

Оригинален илуд

## ПРЕВАЛЕНЦИЈА И ДИСТРИБУЦИЈА НА ХУМАН ПАПИЛОМА ВИРУС ИНФЕКЦИЈА КАЈ КЛИНИЧКИ СУСПЕКТНИ ЦЕРВИКАЛНИ ЛЕЗИИ

### PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CLINICALLY SUSPECTED CERVICAL LESIONS

Стојановска Валентина<sup>1</sup>, Панов Сашо<sup>2</sup>, Башеска Нели<sup>3</sup>, Јосифовска Славица<sup>2</sup>, Димитров Горан<sup>4</sup>, Петановски Зоранчо<sup>1</sup>, Стојковски Јане<sup>1</sup> и Хаџи-Лега Макули<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лабораторија за асистирана репродукција, Оддел за гинекологија и акушерство, Општа приватна болница РеМедика, Скопје, <sup>2</sup>Лабораторија за молекуларна биологија, Институт за биологија, Природно-математички факултет, <sup>3</sup>Лабораторијата за хистопатологија и клиничка цитологија, ЈЗУ Универзитетска клиника за радиотерапија и онкологија, <sup>4</sup>ЈЗУ Универзитетска клиника за гинекологија и акушерство, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

#### Апстракт

**Вовед.** Малигната трансформација индуцирана од хуман-папилома вирусот (ХПВ) вклучува инхибиција на p53 и pRB тумор-супресорските протеини во инфицираните цервикални клетки со Е6 и Е7 вирусните протеини, соодветно. Вирусната инфекција со високоризичните ХПВ-типови, го зголемува ризикот за перзистентна или прогресивна цервикална лезија. Целите на оваа студија се: детекција и типизација на хуман-папилома вирусот кај па-циентките со цервикални лезии; одредување на корелациите меѓу ХПВ- инфекцијата и цитоло-шките или хистопатолошките дијагнози, како и корелациите со возраста на пациентките.

**Методи.** Во оваа студија беа анализирани 6988 примероци. Од нив се исклучија примероците кои се повторуваа и кои имаа деградирана ДНК, а во работната група беа вклучени 4421 пациент. За детекција и типизација на ХПВ беше користена PCR-RFLP техниката.

**Резултати.** Фреквенцијата на ХПВ кај прекурсорните лезии се движеше од: 51% (n=539) кај лесната; 75% (n=303) кај умерената, 91% (n=186) кај тешката дисплазија и 93% (n=78) кај *in situ* карциномот. Најзастапени ХПВ-типови по опаѓачки редослед беа ХПВ 16, 31, 53, 18, итн. Највисока фреквенција на инфекцијата е најдена кај пациентките до 19 години.

**Заклучок.** Овие резултати ја оправдуваат пот-

ребата за вклучување на ХПВ-анализата како дополнување (суплемент) во примарното скринирање за цервикалните лезии.

Резултатите може да послужат во националната стратегија против цервикалниот карцином, како и за навремена ХПВ- вакцинација на младата популација.

**Клучни зборови:** цервикална лезија, хуман-папилома вирус, детекција, типизација, PCR-RFLP

#### Abstract

**Background.** Malignant transformation induced by HPV involves inhibition of p53 and pRB tumor suppressor proteins in infected cervical cells with E6 and E7 viral proteins, respectively. Infection with high-risk HPV-genotypes increases the risk for persistent or progressive cervical lesions. The aim of this study was to determine the presence and type of HPV-infection in patients with cervical lesions, as well as to determine the correlation of HPV-infection with the cytological and histopathological diagnosis and with the age of the patients.

**Methods.** A total of 6988 samples were analyzed in this study. After exclusion of the repeated samples and those containing degraded DNA, 4421 patients were included in the study group. PCR-RFLP method was used for HPV-detection and typing.

**Results.** The HPV-frequencies in samples with precursor lesions were as follows: 51% (n=539) in patients with mild; 75% (n=303) with moderate; 91% (n=186) with severe dysplasia and 93% (n=78) with *carcinoma in situ* lesions. The most frequent HPV-types in descending order were: HPV- 16, 31, 53, 18, 58, etc. The most frequent HPV-infection was found in the youn-

gest group of patients (under the age of 19 years).

**Conclusion.** These results justify the need to include HPV-analysis as supplementary in primary screening for cervical lesions. The results can also be used for developing national strategy against cervical carcinoma and for prevention with HPV-vaccine of the young population.

