

# 9<sup>ο</sup>

Πανελλήνιο Συνέδριο  
Κλινικής Χημείας

## Κλινικό Φροντιστήριο

Η Μοριακή Διαγνωστική  
στο Σύγχρονο Κλινικό Εργαστήριο



Αθήνα,  
7 · 8 · 9  
Οκτωβρίου **2010**  
Κέντρο Τεχνών στο ACS



**ΕΕΚΧ-ΚΒ**

Ελληνική Εταιρία Κλινικής Χημείας - Κλινικής Βιοχημείας

# Συγγραφείς

## **Χ. Κρούπης**

MSc, PhD, EurClinChem, Λέκτορας Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Π.Γ.Ν «Αττικόν»,  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

## **Μ. Γαροφαλάκη**

Αιματολογικό Εργαστήριο, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»

## **Δ. Παρασκευής**

Λέκτορας Επιδημιολογίας και Προληπτικής Ιατρικής, Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Ρετροϊών,  
Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, Ιατρική Σχολή,  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

## **Ε. Σ. Λιανίδου**

PhD, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

# Περιεχόμενα

<b>Μοριακή ανίχνευση DNA/RNA/πρωτεϊνών του ίου των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) .....</b>	<b>7</b>
Γονιδιακή δομή ιού HPV .....	8
Μηχανισμοί HPV μόλυνσης .....	9
Κλινική σημασία και αξιολόγηση της λοίμωξης από τον ιό HPV στον τράχηλο της μήτρας .....	12
Μοριακή ανίχνευση DNA/RNA/πρωτεϊνών HPV ιού .....	16
Βιβλιογραφία.....	20
<b>Η μοριακή διαγνωστική στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες .....</b>	<b>23</b>
Αντιμεταθέσεις: Δημιουργία υβριδικών γονιδίων.....	23
Το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, bcr-abl .....	25
Υβριδικά γονίδια στις ΟΜΛ .....	28
Υβριδικά γονίδια στις ΟΛΛ .....	29
Ανίχνευση της t(12;21) .....	29
Αντιμεταθέσεις: Ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων .....	29
Ενεργοποίηση του BCL2 με την t(14;18).....	30
Αναδιατάξεις του αντιγονικού υποδοχέα .....	31
Ανίχνευση του Χιμαιρισμού .....	33
Άλλοι μοριακοί δείκτες .....	35
Βιβλιογραφία.....	36
<b>Μοριακή διάγνωση και HIV λοίμωξη: Ο ρόλος του σύγχρονου κλινικού εργαστηρίου.....</b>	<b>38</b>
<b>Ανάλυση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών με υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (High-Resolution Melting Curve Analysis, HRMA) ....</b>	<b>39</b>
1. Εισαγωγή .....	39
2. High Resolution Melting Analysis (HRMA) .....	40
3. Οργανολογία HRMA .....	42
Παράμετροι που επηρεάζουν τη διακριτικότητα .....	42
Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	42
Χρήση χρωστικών.....	43
4. Βιβλιογραφία .....	45

## ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DNA/RNA/ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV)

Χ. Κρούπης

*MSc, PhD, EurClinChem, Λέκτορας Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Π.Γ.Ν «Αττικόν», Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών*

Η τεκμηριωμένη ανακάλυψη πριν από 30 χρόνια ότι ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV, human papilloma virus) συσχετίζεται με τα κονδυλώματα και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έκανε ένα εντυπωσιακό ταξίδι στη διεθνή επιστημονική κοινότητα με πολλές αμφισβητήσεις αρχικά και αναγνώριση στο τέλος με την απονομή του βραβείου Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας το 2008 στον καθηγητή Harald zur Hausen [1;2].

Ο ιός HPV με τη μεγάλη του εξάπλωση τα τελευταία χρόνια αποτελεί πλέον τον νούμερο 2 περιβαλλοντικό κίνδυνο για καρκίνο στον άνθρωπο μετά τον καπνό του τσιγάρου. Με σημερινά δεδομένα είναι υπεύθυνος για το 5% του καρκίνου συνολικά και του 10% του καρκίνου στις γυναίκες. Το ποσοστό αυτό είναι σημαντικά πιο μεγάλο στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου μάλιστα αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το 2050 λόγω της αύξησης του πληθυσμού και της αύξησης του προσδόκιμου της ζωής. Ελπίζεται ότι με την έλευση των προφυλακτικών HPV εμβολίων η παραπάνω πρόβλεψη δεν θα πραγματοποιηθεί τελικά και η πορεία της λοίμωξης αυτής θα ακολουθήσει αυτήν της ηπατίτιδας Β.

Ο επιθηλιοτρόπος ιός **HPV (Human Papilloma Virus)** αποτελείται από μικρό δίκλωνο κυκλικό DNA (~8 Kb) και εικοσαεδρικό καψίδιο αποτελούμενο από 72 καψομερίδια. Είναι μικρού μεγέθους (55 nm) και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μοιάζει με μπαλάκι του γκόλφ [3]. Έως τώρα έχουν ταξινομηθεί σε 16 γένη (α-π), τα γένη σε πολλά είδη (species) και στα είδη, έως τώρα, έχουν αναγνωρισθεί τουλάχιστον διαφορετικοί 128 γονότυποι (106 human) που μαζί με τους υπότυπους (διαφέρουν κατά 2-10% στη DNA ακολουθία) και τις παραλλαγές (διαφέρουν <2%) φθάνουν τους 200 [1;4].

Οι HPV γονότυποι διαιρούνται σε δύο κατηγορίες αναλόγως των κυττάρων που μολύνουν: **α) δερματικοί (cutaneous)**, όταν προσβάλλουν την επιδερμίδα των ποδιών και των χεριών και προκαλούν συνηθέστερα μυρμηγκιές (αλλά και σπανιότερα επιδερμοδυσπλασία, πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος και μελάνωμα) και **β) βλεννογονικοί (mucosal)**, όταν προσβάλλουν κυρίως ζώνες μετάπλασης (transformation zone) μεταξύ πλακώδους (squamous) και αδενικού ή κυλινδρικού (columnar) επιθηλίου π.χ. όπως των γεννητικών περιοχών και των δύο φύλων σχεδόν αποκλειστικά μέσω σεξουαλικής επαφής. Έχει υπολογιστεί ότι οι μολύνσεις με αυτούς τους βλεννογονικούς HPV τύπους μπορεί και να προσβάλλουν έως και 370 εκατομμύρια άτομα ανά έτος -ωστόσο στη μεγάλη τους πλειοψηφία είναι ασυμπτωματικές (300 εκατομμύρια)-. Μπορούν όμως να προκαλέσουν και τα ενοχλητικά μεν αλλά καλοήγη δε κονδυλώματα (ή θηλώματα, εξ' ου και η ονομασία του ιού) σε 30 εκατομμύρια άτομα και δυνητικά

