Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst*, 88: 1060-1067.
203. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 338: 423-428.
204. Kataja V, Syrjanen S, Yliskoski M, Hippelinen M, Vayrynen M, Saarikoski S, Mantyjarvi R, Jokela V, Salonen JT, Syrjanen K. (1993) Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 138: 735-745.
205. Koutsky L. (1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 102: 3-8.
206. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. (2003) Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 157: 218-226.
207. Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Osterlind A, Meijer CJ, van den Brule AJ. (2002) Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sex Transm Infect*, 78: 215-218.

208. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S. (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1772-1783.
209. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. (2012) Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *Jama*, 307: 693-703.
210. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986-994.
211. Jordens JZ, Lanham S, Pickett MA, Amarasekara S, Abeywickrema I, Watt PJ. (2000) Amplification with molecular beacon primers and reverse line blotting for the detection and typing of human papillomaviruses. *J Virol Methods*, 89: 29-37.
212. Szuhai K, Sandhaus E, Kolkman-Uljee SM, Lemaitre M, Truffert JC, Dirks RW, Tanke HJ, Fleuren GJ, Schuurin E, Raap AK. (2001) A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SybrGreen and molecular beacon polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 159: 1651-1660.
213. Tapp I, Malmberg L, Rennel E, Wik M, Syvanen AC. (2000) Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes. *Biotechniques*, 28: 732-738.
214. Wang L, Blasic JR, Jr., Holden MJ, Pires R. (2005) Sensitivity comparison of real-time PCR probe designs on a model DNA plasmid. *Anal Biochem*, 344: 257-265.
215. Cuschieri K, Cubie H, Graham C, Rowan J, Hardie A, Horne A, Earle CB, Bailey A, Crosbie EJ, Kitchener H. (2014) Clinical performance of RNA and DNA based HPV testing in a colposcopy setting: Influence of assay target, cut off and age. *J Clin Virol*, 59: 104-108.
216. Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Young M, Stoler M, McCarthy J, Wright C, Bergeron C, Soutter WP, Lyons D, Cuzick J. (2012) Comparison of seven tests for high-grade cervical

- intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. *J Clin Microbiol*, 50: 1867-1873.
217. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. (2009) Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*, 124: 516-520.
 218. Mesher D, Szarewski A, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Young M, Stoler M, Bergeron C, McCarthy J, Wright C, Liddle S, Soutter WP, Lyons D, Cuzick J. (2013) Comparison of human papillomavirus testing strategies for triage of women referred with low-grade cytological abnormalities. *Eur J Cancer*, 49: 2179-2186.
 219. White C, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, Kerr P, Sharp L, O'Toole S, Turner M, Prendiville W, D'Arcy T, Fitzpatrick M, Lenehan P, Flannelly G, O'Leary JJ, Martin CM. (2013) Evaluation of the clinical performance of the cobas 4800 HPV test in patients referred for colposcopy. *J Clin Microbiol*, 51: 3415-3417.
 220. Ko V, Nanji S, Tambouret RH, Wilbur DC. (2007) Testing for HPV as an objective measure for quality assurance in gynecologic cytology: positive rates in equivocal and abnormal specimens and comparison with the ASCUS to SIL ratio. *Cancer*, 111: 67-73.
 221. Castle PE, Fetterman B, Thomas Cox J, Shaber R, Poitras N, Lorey T, Kinney W. (2010) The age-specific relationships of abnormal cytology and human papillomavirus DNA results to the risk of cervical precancer and cancer. *Obstet Gynecol*, 116: 76-84.
 222. Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, Koiss R, O'Leary J, Joura EA, Rosenlund M, Colau B, Schledermann D, Kukk K, Damaskou V, Repanti M, Vladareanu R, Kolomiets L, Savicheva A, Shipitsyna E, Ordi J, Molijn A, Quint W, Raillard A, Rosillon D, De Souza SC, Jenkins D, Holl K. (2013) Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer*, 132: 854-867.
 223. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA,

- Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Ijazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menendez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andujar M, Castellsague X, Sanchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Munoz N, Bosch FX. (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 11: 1048-1056.
224. Safaeian M, Schiffman M, Gage J, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE. (2009) Detection of precancerous cervical lesions is differential by human papillomavirus type. *Cancer Res*, 69: 3262-3266.
225. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM, Group A. (2007) A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*, 195: 1582-1589.
226. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R, Proyecto Epidemiologico Guanacaste G. (2008) Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*, 100: 513-517.
227. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, Demuth F, Schiffman M, Wacholder S, Castle PE. (2011) Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol*, 12: 663-672.
228. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen N, Downs LS, Jr., Spitzer M, Moscicki AB, Franco EL, Stoler MH, Schiffman M, Castle PE, Myers ER. (2012) American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening

- guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*, 137: 516-542.
229. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. (2010) Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*, 34: 1077-1087.
230. Vazquez-Ortiz G, Ciudad CJ, Pina P, Vazquez K, Hidalgo A, Alatorre B, Garcia JA, Salamanca F, Peralta-Rodriguez R, Rangel A, Salcedo M. (2005) Gene identification by cDNA arrays in HPV-positive cervical cancer. *Arch Med Res*, 36: 448-458.
231. Vrdoljak-Mozetic D, Krasevic M, Versa Ostojic D, Stemberger-Papic S, Rubesa-Mihaljevic R, Bubonja-Sonje M. (2015) HPV16 genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions. *Cytopathology*, 26: 10-18.
232. Benczik M, Galamb, Á., Zinner, B., Mikó, M., Ács, N., Jeney, Cs., Sobel, G., . (2013) [New molecular biology approaches and biological markers in the cervical cancer screening] Új molekuláris biológiai módszerek és biológiai jelzők a méhnyakrák szűrésben. *Nőgyógyászati Onkológia*, 18: 63-67.
233. Narisawa-Saito M, Kiyono T. (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*, 98: 1505-1511.
234. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P, Auvinen E. (2011) Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One*, 6: e21646.
235. Zheng ZM, Wang X. (2011) Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta*, 1809: 668-677.
236. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2257-2261.

237. Calin GA, Croce CM. (2007) Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest*, 117: 2059-2066.
238. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. (2003) Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 22: 1225-1237.
239. Yao T, Lin Z. (2012) MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochim Biophys Acta*, 1822: 248-260.
240. Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M. (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One*, 7: e39632.
241. Melar-New M, Laimins LA. (2010) Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol*, 84: 5212-5221.
242. McCluggage WG. (2007) Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology*, 39: 97-111.
243. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM. (2008) Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One*, 3: e2557.

10. Saját publikációk jegyzéke

A tézisekben tárgyalt saját publikációk

1. Benczik M, Galamb A, Koiss R, Kovacs A, Jaray B, Szekely T, Szekerczes T, Schaff Z, Sobel G, Jeney C. (2016) Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res*, 22: 179-188.
2. Marek E, Dergez T, D'Cruz G, Bozsa S, Cseh A, Szilard I, Benczik M, Kiss I, Varszegi D, Vilagi S, Ember I, Gocze P. (2013) Human papillomavirus infections among Hungarian female sex workers. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 23: 65-75.
3. Keegan H, Pilkington L, McInerney J, Jeney C, Benczik M, Cleary S, von Bunau G, Turner M, D'Arcy T, S OT, Pal-Szenthe B, Kaltenecker B, Mozes J, Kovacs A, Solt A, Bolger N, O'Leary J, Martin C. (2014) Human papillomavirus detection and genotyping, by HC2, full-spectrum HPV and molecular beacon real-time HPV assay in an Irish colposcopy clinic. *J Virol Methods*, 201: 93-100.
4. Gocze K, Gombos K, Juhasz K, Kovacs K, Kajtar B, Benczik M, Gocze P, Patczai B, Arany I, Ember I. (2013) Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer Res*, 33: 2561-2567.
5. Takacs T, Jeney C, Kovacs L, Mozes J, Benczik M, Sebe A. (2008) Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods*, 149: 153-162.
6. Benczik M. (2008) [HPV genotypes detected by GenoID laboratory in Hungary at 2005/2006] HPV-genotípusok Magyarországon a Genoid laboratórium 2005/2006-ban végzett 12000 vizsgálata alapján STD és Genitális Infektológia, 2: 10-16.