**Key words:** cervical lesions, human papillomavirus, detection, typing, PCR-RFLP

## Вовед

Хуман-папилома вирусот (ХПВ) е мал ДНК-вирус кој и припаѓа на фамилијата Papilloma-viridae (de Villiers, 2004) [1]. Како епителотропен вирус ги инфицира епителните стем-клетки предизвикувајќи нивна хиперпролиферација (Pfister, 1984) [2]. Малигната трансформација индуцирана од ХПВ- вклучува инхибиција на p53 и pRB тумор-супресорските генски продукти во инфицираните цервикални клетки преку E6 и E7 вирусните протеини, соодветно. Улогата на ХПВ- во цервикалната патогенеза е докажана во бројни епидемиолошки студии. Денес се познати повеќе од 100 ХПВ- генотипови (Chan и сор. 2002) [3] кои според инфективноста се поделени на т.н. кожни или генитални типови, а според асоцијацијата со малигните цервикални лезии, генителните ХПВ-типови се означени како нискоризични ХПВ-типови [6,11] и високоризични ХПВ-типови [16,18,31,45] (Munoz и сор. 2003) [4]. Вирусната инфекција во високоризични ХПВ-генотипови во комбинација со други фактори на ризик го зголемува ризикот за перзистентна инфекција, прогресивни цервикални лезии, како и појава на цервикален карцином.

Во последниве дваесетина година во Република Македонија инциденцијата на цервикалниот карцином бележи благ пораст со просечен број од 16,42 случаи на 100.000 жени во 2000 година, 24,19/100.000 во 2001 година, достигнувајќи 22,42/100.000 жени во 2006 година (Регистар за рак, 2005) [5]. Овие податоци го потврдуваат не-достатокот на организиран скрининг за рана детекција на прекурсорните лезии на грлото на матката.

Целта на оваа студија беше да се детерминира дистрибуцијата на ХПВ-генотиповите, да се одредат корелации меѓу ХПВ-инфекцијата и соодветните цитолошки и хистопатолошки дијагнози, како и да се одреди најафектираната возрастна група на пациентки.

## Материјал и методи

Во оваа ретроспективно-проспективна студија беа анализирани вкупно 6988 примероци од цервикални клетки од пациентки кај кои е поставена цитолошка (Лабораторија за гинеколошка цитологија, Универзитетска клиника за гинекологија и акушерство, Скопје) или хистопатолошка дијагноза (Лабораторија за хистопатологија и клиничка цитологија, Универзитетска клиника за радиотерапија и онкологија, Медицински факултет, Скопје). Материјалот за анализа за детекција и типизација на ХПВ-инфекцијата беше доставуван од Универзитетска клиника за гинекологија и акушерство во Скопје. Детекцијата и типизацијата на вирусот со техниката PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, Полимеразна верижна реакција-полиморфизам по должината на рестрикциските фрагменти) се изврши во Лабораторијата за молекуларна биологија (Институт за биологија, Природно-математички факултет, Скопје) во периодот од февруари 2004 до декември 2005 година.

Според критериумите за селекција на случаите од статистичката анализа беа исклучени пациентките со претходен оперативен третман на цервиксот (конизација) или ласер-вапоризација, примероци кои се повторуваа заради контрола и следење на истите, како и примероци со деградирана ДНК. Статистичката анализа се изведе на 4421 примерок.

Цитолошките резултати беа класифицирани според ревидираната Bethesda-класификација (Zerat, 2002, Solomon и сор. 2002) [6,7] како: нормална цитологија, бенигни лезии, сомнителни плочес-ти и жлездени клетки (Atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS i Atypical glandular cells, AGC), плочести интраепителијални лезии од низок степен (low grade squamous cell intraepithelial lesion, LSIL) и плочести интраепителијални лезии од висок степен (high grade squamous cell intraepithelial lesion, HSIL). Кај поголемиот дел од пациентки со LSIL и HSIL беше изведен колпоскопски преглед и цервикална биопсија.

Според морфологијата детерминирана во биопсичните примероци, цервикалните лезии се категоризирани како: бенигни лезии, лезии со продуктивна ХПВ-инфекција и лесна дисплазија, вистински прекурсорни лезии (умерена и тешка дисплазија и *in situ* карцином) и инвазивни карциноми. Во зависност од дијагнозата на пациентките, истите беа поделени во две подгрупи и тоа: пациентки само со цитолошка дијагноза и пациентки со хистопатолошка дијагноза.