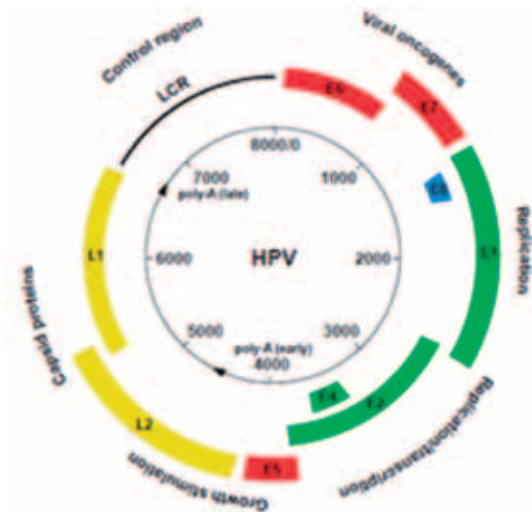
επικίνδυνες προκαρκινικές αλλοιώσεις σε περίπου 40 εκατομμύρια. Αυτές και ειδικά οι υψηλού βαθμού προκαρκινικές αλλοιώσεις πρέπει να αντιμετωπισθούν είτε από τον ίδιο τον ανθρώπινο οργανισμό είτε θεραπευτικά, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε **καρκίνο του τραχήλου της μήτρας** σε ένα πολύ μικρό ποσοστό επί του συνόλου των μολυνθέντων- 0,14%, συνεπώς σε περίπου 0,5 εκατομμύριο γυναίκες- [X. Bosch, 25<sup>th</sup> International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden]!

Οι **καρκίνοι** που αποδίδονται στον σεξουαλικά μεταδιδόμενο ιό HPV και καταγράφηκαν το 2002 ήταν συνολικά 560.000 περίπου και στα δύο φύλα με τη μεγάλη πλειοψηφία να είναι καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (493.000) στις γυναίκες (κατά 85% πλακώδες καρκίνωμα αλλά και 15% αδenoκαρκίνωμα). Γι' αυτό το νόσημα, στο HPV αποδίδεται τουλάχιστον το 95-98% των περιστατικών. Ωστόσο, στο HPV αποδίδονται ακόμη 90% των περιστατικών καρκίνου του κόλπου και 30-35% των περιστατικών καρκίνου του αιδοίου στις γυναίκες (συνολικά τα αποδιδόμενα περιστατικά ήταν 16.000) και το 50% των καρκίνων του πέους στους άνδρες (10.000 περιστατικά). Επίσης και στα δύο φύλα, το 80% του καρκίνου του πρωκτού (27.000 περιστατικά) και ένα σημαντικό ποσοστό ίσως και 25-35% του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας και του φάρυγγα/λάρυγγα/οισοφάγου (συνολικά 14.000 περιστατικά)[5] αποδίδεται στον ιό HPV. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι ενέχεται στα επαναλαμβανόμενα θηλώματα στον λάρυγγα (κυρίως σε νεογνά κατά τη γέννησή τους από HPV θετικές μητέρες) και πιθανολογείται επίσης και η συμμετοχή του HPV ιού και σε άλλα καρκινώματα όπως π.χ. μαστού, πνεύμονα κ.λπ. [6,7].

## Γονιδιακή δομή ιού HPV

Το **HPV γονιδίωμα** αναλόγως του τύπου παρουσιάζει 8-10 ORFs (open reading frames)[1], ωστόσο σε όλους τους τύπους θα μπορούσε να χωρισθεί σε τρεις περιοχές (Εικόνα 1):

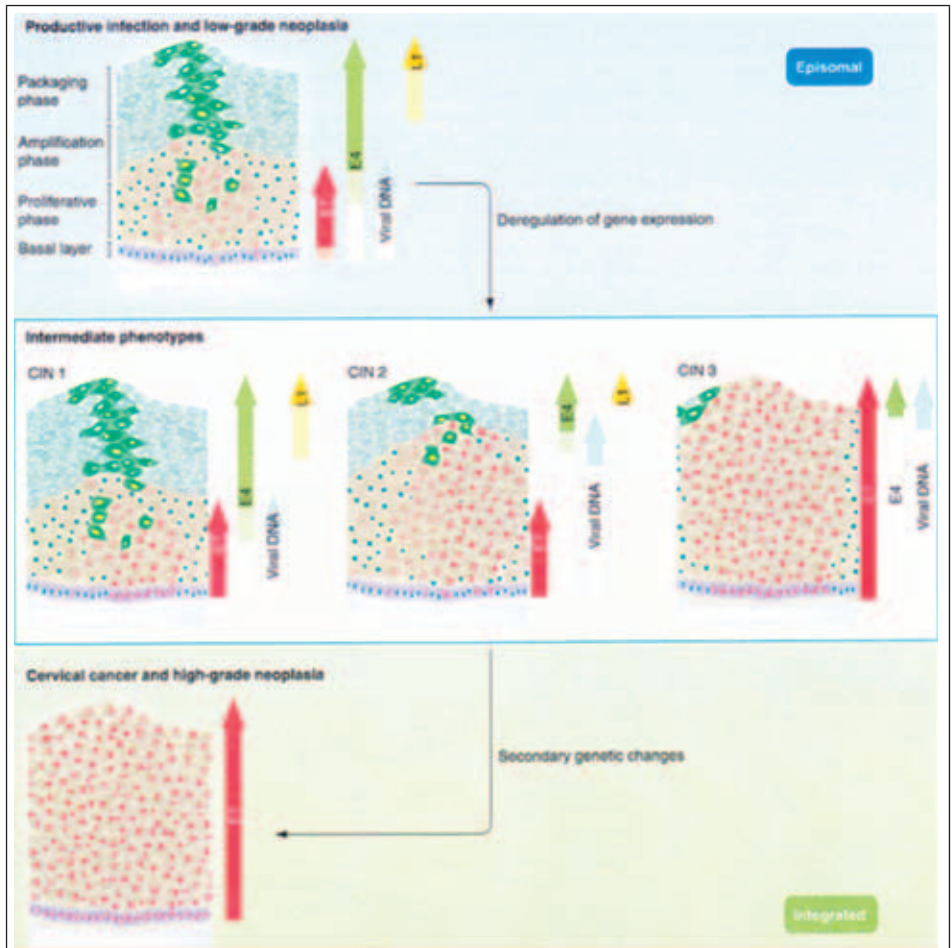
- α) Τη μη κωδικοποιούσα άνω ρυθμιστική περιοχή URR (Upstream Regulatory Region) ή αλλιώς LCR (Long Control Region) με περιοχές ori, p<sub>E</sub> υποκινητή, 4 περιοχές δέσμευσης για E2 και τουλάχιστον 20 περιοχές δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή.
- β) Την πρώιμη (early) περιοχή, η οποία κωδικοποιεί τις ιικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 (σε ορισμένους τύπους υπάρχουν και E3 και E8). Η E1 είναι ελικάση η οποία δεσμεύεται στην ori, ως εξαμερές και ξεκινάει την αντιγραφή του ιικού DNA. Η E2 είναι μεταγραφικός παράγων και αναστολέας του υποκινητή των E6/E7. Η E5 είναι πιθανολογούμενα ογκογονίδιο το οποίο αλληλεπιδρά με EGFR και καταστέλλει την έκφραση των MHC I/II γονιδίων του ξενιστή. Τα E6 και E7 είναι αποδεδειγμένα ογκογονίδια (βλέπε παρακάτω).
- γ) Τέλος, την όψιμη (late) περιοχή, η οποία κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου L1 (360 μόρια/καψίδιο) και L2 (12 μόρια/καψίδιο). Και η E4 είναι τελικά late πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό του ξενιστή για την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων (virions).