A tézisekben nem tárgyalt saját publikációk

1. Szekerczes T, Galamb A, Kocsis A, Benczik M, Takacs T, Martonos A, Jaray B, Kiss A, Jeney C, Nyiri M, Schaff Z, Sobel G. (2017) Dual-Stained Cervical Cytology and Histology with Claudin-1 and Ki67. *Pathol Oncol Res*.
2. Kocsis A, Takacs T, Jeney C, Schaff Z, Koiss R, Jaray B, Sobel G, Pap K, Szekely I, Ferenci T, Lai HC, Nyiri M, Benczik M. (2017) Performance of a new HPV and

- biomarker assay in the management of hrHPV positive women: Subanalysis of the ongoing multicenter TRACE clinical trial (n > 6,000) to evaluate POU4F3 methylation as a potential biomarker of cervical precancer and cancer. *Int J Cancer*, 140: 1119-1133.
3. Varga N, Mozes J, Keegan H, White C, Kelly L, Pilkington L, Benczik M, Zsuzsanna S, Sobel G, Koiss R, Babarczy E, Nyiri M, Kovacs L, Attila S, Kaltenecker B, Geresi A, Kocsis A, O'Leary J, Martin CM, Jeney C. (2017) The Value of a Novel Panel of Cervical Cancer Biomarkers for Triage of HPV Positive Patients and for Detecting Disease Progression. *Pathol Oncol Res*, 23: 295-305.
 4. Toth J, Urban E, Osztie H, Benczik M, Indra A, Nagy E, Allerberger F. (2016) Distribution of PCR ribotypes among recent *Clostridium difficile* isolates collected in two districts of Hungary using capillary gel electrophoresis and review of changes in the circulating ribotypes over time. *J Med Microbiol*, 65: 1158-1163.
 5. Galamb A, Benczik M, Zinner B, Vigh E, Baghy K, Jeney C, Kiss A, Lendvai G, Sobel G. (2015) Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Oncol Res*, 21: 503-508.
 6. Lindemann MJ, Hu Z, Benczik M, Liu KD, Gaffen SL. (2008) Differential regulation of the IL-17 receptor by gammac cytokines: inhibitory signaling by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*, 283: 14100-14108.
 7. Younes SA, Csire M, Palyi B, Mikala G, Valyi-Nagy I, Cseh I, Benczik M, Jeney C, Takacs T, Simon E, Fulop V, Berencsi G, Fekete G, Visy M. (2007) Endotoxins do not influence transplacental transmission of lymphotropic human herpesviruses and human papillomaviruses into amniotic fluid taken from healthy mothers before parturition in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 54: 279-303.
 8. Benczik M, Gaffen SL. (2004) The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest*, 33: 109-142.
 9. Lindemann MJ, Benczik M, Gaffen SL. (2003) Anti-apoptotic signaling by the interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosine residues within the common gamma (gamma c) receptor subunit. *J Biol Chem*, 278: 10239-10249.

11. Köszönetnyilvánítás

- A témavetőm, Dr. Sobel Gábor Ph.D, és a publikált cikkekben közreműködő társszerzőkön kívül
- Dr. Jeney Csaba Ph.D: az egykori Genoid Kft. kutatásfejlesztési részlegének vezetőjeként a szakmai mentori segítségéért
- Prof. Dr. Schaff Zsuzsa: a kutatási együttműködésekben nyújtott szakmai útmutatásáért
- Liszonyi Zsuzsanna: vezető asszisztensi munkájáért
- Szabó Magolna: validáló analitikusi munkájáért
- Genoid Kft. és a Synlab Hungary Kft. ügyvezetőinek a támogatásáért

A dolgozatban publikált eredmények az alábbi pályázati támogatások és kutatási együttműködések segítségével valósulhattak meg:

- HVP PCR és Cervicalis carcinoma biomarker eljárások teljesítőképesség mérése - NKFP 1/009/2005 Jedlik Ányos Kutatási Pályázat #KMR_12-1-2012-0032
- FP7 Collaborative project Automatic Cancer Screening Based on Real-time PCR – AUTOCAS, #HEALTH-2007-2.4.1-4
- Systems biology approaches to cervical pre-cancer and cancer SYSTEMCERV (FP7 SME-targeted Collaborative Project, EU; HEALTH-2012.2.1.2-1) #FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1-Grant Agreement Number 306037
- OTKA #PD 105019