**Изолација на ДНК**

Цервикалните клетки беа колектирани со користење на cytobrush и доста-вувани во 3 ml на ТБС (Tris-пуфериран раствор) кој содржеше антифугални и антибактериски реагенси. Вкупната ДНК беше екстрахирана со натриумхлорид/хлороформ проследена со етанол-преципитација (Miller и сор. 1988; Gemmell и Akiyama, 1996) [8,9.]. За евалуација на квалитетот на изолираната ДНК се амплифицираше 536 bp (*base pair*, базен пар) фрагмент од  $\beta$ -глобинскиот ген со користење на прајмерските парови KM29, 5' - GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG - 3' и RS42, 5' - GCTCACTCAGTGTGGCAAAG - 3'.

**PCR** (*Polymerase Chain Reaction*, Полимеразна ве-

рижна реакција) амплификација.

Вирусната ДНК беше амплифицирана со користење на PCR консенсус прајмерски пар MY09, 5' - CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC - 3' и MY11, 5' - GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG - 3' (M=A или C; R=G или A; W=A или T; Y=T или C). Овој прајмерски пар овозможува амплифицирање на 450 bp фрагмент од L1 генот (Jacobs и сор. 1997) [10]. PCR-реакцијата беше изведена во 20  $\mu$ l волумен (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCL, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M од секој дезоксирибонуклеотид трифосфат, 0,75  $\mu$ M од секој прајмер, 0,0375 U на Taq DNA polimeraza (Sigma-Aldrich), и ДНК примерокот ( $\approx$ 50-300 ng).

**Табела 1.** Дистрибуција на ХПВ- според возрастната структура кај 1253 пациентки со цервикални лезии

	В		Г		Вкупно:				
					Бр.	%			
ХПВ- 6	4	8	3	6	3	1	1	26	2.1
ХПВ- 11		8	3	9	6	1	2	29	2.3
ХПВ- 16	6	62	95	88	59	52	23	402	32.1
ХПВ- 18	3	18	29	20	26	23	2	124	9.9
ХПВ- 26		1		1		1	3	6	0.5
ХПВ- 31	2	28	49	28	28	18	17	176	14.0
ХПВ- 33	1	6	14	5	9	4	2	42	3.4
ХПВ- 35		7	3	1	1	3	1	18	1.4
ХПВ- 39	1	2	3	2				8	0.6
ХПВ- 42			2		1		1	4	0.3
ХПВ- 43			1			1		2	0.2
ХПВ- 44			1		1			2	0.2
ХПВ- 45		7	13	3	12	4	2	42	3.4
ХПВ- 51		1	3	1		1		6	0.5
ХПВ- 52		1	2	1		1	1	6	0.5
ХПВ- 53	5	29	25	33	25	18	14	158	12.6
ХПВ- 54			1	1	1	1		4	0.3
ХПВ- 55	1	1	2	2	2			8	0.6
ХПВ- 56	1	5	6	1	2	3		18	1.4
ХПВ- 58		12	16	13	9	9	2	63	5.0
ХПВ- 59		2	1		1		1	5	0.4
ХПВ- 61		1	5	3	2		1	13	1.0
ХПВ- 62			2	1			1	4	0.3
ХПВ- 66		1	7	2			1	12	1.0
ХПВ- 67			1					1	0.1
ХПВ- 68		4	4	2				10	0.8
ХПВ- 72				1			1	2	0.2
ХПВ- 73		5		1	1	1	1	9	0.7
ХПВ- 81		3	2	1	1	1	1	9	0.7
ХПВ- 82		1		1	1	1		3	0.2
MM4				1		1		2	0.2
MM7		1		1				2	0.2
MM8		6	7	2	3	4		2	1.7
MM9		2	2			1	2	7	0.6
IS039		1		3	1			5	0.4
CP6108			1	1				2	0.2
CP8304					1		1	2	0.2
<b>Вкупно:</b>	<b>20</b>	<b>219</b>	<b>308</b>	<b>232</b>	<b>198</b>	<b>151</b>	<b>71</b>	<b>1253</b>	<b>100</b>

PCR-реакцијата се изведе со иницијална денатурација на 94°C со времетраење од 2 мин., прос-

ледено со 35 циклуси на: денатурација на 94°C со времетраење од 30 сек., анилирање 55°C од

1 мин., екстензија 72°C од 1,5 мин. и терминална екстензија на 72°C од 3 мин. (GeneAmp PCR system 2400 термосајклер). PCR-продуктите беа анализирани на агарозна гел-електрофореза со користење на етидиум бромид. Сите PCR-реакции се изведуваа под строги лабораториски услови со цел да се минимизира можноста од молекуларна контаминација (Roux, 1995). Во секоја тестирана серија беше вклучувана и позитивна контрола (HPV--TM, 63 bp, TaKaRa, Japan) и негативна контрола (сите PCR-реагенси освен ДНК-примерокот).