Εικόνα 1. Οργάνωση του HPV γονιδιώματος (από [2]).

## Μηχανισμοί HPV μόλυνσης

Οι βλεννογονικοί HPV τύποι είναι σε θέση να προκαλέσουν θηλώματα ή/και προκαρκινικές αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας με τον ακόλουθο τρόπο [8]: μέσω ενός τραύματος από τη σεξουαλική επαφή μπορεί να εισέλθει ο ιός μέσω αλληλεπίδρασης πιθανότατα της L2 με την  $\alpha_6$ -ιντεγκρίνη και με τις πρωτεογλυκάνες ηπαρίνης στη μεμβράνη των κυττάρων της κατώτερης βασικής στιβάδας του επιθηλίου και ιδιαίτερα στη ζώνη μεταπλάσεως. Πρόκειται για μια ζώνη άωρων κυττάρων επιδεχομένων ορμονικών μηνυμάτων στην αναπαραγωγική γυναίκα αλλά και με προδιάθεση σε μολύνσεις και μεταλλάξεις. Η περιοχή αυτή αποτελείται κυρίως από μαλακό και ευαίσθητο αδενικό επιθήλιο και το οποίο είναι πιο εκτεθειμένο στη νεαρή ηλικία και σιγά-σιγά υφίσταται μεταπλασία προς το πιο σκληρό και ανθεκτικό πλακώδες επιθήλιο. Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται και ο μεγάλος επιπολασμός της μόλυνσης σε αυτές τις ηλικίες. Ανάμεσά τους υπάρχουν και βλαστικά κύτταρα όπου πιθανολογείται ότι μπορεί να παραμένει ο ιός σε λανθάνουσα κατάσταση μετά την παρέλευση της μόλυνσης (εικασία-δεν έχει αποδειχθεί). Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας έχουν τη δυνατότητα να διαιρεθούν και το αναπαραγωγικό τους δυναμικό με τους μεταγραφικούς παράγοντες χρησιμοποιεί και ο ιός για την έκφραση των E πρωτεϊνών του και τον πολλαπλασιασμό του σε κυκλική επισωματική φάση και τότε κάποια από τα θυγατρικά κύτταρα μεταναστεύουν στην παραβασική στιβάδα. Στο καλλίτερο δυνατό σενάριο, η μόλυνση είναι ασυμπτωματική καθώς αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά από την κυτταρική ανοσία με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα της περιοχής (κύτταρα Langherhans) και τα T-κύτταρα.



**Εικόνα 2.** Αλλαγές στην έκφραση των ιικών γονιδίων ανάλογα με το σενάριο της HPV μόλυνσης (από [9]).

Ειδάλλως τα παραβασικά κύτταρα προσπαθούν να διαφοροποιηθούν αλλά ταυτόχρονα αναγκάζονται από τις E ιικές πρωτεΐνες να οδηγηθούν από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου με δύο συνέπειες: α) δραματική ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του ιού και β) κυτταρική υπερπλασία (κοιλοκυτταρική ατυπία, δυσκεράτωση). Οι πιο καλοήθεις HPV τύποι προκαλούν συνήθως απλά θηλώματα είτε υποκλινικά επίπεδα (flat) κονδυλώματα είτε εξωφυτικά οξυτενή κονδυλώματα (condylomata acuminata). Στη συνέχεια εάν το σενάριο είναι καλό -αυτό της παραγωγικής μόλυνσης (εικόνα 2, άνω μέρος)- τα μολυσμένα κύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται τελικά στην επόμενη ενδιάμεση στιβάδα όπου και γίνεται παραγωγή πρωτεϊνών E4, L1 και L2, συναρμολόγηση (virus assembly) και απελευθέρωση του ιού ο οποίος και οδηγείται

σε νέο κύκλο μόλυνσης άλλου ατόμου μέσω της αποπίπτουσας επιπόλης κερατινοσιβιάδας (superficial cells) και της σεξουαλικής επαφής [10;11].

Ωστόσο, κακοήθη εξαλλαγή μπορεί να συμβεί σε μόλυνση με ορισμένους HPV τύπους και κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες ή σε κατάλληλο γενετικό υπόστρωμα, ιδιαίτερα όταν υπάρξει αυξημένη μεταγραφή των ογκογονιδίων E6 και E7. Υπάρχουν λοιπόν ενδιάμεσα σενάρια όπου και υπάρχει απορύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, υπερπλασία, δυνητικά προκαρκινικές αλλοιώσεις χαμηλού ή υψηλού βαθμού στα κύτταρα αλλά και παραγωγική μόλυνση (μέσον Εικόνας 2).

Στο χειρότερο όμως δυνατόν σενάριο, ο ιός από την επισωματική μορφή ευθυγραμμίζεται μέσω διάσπασης της περιοχής E2/E4 και ενσωματώνεται στο ανθρώπινο γενωμικό DNA (εικόνα 2, κάτω μέρος), χάνεται ο έλεγχος της μεταγραφής από το κατασταλτικό γονίδιο E2 και αρχίζει η ανεξέλεγκτη μεταγραφή των E6 και E7 και η υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών τους. Παραγωγική μόλυνση σε αυτή τη περίπτωση δεν γίνεται.

Τα γονίδια **E6 και E7 των πιο επικίνδυνων HPV τύπων** από μόνα τους αποτελούν **ογκογονίδια** καθώς όταν επιμολύνουν φυσιολογικά κύτταρα επάγουν την καρκινογένεση: τα προϊόντα τους αλληλεπιδρούν και αδρανοποιούν τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 (μέσω της E6-AP και ουβικιτιλίωσης) και Rb αντίστοιχα με ταυτόχρονη απελευθέρωση του E2F μεταγραφικού παράγοντα (εικόνα 3). Συνέπεια αυτών η επαγωγή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p16/INK4A* και της τελομεράσης, η απενεργοποίηση αναστολέων των κυκλινών, η ενεργοποίηση των κυκλινών, η χρωμοσωματική αστάθεια και η ανευπλοειδία, η αποφυγή της απόπτωσης [8].