**ХПВ-типизација.** ХПВ-типовите беа идентификувани со техниката полиморфизам по должината на рестрикциските фрагменти (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) со користење на рестрикциските ендонуклеази *RsaI*, *HaeIII* и *PstI*, со што се овозможува детекција на повеќе од 40 генитални ХПВ-типови. Дигестивата се одвиваше 3 часа во финален волумен од 20 µl за секој ензим (15 µl од дигестиската мешавина и 5 µl од амплифицираната ДНК).

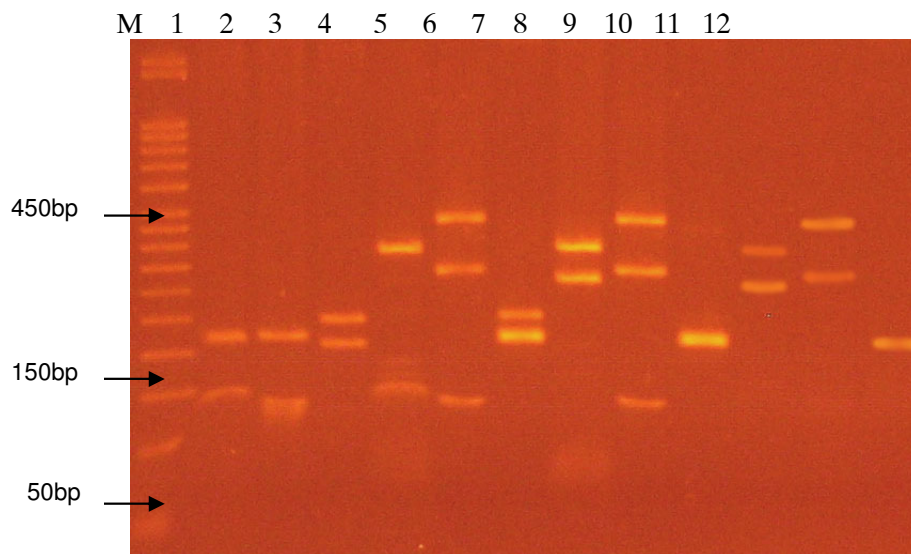
**Статистичка анализа.** За статистичка анализа

беа користени непараметриските анализи во StatSoft's Statistica v. 6.0 (chi-квадрат тест). Статистички значајни се сметаа податоците кај кои  $p$  вредноста беше  $<0,05$ .

## Резултати

### Преваленција на ХПВ-инфекции

Во оваа студија беа анализирани вкупно 6988 примероци. По исклучувањето на примероците кои се повторуваа и тие што имаа деградирана ДНК, вкупно 4421 пациент беше вклучен во статистичката анализа. ХПВ-инфекцијата беше детектирана кај 1819 (41,14%) примероци, од кои кај 1253 беше изведена типизација. ХПВ беше детектирана, но не и типизирана кај 567 примероци заради слабот електрофоретски сигнал. Најфреквентни ХПВ-типови по опаѓачки редослед беа: HPV- 16 (32,1%), 31 (14%), 53 (12,6%), 18 (9,9%), 58 (5%), итн. (Табела 1).



Сл. 1. РФЛП анализа на единечна и мешана ХПВ-инфекција.

Легенда: Ознака М, 50bp ДНК маркер; ознаки 1-3: ХПВ- 11; ознаки 4-6: ХПВ- 18/31; ознаки 7-9 и ознаки 10-12: ХПВ- 16/31 сите дигестирани со *RsaI*, *HaeIII* и *PstI*, соодветно

### Мултиплици ХПВ-инфекции

Мешани инфекции беа најдени кај 169 (13%) од вкупно 1253 типизирани примероци. Комбинација од два нискоризични ХПВ-типови беше детектирана кај 4,7% (8/169) примероци, комбинација од ниско- и високоризичен тип кај 26% (44/169) и комбинација само на високоризични типови кај 69,2 (117/169) примероци (Слика 1). Мултипли инфекции со три ХПВ-типови беа детектирани кај 3 пациентки. Најчеста комби-

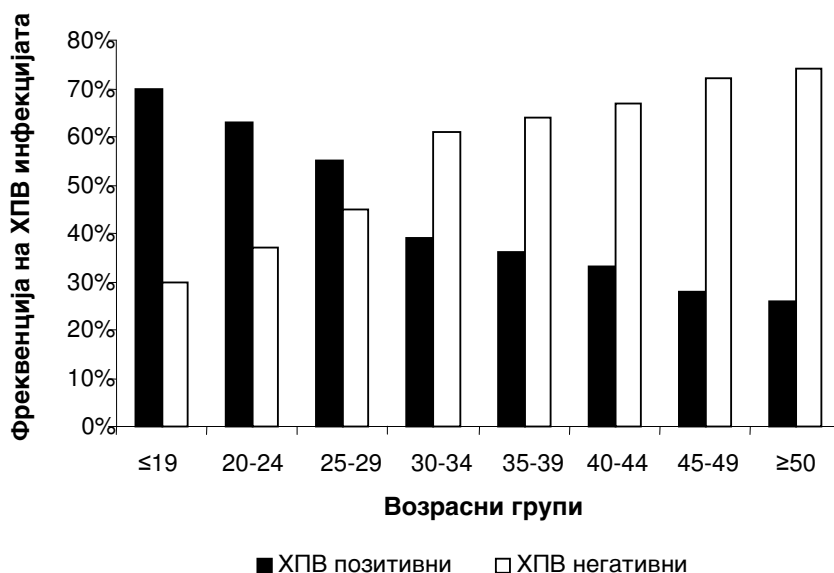
нација беше ХПВ- 16 и ХПВ- 31 (9,2%). Не постоеше статистичка корелација меѓу мултиплици инфекции и хистопатолошките дијагнози ( $\chi^2=0,51$ ;  $p=0,4772$ ).

### ХПВ-инфекција и возраст

Просечната возраст на испитуваните пациентки беше  $35,4 \pm 9,12$  (распон од 13-72 години). Инциденцијата на вирусната инфекција изнесуваше: 70% (30/43) кај пациентки до 19 години;

63% (293/463) од 20-24 години; 55% (432/779) од 25-29 години; 39% (337/870) од 30-34 години; 36% (306/851) од 35-39 години; 33% (223/680) од

40-44 години; 28% (116/417) од 45-49 години; 26% (82/318) кај пациентки постари од 49 години (Слика 2).



Слика 2. Фреквенција на ХПВ- инфекцијата според возрасните групи кај 4421 испитаник

### Цервикална дијагноза и ХПВ- инфекција

Дистрибуцијата на ХПВ-инфекцијата во однос на цервикалната дијагноза е прикажана во табела 2.

Кај пациентките со цитолошка дијагноза е детектиран драстично повисок процент (71%) на ХПВ-инфекција кај HSIL-лезиите, во споредба со 23% кај LSIL-лезиите.

Според анализата на примероците со прекурсорни лезии, детектиран е пораст на ХПВ-инфекцијата паралелно со зголемување на хистопатолошкиот градус. Најнизок процент 51% (n=539) имаше кај продуктивната ХПВ-инфекција и лесната дисплазија, со постепено зголемување на 75% (n=303) кај умерената, достигнувајќи 91% (n=186) кај тешката дисплазија и 93% (n=78) кај *in situ* карциномите. Статистичката анализа покажа значајна корелација меѓу ХПВ-инфекцијата и хистопатолошкиот степен на цервикална лезија (p<0,001).

### Дискусија

Цервикалниот карцином има различна географска дистрибуција со највисока инциденција во земјите во развој (Ferlay и сор. 2001; Parkin и

сор. 1999) [12,13]. Имплементацијата на организирани скрининг-програми засновани на цервикалната цитологија се очекува значајно да го намали бројот на смртните случаи во овие земји како резултат на ова заболување (Franco и сор. 1999) [14]. Раната детекција и третманот на прекурсорните лезии може да бидат клучни во превенцијата на цервикалниот карцином (Vrtacnik и сор. 2005) [15].

Во зависност од испитуваната популација и користениот метод, фреквенцијата на онкогените ХПВ-типови во различни цервикални лезии значително варира (Dybikowska и сор. 2002) [16]. Во оваа студија, ХПВ-преваленцијата корелира со претходно објавените студии (Zhao и сор. 2008; Кјаег и сор. 2008; Самага и сор. 2003) [17-19]. ХПВ-16 беше најчестиот генотип во сите анализирани групи (n=402; 32,1%). Покрај ХПВ-16, другите најзастапени типови беа ХПВ-31 (n=176; 14%), ХПВ-53 (n=158; 12,6%), ХПВ-18 (n=124; 9,9%).