**Εικόνα 3.** Απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7 (από [12]).



## Κλινική σημασία και αξιολόγηση της λοίμωξης από τον ιό HPV στον τράχηλο της μήτρας

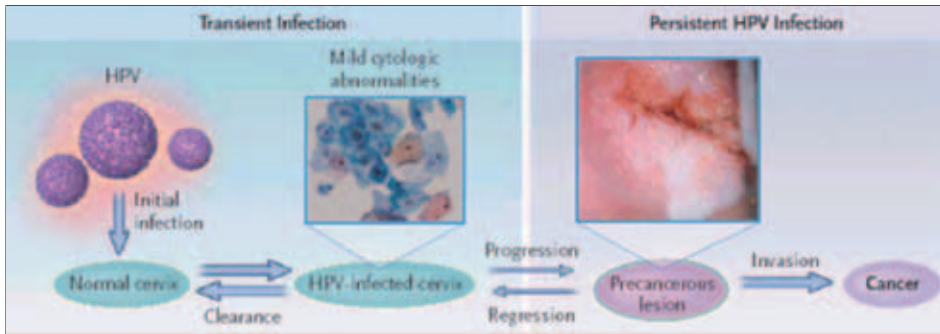
Το πιο σημαντικό μέτρο πρόληψης για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αποτελεί το **Pap test** (εκ του Γ. Παπανικολάου, βραβείο Luskier 1950) όπου λαμβάνεται κολποτραχηλικό επίχρισμα από τη γυναίκα, επιστρώνεται και μονιμοποιείται σε πλακάκι και στη συνέχεια βάφεται κυτταροχημικά και αξιολογείται μικροσκοπικά στο Κυτταρολογικό εργαστήριο. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ανιχνευθούν δυσπλαστικές κυτταρικές αλλοιώσεις *συμβατές* με λοίμωξη από τον ιό HPV όπως κοίλοκυτταρική ατυπία και δυσκεράτωση. Εξέλιξη του συμβατικού pap test αποτελεί η κυτταρολογία υγρής φάσεως (LBC, liquid-based cytology) όπου το επίχρισμα διαλυτοποιείται σε βαζάκι με ειδικό υγρό και με την οποία είναι δυνατόν με το κατάλληλο έμπειρο Κυτταρολόγο η ευαισθησία ανίχνευσης προκαρκινικών αλλοιώσεων να αυξηθεί στο 80% [Περισσότερα στο [www.labtestsonline.gr](http://www.labtestsonline.gr) στα λήμματα pap test, HPV καρκίνος τραχήλου της μήτρας]. Συνηθέστερα η HPV λοίμωξη ξεκινάει με την παρουσία στο pap test ορισμένων άτυπων πλακωδών κυττάρων αγνώστου σημασίας (ASC-US, atypical squamous cells of unknown significance, κριτήρια κατά Bethesda). Σ' αυτή την περίπτωση η Αμερικανική Εταιρεία Κολποσκόπησης και Παθολογίας του Τραχήλου της Μήτρας συστήνει **μοριακή ανίχνευση του ιού HPV** για την επιβεβαίωση ή όχι της ύπαρξης του ιού [13].

Εάν πρόκειται πράγματι για λοίμωξη από HPV, τότε σε αυτό το στάδιο αναλόγως του αποτελέσματος της **τυποποίησης του ιού HPV**, της ηλικίας (<30 ετών) και της ανοσολογικής κατάστασης της γυναίκας καθώς και άλλων συμπαραγόντων που είτε έχει αποδειχθεί ο ρόλος τους (κάπνισμα, χρήση αντισυλληπτικών, HIV συλλοίμωξη) είτε όχι και είναι υποθετικός (τρόπος ζωής, διατροφή, μεγάλος αριθμός γεννήσεων, συλλοίμωξη με χλαμύδια ή HSV2) [14] ο ιός μπορεί να καταπολεμηθεί ικανοποιητικά και η μόλυνση να είναι παροδική (transient). Οι εξετάσεις επαναλαμβάνονται μετά από 6-μηνο ή 12-μηνο και εάν η μόλυνση επιμένει (persistent), είναι δυνατόν οι κυτταρικές αλλοιώσεις να γίνουν πιο έντονες και να προχωρήσουν στο στάδιο LG-SIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion). Τότε επιβάλλεται ο **κολποσκοπικός έλεγχος** -ιδιαιτέρως στη ζώνη μετάπλασης- με τη βοήθεια διαλυμάτων που βάφουν διαφορεικά τα κύτταρα όπως το οξικό οξύ και το ιώδιο του Lugol. Εάν διαπιστώνονται βλάβες, τότε λαμβάνεται **τραχηλική βιοψία** και αποστέλλεται στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο όπου και σταδιοποιείται ιστολογικά η προκαρκινική αλλοίωση με το CIN σύστημα (Cervical Intraepithelial Neoplasia) (Εικόνα 4).

Κατά την κρίση του θεράποντος ιατρού σ' αυτό το στάδιο ή ακόμη πιο επιτακτικά εάν η ιστολογική βλάβη έχει προχωρήσει σε HG-SIL (high grade squamous intraepithelial lesion ή CIN στάδια 2 και 3), παρέχεται θεραπευτική αγωγή. Εδώ πρέπει να τονισθεί ότι ακόμη και στο CIN3 στάδιο ένα μεγάλο ποσοστό μολύνσεων υποστρέφει (~70%) ωστόσο σε αυτό το σημείο δύσκολα επιλέγεται να μην γίνει θεραπεία.

Η αγωγή μπορεί να είναι φαρμακευτική με ποδοφυλλίνη ή 5-φθοριουρακίλη ή ιμικουϊμόδη αλλά μπορεί και επεμβατική (είτε καταστροφική ηλεκτροκαυτηρίαση/

κρυσπηξία/εξάχνωση με laser είτε αφαιρετική κωνοειδή εκτομή με νυστέρι, με laser ή μέσω αγκύλης LEEP/LLETZ). Σκοπός της θεραπείας είναι να εξαλειφθεί η βλάβη και ο ιός και μακροπρόθεσμα να αποφευχθεί το καρκίνωμα *in situ* αρχικά και το διηθητικό καρκίνωμα στη συνέχεια. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας κρίνεται και από το αρνητικό αποτέλεσμα της μοριακής ανίχνευσης του ιού μετά από νέα λήψη κολποτραχηλικού υλικού.



Εικόνα 4. Κλινική πορεία λοίμωξης από HPV (από [15]).

Οι διάφοροι HPV τύποι διαθέτουν διαφορετικό ογκογενετικό δυναμικό πιθανότατα ανάλογα με την πρωτεϊνική ακολουθία των E6 και E7. Έτσι είναι δυνατή η κατάταξή τους σε ομάδες διαφορετικού κινδύνου με βάση φυλογενετικές[16] ή επιδημιολογικές παρατηρήσεις[14]:

(Σπανιότερα απαντώμενοι τύποι διεθνώς)

**Χαμηλού κινδύνου (low risk): 6, 11** (40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 72, 81, 89)

**Πιθανώς μετρίου κινδύνου:** 26\*, 53\*, 66\*, 70, 73, 82, 83, 84

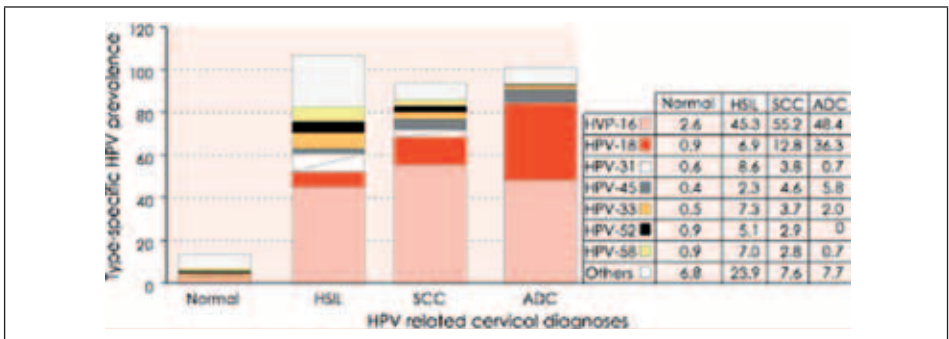
**Μετρίου/υψηλού κινδύνου:** 31, 33 (35, 39, 51, 52, 58, 59, 68)