Во студијата на Дувлис, работена на група пациенти со цервикална патологија од Р Македонија, е детектирана следнава дистрибуција на најзастапени ХПВ-типови: ХПВ-16 со 27,5%,

ХПВ-31 со 13,1%, ХПВ-66 варијанта со 10,3%, ХПВ-6 со 9,4%, ХПВ-18 со 8,4% итн. од вкупно 320 типизации. HPV- 53 се наоѓа на осмото место со 3,1% (Дувлис, 2000) [20]. **Табела 2.** Преваленција на ХПВ- инфекцијата според цитолошките и хистопатолошките верифицирани дијагнози на грлото на матката

Дијагноза	Бр.	Преваленција на ХПВ- %					
		ХПВ- негативни бр (%)	ХПВ- позитивни бр (%)	нискоризичен ХПВ - бр (%)	високоризичен ХПВ - бр (%)	мултипли ХПВ - бр (%)	нетипизиран ХПВ - бр (%)
<b>Цитологија</b>							
Нормален наод	27	21 (77.8)	6 (22.2)	0	2 (100)	0	4 (66.0)
Бенигни промени	294	244 (82.9)	50 (17.1)	6 (22.2)	21 (77.8)	2 (5.4)	23 (46.0)
ASCUS	45	35 (77.8)	10 (22.2)	1 (20.0)	4 (40.0)	1 (2.7)	5 (50.0)
LSIL	1883	1450 (77.0)	433 (23.0)	42 (18.9)	180 (81.1)	28 (75.7)	211 (48.7)
HSIL	82	24 (29.3)	58 (70.7)	3 (10.0)	27 (90.0)	6 (16.2)	28 (48.2)
<i>Вкујно</i>	2331	1774 (76.1)	557 (23.9)	52 (18.1)	234 (81.9)	37 (12.9)	271 (48.6)
<b>Хистологија</b>							
Бенигни промени	330	183 (55.0)	147 (45.0)	9 (11.7)	68 (88.3)	13 (16.9)	70 (47.6)
ХПВ- инфекција и/или лесна дисплазија	1055	516 (49.0)	539 (51.0)	48 (12.8)	327 (87.2)	51 (13.6)	164 (30.4)
Средна дисплазија	404	10 (25.0)	303 (75.0)	13 (5.0)	245 (95.0)	33 (12.8)	45 (14.8)
Тешка дисплазија	205	19 (9.0)	186 (91.0)	3 (1.7)	169 (98.3)	26 (15.1)	14 (7.5)
<i>In situ</i> карцином	84	6 (7.0)	78 (94.0)	1 (1.3)	74 (98.7)	9 (12.0)	3 (3.8)
Инвазивни карциноми	12	3 (25.0)	9 (75.0)	1 (11.1)	8 (89.9)	0	0
<i>Вкујно:</i>	2090	828 (39.6)	1262 (60.4)	75 (7.8)	891 (92.2)	132 (13.6)	296 (23.4)

**Легенда:** ASCUS, атипични плочести клетки со недетерминирано значење; Високоризичен ХПВ- (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, IS039, MM4, MM7, MM9); LSIL, плочеста интраепителна лезија од низок степен; Нискоризичен ХПВ- (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 70, 71, 72, 81, CP6108); HSIL, плочеста интраепителна лезија од висок степен.

Во Истражувачкиот центар за генетско инженерство и биотехнологија при Македонската академија на науките и уметностите каде е направена и претходната студија на Дувлис, објавена е анализа на 17 000 примероци за последниве 9 години со следнава ХПВ- дистрибуција: ХПВ-16 со 12,7% (n=292), ХПВ-31 со 7.2% (n=166), ХПВ-58 со 4,5% (n=104), ХПВ-53 со 4.2% (n=96), ХПВ-6 со 3,6% (n=82), ХПВ- 18 со 3,1% (n=70) итн. од 1204 типизирани пациентки (МАНУ, 2008) [21]. И во трите студии слична е дистрибуцијата на ХПВ- 16 и ХПВ- 31, но има одредени отстапувања околу дистрибуцијата на останатите најчести ХПВ-типови. Ваквите разлики работени на слична популација на пациентки во нашата земја може да се должат на различниот методолошки пристап за детекција и типизација на овој вирус.

Во однос на цитолошките дијагнози, драстично повисок степен на ХПВ е детектиран кај HSIL-лезииите со споредба со пониските цитолошки степени што е во согласност и со други објавени податоци (Gonzalez-Bosquet и сор. 2006; Bergeron и сор. 2006) [22,23].

Во групата на пациентки со верифицирани хистопатолошки наоди се детектирани 60% на ХПВ-позитивни пациентки. Регистрирана е значајна корелација меѓу ХПВ- инфекцијата и хистопатолошкиот наод. Во групата на прекурсорни лезии беше детектирано зголемување на процентот на вирусната инфекција, паралелно со зголемување на хистопатолошкиот градус. Ваквиот искучително висок процент на ХПВ-инфекција во прекурсорните лезии на цервиксот, особено кај тешката дисплазија и *in situ* карциномот со над 90%, корелира со досега објавените податоци во литературата (Zhao и сор. 2008; Iwasawa и сор. 1996) [17,24]. Во студијата на Soltar и сор. застапеноста на ХПВ-инфекцијата изнесувала 66,8% кај лесната дисплазија, кај средната 93,3% и 97,9% кај тешката дисплазија (Soltar, 2004) [25].

Високиот процент на ХПВ- инфекцијата кај тешката дисплазија и *in situ* карциномот уште еднаш ја потврдува големата асоцираност на оваа инфекција со развојот на прекурсорните лезии и инвазивните карциноми. Високиот процент на ХПВ-16 со 57,4% кај тешката дисплази-

ја и 68% кај *in situ* карциномот во споредба со другите високоризични типови кои беа застапени со околу 10%, го издвојува HPV-16 како високоризичен тип со најголем онкоген потенцијал.

Преваленцијата на мешаните инфекции варира во различни студии (Kovacs и сор. 2008; Vrtacnik и сор. 2005) [26,15]. Споредувањето на резултатите е тешко поради користењето на различни методолошки пристапи. Во најголем дел од студиите користена е PCR-RFLP техниката за детекција на мешаните инфекции. Но, во одредени случаи, присуството на повеќе од два типа може да доведе до преклопување на мултипните електрофоретски бандови и до отежнатата интерпретација на резултатите. Можноста за идентификација на мешаните ХПВ- типови најверојатно е зависна од почетната концентрација на вирусната ДНК, како и ефикасноста на амплифицирањето. Nuovo истакнува дека во мултипните инфекции само еден ХПВ- тип е доминантен, а останатите се контаминанти, присутни со послаба концентрација. (Nuovo, 1991) [27]. Со користење на ткивни биопсии би можеле да се добијат поефикасна амплификација и супсеквентно појасни бандови, како резултат на повисоката концентрација на ДНК, во споредба со истата изолирана од cytobrush примероците.

Во оваа студија највисока фреквенција на ХПВ-инфекцијата беше најдена кај групата пациентки под 20 години (70% од 43 анализирани примероци), додека најниска фреквенција беше детектирана кај пациентките над 49 години (26% од вкупно 318). Постои реверзна корелација меѓу ХПВ-инфекцијата и возраста на пациентките што е во согласност со резултатите од некои претходно објавени студии (Monsonogo и сор. 2005) [28]. Спротивно на бифазната дистрибуција на ХПВ-инфекцијата во други студии (Boring и сор. 1994; Pisani и сор. 2002) [29,30], во оваа студија највисоката фреквенција на ХПВ-инфекцијата беше детектирана кај најмладата испитувана група, проследено со градуелно опаѓање на возрастните групи. Широкиот распон на возраста на пациентките (од 13-75 години) може да се објасни со сексуалното однесување на младата популација (промискуитетот), споредено со поконзервативното однесување на повозрастните жени во Македонија.

## Заклучок

Високата фреквенција на ХПВ-инфекцијата во Македонија, како и високата инциденција на цервикален карцином, укажува на фактот дека е потребна итна стратегија за намалување на

ХПВ-инфекцијата и стапката на смртност од цервикален карцином. Недостатокот на информации, сексуалната слобода на младата популација и променетиот стил на живеење придонесуваат за зголемен ризик од развој на прекурсорни цервикални лезии. Од друга страна, географската положба на Македонија како транзитна земја, турбулентната политичка ситуација и присуството на странски воени формации во минатиот период, придонесоа за зголемување на можноста од инфекции со нови или егзотични типови, некарактеристични за овој регион. Ваквите податоци за преваленцијата и дистрибуцијата на ХПВ-типовите во Македонија е навистина важна за имплементација на организирани скрининг-програми и гинеколошки доктрини базирани на докази. Според овие резултати сосема е оправдано мислењето за вклучување на ХПВ-анализата како дополнување на примарното скринирање, особено во тријажата на пациентките со абнормални цитолошки промени. Несомнено е дека цитологијата и понатаму останува основен метод за скринирање, селекција и следење на пациентките, а хистопатологијата „златен стандард“ за верификација на дијагнозите, но со вклучување на молекуларните ХПВ-тестови ќе се овозможи правилно селектирање на пациентките со зголемен ризик за развој на прекурсорните лезии и инвазивни цервикални карциноми. Резултатите од оваа студија може да бидат корисни за национална стратегија против цервикалниот карцином. Се смета дека воведувањето на вакцината против ХПВ и во нашата земја драстично ќе го намали бројот на заболени од цервикален карцином во иднина.