**Υψηλού κινδύνου (high risk): 16, 18** (45, 56)

\*αμφιλεγόμενου κινδύνου στη διεθνή βιβλιογραφία

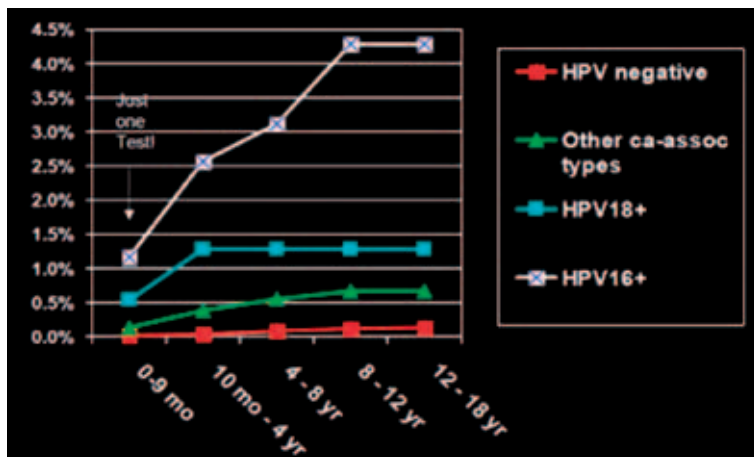
Οι χαμηλού κινδύνου HPV τύποι συσχετίζονται συνήθως με κονδυλώματα και χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (ASC-US, LG-SIL, CIN I) του τραχήλου της μήτρας ή ακόμη και με αρνητικά για δυσπλασία pap test ενώ οι μετρίου και υψηλού κινδύνου HPV τύποι ανευρίσκονται σε όλο το φάσμα των ευρημάτων. Στις υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HG-SIL, CIN2 και CIN3) και στα καρκινώματα σχεδόν αποκλειστικά ανευρίσκονται υψηλού κινδύνου τύποι. Είναι σημαντική δε η παρατήρηση ότι η μεγάλη πλειοψηφία των καρκίνων οφείλεται στους δύο υψηλού κινδύνου τύπους HPV16 και HPV 18 τόσο στα πλακώδη καρκινώματα (SCC) -περίπου 70%- όσο και στα σπανιότερα αδενοκαρκινώματα (ADC) -περίπου 85%- (Εικόνα 5). Άλλοι έξι τύποι, οι HPV 45, 31, 33, 52, 58 και 35 συμπληρώνουν το ποσοστό έως το 92% για πλακώδη καρκινώματα. Ο HPV 16 πάντως είναι η πλειοψηφία στα δύο αυτά καρκινώματα αλλά και στα υπόλοιπα που αναφέρθηκαν στην

αρχή (κόλπου, αιδοίου, πέους, πρωκτού, φάρυγγα/οισοφάγου). Ο HPV 18 έχει αυξημένο ποσοστό στα αδενοκαρκινώματα τα οποία και πιο εύκολα μπορούν να διαφύγουν στη διάγνωση. Η **HPV τυποποίηση** συνεπώς διαθέτει **προγνωστική σημασία**. Ο χρόνος επώασης ποικίλλει αναλόγως του τύπου του ιού και μπορεί είναι και 10-20 χρόνια εκτός του ιού HPV 18 ο οποίος δρα πιο γρήγορα (από εβδομάδες έως 18 μήνες).



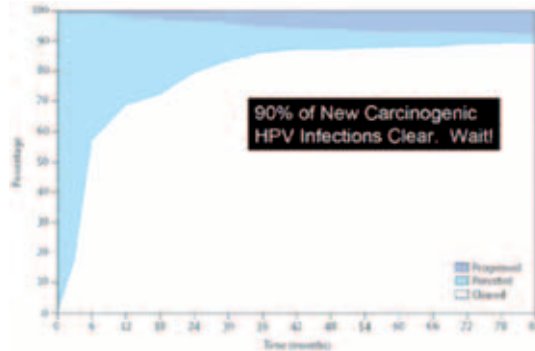
**Εικόνα 5.** Κατανομή HPV τύπων σε δείγματα φυσιολογικά, HSIL και SCC/ADC καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας [17].

Οι τύποι HPV 16 ή HPV 18 είναι πολύ πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου σε σχέση με τους υπολοίπους HPV τύπους μετρίου ή υψηλού κινδύνου όπως έδειξε μελέτη που παρακολούθησε 20.000 γυναίκες για μεγάλο χρονικό διάστημα (Εικόνα 6). Είναι εντυπωσιακό ότι ένα και μόνο αρνητικό μοριακό τεστ για HPV προσδίδει πολύ χαμηλό κίνδυνο καρκινογένεσης για το ίδιο μεγάλο διάστημα!



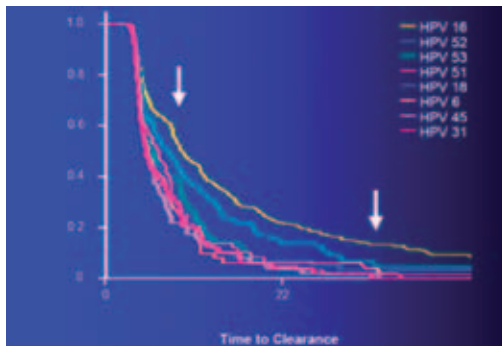
**Εικόνα 6.** Διαφορά κινδύνου στις γυναίκες με HPV 16/18 από τους υπολοίπους τύπους [M. Schiffman, 25<sup>th</sup> International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden].

Πέραν όμως του τύπου του ιού HPV προγνωστική σημασία έχει και η παρουσία επίμονης μόλυνσης με τον ίδιο τύπο. Στη μεγάλη τους πλειοψηφία οι HPV τύποι υποστρέφουν και η περιοχή του τραχήλου «καθαρίζει» κατά 70% εντός 2 ετών και κατά 90% εντός 7 ετών (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Μελέτη παρακολούθησης επίμονης HPV μόλυνσης σε 10.000 γυναίκες στο Guanacaste, Costa Rica [M. Schiffman, 25<sup>th</sup> International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden].

Ορισμένοι HPV τύποι «εξαφανίζονται» γρήγορα και δεν προκαλούν ποτέ καρκίνο (όπως π.χ. το 80% των HPV 6 μόλυνσεων εντός 6μήνου) ενώ άλλοι όπως ο HPV16 είναι και πιο επίμονοι αλλά και δυνητικά μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Άλλοι τύποι είναι επίμονοι αλλά δεν προκαλούν καρκίνο. Ωστόσο πρέπει να τονισθεί ότι ακόμη και το 80% των μόλυνσεων με τον πιο επικίνδυνο καρκινογόνο τύπο -τον HPV 16- εξαφανίζονται εντός 2ετίας χωρίς συνέπειες (εικόνα 8)! Ίσως τόσο για τη επίμονη λοίμωξη όσο και το δυναμικό καρκινογένεσης να έχουν σημαντικό ρόλο η παρουσία ή όχι του E5 γονιδίου σε έναν HPV τύπο [16]καθώς και οι παραλλαγές στην DNA ακολουθία που έχουν ταυτοποιηθεί για τους τύπους HPV16/18 [18;19].