*Конфликт на интереси.* Не е декларирани.

## Литература

1. deVilliers EM. Human pathogenic papillomavirus types. an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 1-12.
2. Pfister H. Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1984; 99: 111-81.
3. Chan P, Mak KH, Cheung J *et al.* Genotype spectrum of cervical human papillomavirus infection among sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong. *J Med Virol* 2002; 68: 273-7.
4. Munoz N, Bosch FX, Sanjose S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
5. Registar za rak vo Makedonija. Republički zavod za zdravstvena zaštita - JZO - Skopje. 2005; 26.
6. Zerat L. La nouvelle terminologie de Bethesda: quels changements? *La Revue du Praticien Gynécologie et Obstétrique. Numéro Spécial* 2002; 3-10.
7. Solomon D, Davey D, Kurman R *et al.* The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-19.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

- Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
9. Gemmell NJ, Akiyama S. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends Genet* 1996;12: 338-9.
  10. Jacobs MV, Snijders PJ, van der Brule AJ *et al.* A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scraping. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 791-5.
  11. Roux KN. Optimization and troubleshooting in PCR. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS, editors. PCR Primer. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1995. p 53-62.
  12. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC cancer base No. 5. Lyon. IARC Press. 2001.
  13. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-41.
  14. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180: 1415-23.
  15. Vrtacnik Bokal E, Rakar S, Mozina A, Poljak M. Human papillomavirus in relation to mild dyskaryosis in conventional cervical cytology. *Eur J Gynaec Oncol* 2005; 60: 7-12.
  16. Dybikowska A, Licznarski P, Podhajaska A. HPV- detection in cervical cancer patients in northern Poland. *Oncol Rep* 2002; 9: 871-4.
  17. Zhao Y, Lin H, Shen D, Xuan Y, Lin Z. Distribution of HPV-genotypes in uterine cervical lesions in Yanbian, northern China. *Pathol Int* 2008; 58: 643-7.
  18. Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C *et al.* Population-based prevalence, type-and age-specific distribution of HPV- in women before introduction of an HPV--vaccination program in Denmark. *Int J Cancer* 2008; 123: 1864-70.
  19. Camara G, Cerqueira D, Oliveira A, Silva E, Carvalho L *et al.* Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2003; 98: 879-83.
  20. Дувлис С. Генотипизација на хуман папилома вирус (ХПВ) кај женската популација во Република Македонија. Магистерски труд. Универзитски Св. Кирил и Методиј, Интердисциплинарни постдипломски студии по молекуларна биологија и генетско инженерство, Скопје. 2000.
  21. Македонска академија на науките и уметностите. Хуман рапилома вирус инфекција во Р. Македонија. Свеска 54 Свечен собир 2008, 53-5.
  22. Gonzalez SL, Strelau M, He X, Basile JR, Munger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 2001; 75: 7583-91.
  23. Bergeron C, Cas F, Fagnani F, Didailler-Lambert F, Poveda JD. Human papillomavirus testing with a liquid-based system: feasibility and comparison with reference diagnoses. *Acta Cytol* 2006; 50: 16-22.
  24. Iwasaga A, Nieminen P, Lehtinen M, Pavonen J. Human pipillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by the polymerase chain reaction. *Cancer* 1996; 77: 2275-9.
  25. Soltar K, Diemer D, Dethleffs Hack Y *et al.* Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *JCM* 2004; 42: 3176-84.
  26. Kovacs K, Varnai AD, Bollmann M *et al.* Prevalence and genotype distribution of multiple human papillomavirus infection in the uterine cervix: a 7.5-year longitudinal study in a routine cytology-based screening population in West Germany. *J Med Virol* 2008; 80: 1814-23.
  27. Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CC, Bromley SE. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. Analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1991;138: 53-8.
  28. Monsonego J, Bohbot J, Pollini G *et al.* Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV-) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in woman with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 160-8.
  29. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montqomery S. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1994; 44: 7-26.
  30. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Ins J Cancer* 2002; 97: 72-81.