**Εικόνα 8.** Μελέτη κάθαρσης (clearance) διαφορετικών HPV τύπων [A.B. Moscicki, 25<sup>th</sup> International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden].

Οι παραπάνω παρατηρήσεις έχουν τη σημασία τους τόσο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση όσο και για την επιλογή του κατάλληλου τεστ μοριακής ανίχνευσης και τη σωστή αξιολόγησή του.

Ίσως η ευκολότερη κάθαρση που παρατηρείται σε ορισμένες γυναίκες να έχει να κάνει με προηγούμενη έκθεσή τους σε HPV μόλυνση. Σε υποσύνολο των HPV μολυνθέντων γυναικών έχουν ανιχνευθεί χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων. Ο λόγος για τα χαμηλά επίπεδα χυμικής ανοσίας είναι ότι ο ιός σχηματίζεται πλήρως με τα αντιγονικά του επίτοπα στις L1/L2 καψιδικές πρωτεΐνες στην επιπολής κερατινοστιβάδα όπου και δεν παρατηρείται ιδιαίτερη συνάθροιση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Δεν γίνεται όμως το ίδιο με το εμβολιασμό με τα δύο κυκλοφορούντα εμβόλια (το τετραδύναμο 16/18/6/11 ή το διδύναμο 16/18) όπου το αντιγόνο L1 έχει παραχθεί βιοτεχνολογικά και έχει συσκευασθεί σε μεγάλες ποσότητες VLPs (Virus-like particles). Το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα σε αυτή την περίπτωση παράγει εξουδερωτικά αντι-L1 αντισώματα με υψηλούς IgG τίτλους τα οποία προστατεύουν απ' ότι φαίνεται -με τις έως τώρα μελέτες- τουλάχιστον για πενταετία και μάλιστα με διασταυρούμενη προστασία -σε χαμηλότερο βαθμό- με ορισμένους άλλους HPV τύπους συγγενείς φυλογενετικά με τους τύπους των εμβολίων [20;21].

### **Μοριακή ανίχνευση DNA/RNA/πρωτεϊνών HPV ιού**

Όπως προαναφέρθηκε η μοριακή ανίχνευση για τον ιό HPV ήδη χρησιμοποιείται:

- α) ως επικουρικό εργαλείο για τη κατάλληλη παραπομπή (triage) ασθενών με ύποπτο ή θετικό pap test προς κολποσκόπηση-βιοψία. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην εποχή της βασιζόμενης σε στοιχεία Ιατρικής (evidence-based Medicine) δεν νοείται ισχυρισμός ότι υπάρχει λοίμωξη HPV χωρίς να υπάρχει ταυτόχρονα απόδειξη. Και ο μόνος αντικειμενικός τρόπος απόδειξης είναι μέσω της μοριακής ανίχνευσης καθώς η κυτταρολογική εξέταση αλλά και η κολποσκοπική εικόνα και η ιστολογική διάγνωση αποτελούν ενδείξεις της παρουσίας του ιού. Είναι γνωστό δε, ότι στη μικροσκόπηση επηρεάζονται τόσο υποκειμενικοί παράγοντες όσο και η εμπειρία του εξεταστή. Η αξία της ανίχνευσης του ιού HPV καταδεικνύεται εμφανέστερα όταν υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των τριών άλλων εξετάσεων. Σ' αυτή τη περίπτωση, η απάντηση που δίνει η μοριακή ανίχνευση ξεδιαλύνει την εικόνα. Επί αρνητικού αποτελέσματος, καθησυχάζει τη γυναίκα καθώς η μοριακή εξέταση διαθέτει υψηλή αρνητική προβλεπτική αξία (NPV). Επί θετικού αποτελέσματος και εν συνεχεία επιτυχούς τυποποίησης, προσδίδει την αίσθηση κινδύνου όταν ο ανιχνευόμενος HPV τύπος είναι υψηλού κινδύνου ενώ όταν ο ανιχνευόμενος HPV τύπος είναι χαμηλού κινδύνου, υπάρχει η προσδοκία ότι η μόλυνση μπορεί να είναι παροδική και ότι δεν απαιτείται άμεσα επεμβατική θεραπεία και
- β) ως τεστ παρακολούθησης μετά από θεραπεία (test of cure). Ωστόσο, μελέτες έχουν καταδείξει την αξία της μοριακής HPV DNA ανίχνευσης και σε αυτήν την εφαρμογή:
- γ) Ως screening τεστ αντί του pap test. Σε πρόσφατη μελέτη 10.000 γυναίκες τυχαιοποιήθηκαν αναφορικά με το pap test και το HPV DNA test (HC II) και υπολογίσθηκε ότι η κλινική ευαισθησία για ανίχνευση CIN2 βλαβών του μοριακού τεστ ήταν ως αναμενόταν μεγαλύτερη του pap test (95% vs. 55%) αλλά και η κλινική ειδικότητα

δεν υπολείπονταν σημαντικά (94% vs. 97%). Σε συνδυασμό τα δύο τεστ άγγιξαν το 100% της ευαισθησίας [22].

Έχει λοιπόν προταθεί να χρησιμοποιείται το μοριακό τεστ αρχικά ως screening και στη συνέχεια να γίνεται triage με βάση το pap test. Ωστόσο, είναι φανερό ότι σε ανεπτυγμένα κράτη με οργανωμένα συστήματα πρόληψης για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (τακτική πρόσκληση για pap test μέσω δωρεάν δημοσίου συστήματος υγείας) ο στόχος της δραματικής μείωσης των αντίστοιχων περιστατικών επιτυγχάνεται με τον πλέον οικονομικό και αποτελεσματικό τρόπο. Σ' αυτές τις περιπτώσεις δεν μπορεί παρά το μοριακό τεστ να είναι επικουρικό. Άλλη εικόνα ασφαλώς παρουσιάζεται στον αναπτυσσόμενο κόσμο όπου έχει προταθεί ως screening ο συνδυασμός οπτικής παρατήρησης στην κολποσκόπηση (με οξικό ή διάλυμα Lugol) και ενός γρήγορου μοριακού τεστ POCT (είτε DNA με FastPath Qiagen είτε πρωτεΐνη E6 με latex test, Arbor Vita) και επί θετικών αποτελεσμάτων να επακολουθεί άμεσα θεραπεία με κρυοπηξία [23]. Πιστεύεται ότι τέτοιες προσεγγίσεις σε συνδυασμό με μαζικούς εμβολιασμούς θα μπορούσε να εξαλείψει τον σχετιζόμενο με HPV καρκίνο στον Τρίτο Κόσμο. Σε σχέση με την απαρχή της μοριακής ανίχνευσης του HPV πριν από 20 περίπου χρόνια όπου υπήρχαν λίαν εργώδεις μεθοδολογίες -όπως το Southern Blot και ο in situ υβριδισμός- πλέον υπάρχει διαθέσιμη πληθώρα εύκολων μοριακών μεθοδολογιών που είτε ανιχνεύουν συνολικά έναν αριθμό HPV τύπων είτε ταυτοποιούν τους τύπους που ανιχνεύουν (HPV DNA/RNA/πρωτεΐνη). Αρκετές μάλιστα από τις in house μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν σε ερευνητικά εργαστήρια έχουν γίνει προτυποποιημένα εμπορικά kits με βελτιωμένα χαρακτηριστικά όπως π.χ. την αναλυτική ευαισθησία με το να ανιχνεύουν μεγαλύτερο εύρος HPV τύπων και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, έως τώρα δεν υπάρχει μέθοδος αναφοράς. Η αναλυτική τους αξιολόγηση ασφαλώς γίνεται με σύγκριση με άλλες μοριακές μεθόδους -και συνηθέστερα με τη μόνη μέθοδο που είχε πάρει έγκριση από το FDA μέχρι το 2009, το Hybrid capture (Digene αρχικά, τώρα Qiagen)-, με χρήση πλασμιδίων με κλώνους HPV από εργαστήρια αναφοράς του WHO HPV Labnet για το όριο ευαισθησίας, ενώ η αναλυτική τους ειδικότητα εξετάζεται παρουσία άλλων ιών. Η κλινική τους ευαισθησία και ειδικότητα είτε αξιολογείται σε καρκινώματα είτε σε γυναίκες με αποτέλεσμα pap test ή καλύτερα βιοψίας από κολποσκόπηση καθώς αυτό θεωρείται το gold standard (ωστόσο υπάρχουν και μικρά σε μέγεθος CIN3 που διαφεύγουν της διάγνωσης στην κολποσκόπηση!). Τα περισσότερα από τα διαθέσιμα τεστ φέρουν άριστα αποτελέσματα ως προς την κλινική ευαισθησία και την αρνητική προβλεπτική αξία, πάσχουν όμως στην κλινική ειδικότητα και στη θετική προβλεπτική αξία (PPV)!

Οι λόγοι είναι οι εξής: α) οι κλινικές μελέτες που έχουν γίνει έχουν διαφορετικά τελικά σημεία (end points): π.χ. είτε CIN2 είτε  $\geq$ CIN2 είτε CIN3 είτε καρκίνος με αποτέλεσμα να μην είναι συγκρίσιμες, β) αναφορικά με το CIN2 -εάν συμπεριληφθεί ως τελικό σημείο- στην ιστολογική εξέταση υπεισέρχεται υποκειμενικός παράγων κατά τη μικροσκόπηση (τα όρια δεν είναι απόλυτα διακριτά μεταξύ CIN1 και CIN2) με αποτέλεσμα πολλά CIN2 να μην είναι πραγματικά, γ) οι HPV μολύνσεις εύκολα όπως προαναφέρθηκε υποστρέφουν: πιο εύκολα οι CIN2 π.χ. μπορεί με το μοριακό τεστ να ανιχνεύθηκε πολύ σωστά HPV 16, ωστόσο αυτό να μην δώσει τελικά κλινικό φαινότυπο CIN2 ή 3 (ή σε εκείνο το

χρονικό σημείο να μη δώσει και να δώσει μετά από χρόνια!) και τέλος, δ) τα διαφορετικά μοριακά τεστ συμπεριλαμβάνουν διαφορετικό panel HPV ιών που ανιχνεύουν ή ταυτοποιούν: άλλες πολύ περιορισμένο (π.χ. τους δύο επικίνδυνους HPV16/18), άλλες 5 τύπους ή 14 τύπους υψηλού κινδύνου (HR) ή πολύ περισσότερους και ανάμεσά τους και χαμηλού κινδύνου τύπους (LR) οι οποίοι π.χ. δεν δίνουν τελικό σημείο CIN3 αλλά ωστόσο εξηγούν κλινικό φαινότυπο με κονδυλώματα ή προκαρκινικές αλλοιώσεις χαμηλού βαθμού που ανευρέθηκαν π.χ. στο pap test. Όσο περιορίζεται ο αριθμός των συμπεριληφθέντων τύπων μειώνεται η κλινική ευαισθησία αλλά αυξάνεται η κλινική ειδικότητα και η PPV! Σε αυτό αποσκοπούν και οι μέθοδοι με ανίχνευση HPV mRNA και πρωτεϊνών που μπορεί να υποδείξουν ένα πιο προχωρημένο στάδιο μόλυνσης με παρουσία κυτταρικής απορρύθμισης και κατά συνέπεια με πιο μεγάλη κλινική σημασία και ειδικότητα!

Για τους προαναφερθέντες λόγους, δεν θα γίνει σύγκριση μεταξύ των μοριακών μεθόδων αναφορικά με τις αναλυτικές και κλινικές ευαισθησίες και ειδικότητές τους αλλά προσπάθεια ταξινόμησής τους και παραβολής των κύριων χαρακτηριστικών τους μαζί με βιβλιογραφικές αναφορές στον Πίνακα 1. Άλλωστε το πιο σημαντικό στην προσπάθεια καταπολέμησης του σχετιζόμενου με τον HPV καρκίνου είναι αφενός η κατανόηση από τον κλινικό ιατρό του τι ανιχνεύει το κάθε μοριακό τεστ και ποια είναι τα limitations του και αφετέρου από το εργαστήριο που επιτελεί τη μοριακή ανίχνευση, η επικύρωση ή επαλήθευση των μεθόδων που χρησιμοποιεί και μάλιστα με τη βοήθεια κατάλληλων πιστοποιημένων υλικών αναφοράς που πλέον υπάρχουν (HPV 16/18 NIBSC) και η επιτυχής διενέργεια εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (συμμόρφωση προς το ISO15189 πρότυπο).

**Πίνακας 1.** Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης DNA, RNA, Πρωτεϊνών HPV ιού (όπου HR=high risk και LR=low risk).

Test (Εταιρεία)	Μεθοδολογία	Targeted Types	Ref
<b>A. DNA</b>			
<b>I. Ανίχνευση κάποιου/ων HPV από ένα σύνολο τύπων (aggregate)</b>			
a)	Hybrid Capture II (ex Digene, QIAGEN) FDA approved	RNA probes+ chemiluminescent detection of bound RNA/ DNA antibodies	[24]
b)	Cervista HPV test (Hologic) FDA approved	Fluorimetric Invader Third wave technology	-14 HR types (in 3 separate tubes) -histone2 control
c)	Amplicor HPV test (Roche) CE-IVD	Biotinylated MY-PCR (L1 gene) and colorimetric ELISA	13 HR types b-globin control
d)	Full Spectrum Amplification and Detection (GenoID) CE-IVD	Biotinylated L1F/L1R-PCR (L1 gene) and colorimetric ELISA	46 HR+LR types b-globin control
e)	In house primers: -MY -GP+ -SPF10 (etc)	Consensus PCR L1 gene	>35 HR+LR types [26;27] [7;28] [29] [30]

<b>II. Τυποποίηση (ή γονοτύπωση, Genotyping) συγκεκριμένου/ων HPV</b>				
<b>IIA. Πλήρης γονοτύπωση</b>				
	i)	In house MY-PCR (L1 gene) + RFLP [26;27][7;28]		
	ii)	Line blots		
	a)	In house	GP+ PCR + reverse line blot or EIA	[31]
	b)	Linear Array Genotyping test (Roche) CE-IVD	PGMY- PCR (L1 gene) + reverse line blot	37 HR+LR types [32;33]
	c)	INNO-LiPa HPV Genotyping extra (DDL-Innogenetics)	SPF10 PCR (L1 gene) + reverse line blot	28 HR+LR types [30]
	iii)	Microarrays		
	a)	Clart2 Clinical arrays HPV2 (Genomica)	MY-PCR (L1 gene) +array hybridization	35 HR+LR types + b-globin ctrl [34]
	b)	Papillocheck HPV (Greiner Bio-One)	PCR (E1 gene) +array hybridization	24 HR+LR types +ADAT1 ctrl [35]
	c)	Gene Square HPV (Kurabo)	Multiplex SSP-PCR +array hybridization	23 HR+LR types +G3PDH ctrl
	iv)	Liquid Arrays -Multiplex HPV Genotyping Kit (Multimetrix)	GP+ PCR and hybridization in Luminex bead array	24 HR+LR types + b-globin ctrl [36]
	v)	fHPV typing (Molgentix)	QF-PCR (E6 and E7 genes) and capillary electrophoresis Fragment analysis	15 HR+LR types Human STR IC
<b>IIB. Μερική τυποποίηση (Partial genotyping)</b>				
	α)	Cobas 4800 HPV (Roche)	Real time PCR 4 channels	-12 HR types -HPV 16 -HPV18 -b-globin control
	β)	Abbott m2000 Real time High Risk HPV test	Real time PCR 4 channels	-12 HR types -HPV 16 -HPV18 -b-globin control
	γ)	Cervista HPV 16/18 (Hologic) FDA approved	Fluorimetric Invader Third wave technology	-HPV 16 -HPV18 -histone2 control
	δ)	Real time PCR HPV assay (GenoID)	Real time PCR 4 channels (for ABI)	-HPV16/18 -HPV 6/11 -rest HR types -IC [37]



<b>B. mRNA HPV E6/E7</b>					
	a)	NucliSens HPV (Biomerieux) previously Pre-Tect Proofer (Norchip) CE-IVD	NASBA	Full transcript 5 types in 3 tubes -16/U1 ctrl -HPV 33/45 -HPV18/31	[38;39]
	b)	APTIMA (GenProbe)	TMA	14 HR types (aggregate) Full transcript	[40]
	c)	HPV OncoTect (incellDx)	Flow cytometry-FISH CK(-)/CD16(-)/E6/7 mRNA(+) cells	All HR types Full transcript	[41]
	d)	In house nested	RT-PCR and gel electrophoresis	Full and spliced transcript	[42]
<b>Γ. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</b>					
<b>I. Viral HPV proteins</b>					
	a)	Cytoactiv (Cytoimmun)	L1 protein IHC	HR types	
	b)	In house	E4 protein IHC	All types	
<b>II. Host human proteins</b>					
	a)	CINtec Histology CINtec Cytology CINtec ELISA (mtm Laboratories)	i) p16INK4A IHC ii) p16INK4A ICC iii) p16INK4A ELISA		[43] [44]
	b)	ProEx C (BD)	Topoll2a/MCM2 IHC		
<b>Δ. Διάφορα in house tests σε ερευνητικό επίπεδο</b>					
	A)	Viral integration	PCR		[45]
	B)	Viral load	Real time-QPCR		[46]
	C)	Epigenetic markers (HPV and host)	MSP etc		[47]
	D)	HPV16/18 Variants	DNA Sequencing		[18]

## Βιβλιογραφία

1. Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. In: Zur Hausen H, Ed. Infections causing human cancer. Weinheim: Wiley-VCH; 2006, p. 145-243.
2. Hiller T, Iftner T. The human papilloma virus. In: Prendiville W, Davies P, Eds. HPV Handbook. London: Taylor & Francis; 2004, p. 12-27.
3. Κρούπης Χ. Μοριακή Διάγνωση Ιών. 18<sup>ο</sup> Εκπαιδευτικό Σεμινάριο: Εφαρμογές της Μοριακής Βιολογίας στη Διαγνωστική. Αθήνα: ΕΕΚΧ-ΚΒ; 2005, p. 127-41.
4. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur HH. Classification of papillomaviruses. Virology 2004;324: 17-27.

5. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3: S11-25.
6. de Villiers EM, Sandstrom RE, Zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7: R1-R11.
7. Kroupis C, Markou A, Vourlidis N, Dionyssiou-Asteriou A, Lianidou ES. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006;39: 727-31.
8. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 342-50.
9. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8: 405-15.
10. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1: S7-15.
11. von Knebel DM. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002;38: 2229-42.
12. Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 1998;16: 330-7.
13. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002;287: 2120-9.
14. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3: S1-10.
15. Wright TC, Jr., Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003;348: 489-90.
16. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337: 76-84.
17. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10: K1-16.
18. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 2006;98: 1045-52.
19. Oliveira S, Poupouridou N, Mavrommatis K, Vourlidis N, Kroupis C. HPV16 variant typing in Greek women with cervical precancerous lesions. *Clin Chem Lab Med* 2010;48: A173.
20. Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10: K62-7.
21. Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10: K53-61.
22. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357: 1579-88.
23. Gravitt PE, Coutlee F, Iftner T, et al. New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10: K42-K52.
24. Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, et al. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998;36: 3248-54.
25. Jeney C, Takacs T, Sebe A, Schaff Z. Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods* 2007;140: 32-42.
26. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170: 1077-85.
27. Ting Y, Manos MM. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990, p. 356-67.
28. Kroupis C, Thomopoulou G, Papathomas TG, Vourlidis N, Lazaris AC. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Athens, Greece. *Epidemiol Infect* 2007;135: 943-50.

29. Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76: 1057-62.
30. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999;37: 2508-17.
31. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, et al. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002;40: 779-87.
32. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002;40: 902-7.
33. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38: 357-61.
34. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, et al. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17: 3033-42.
35. Schopp B, Holz B, Zago M, et al. Evaluation of the performance of the novel PapilloCheck HPV genotyping test by comparison with two other genotyping systems and the HC2 test. *J Med Virol* 2010;82: 605-15.
36. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006;44: 504-12.
37. Takacs T, Jeney C, Kovacs L, et al. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods* 2008;149: 153-62.
38. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsen F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2007;142: 204-12.
39. Molden T, Kraus I, Karlsen F, et al. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14: 367-72.
40. Castle PE, Dockter J, Giachetti C, et al. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13: 2599-605.
41. Narimatsu R, Patterson BK. High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2005;123: 716-23.
42. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, et al. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2004;74: 107-16.
43. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17: 2536-45.
44. Andersson S, Hansson B, Norman I, et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* 2006;29: 705-11.
45. Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, et al. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol* 1999;37: 3514-7.
46. Snijders PJ, Hogewoning CJ, Hesselink AT, et al. Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. *Int J Cancer* 2006;119: 1102-7.
47. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 2005;4: 38.