

## УЛОГА HPV ТЕСТИРАЊА У ПРЕВЕНЦИЈИ КАРЦИНОМА ГРЛИЋА МАТЕРИЦЕ

Александра Кнежевић

Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет Универзитета у Београду, Београд, Србија

## THE ROLE OF HPV DNA TESTING IN THE PREVENTION OF CERVICAL CANCER

Aleksandra Knežević

Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## Сажетак

Потврда етиолошке повезаности између развоја карцинома грлића материце и инфекције високоризичним генотиповима хуманих папилома вируса (vr-HPV) указала је на улогу HPV тестирања у примарној и секундарној превенцији рака грлића материце. Методе HPV тестирања груписане су у дијагностичке и прогностичке тестове уз коришћење различитих техника молекуларне биологије. Дијагностички тестови омогућавају откривање присуства HPV ДНК (скрининг) и идентификацију HPV генотипова (генотипизација). Прогностички или тријажни тестови се користе за одређивање HPV инфицираних жена које су у високом ризику за развој и/или прогресију рака грлића материце. Тестирање за високоризичне HPV генотипове у протоколима скрининга за рак грлића материце може се примењивати као примарно тестирање или котестирање са цитологијом и као тестирање у тријажи жена са високим ризиком. Укључивање тестирања за високоризичне HPV генотипове као примарног тестирања или котестирања заснива се на вишој осетљивости и негативној предиктивној вредности за откривање CIN 3 лезија у поређењу са цитологијом као јединим тестом. Препоручује се неколико тријажних тестова за процену жена које су у високом ризику за развој цервикалног карцинома, као што су генотипизација за HPV 16 и 18, детекција E6/E7 iРНК и тестови маркера ДНК метилације. За ефикасно смањење распрострањености рака грлића материце у Србији неопходна је примена организованог популационог скрининг програма који укључује HPV тестирање.

**Кључне речи:** карцином грлића материце, високоризични HPV типови, скрининг, HPV генотипизација, тријажа, котестирање

## Summary

The well-established etiological association between cervical cancer development and the infection with high risk genotypes of Human papilloma viruses (hr-HPV) signify the role of HPV testing in both primary and secondary cervical cancer prevention. HPV testing methods are grouped into diagnostic and prognostic tests with the use of various techniques of molecular biology. Diagnostic tests enable detection the presence of HPV DNA (screening) and identification of HPV genotypes (genotyping). Prognostic or triage tests are used for the determination of HPV infected women who are at high risk for the development and/or progression to cervical cancer. hr-HPV testing in cervical cancer screening protocols can be implemented as primary testing or co-testing with cytology and as testing in a triage of women with high risk. The inclusion of hr-HPV testing as primary testing or co-testing is based on higher sensitivity and negative predictive value for the detection of CIN3 lesions compared to cytology alone. Several triaging tests are recommended for risk stratification such as genotyping for HPV 16 and 18, detection of E6/E7 mRNA and DNA methylation marker tests. For an efficient reduction of cervical cancer pervasiveness in Serbia, the implementation of cervical cancer organized population-based screening program that includes HPV testing is essential.

**Key words:** cervical cancer, high risk HPV types, screening, HPV genotyping, triage, co-testing

## Увод

Хумани папилома вируси (HPV) су мали ДНК вируси без омотача са високим афинитетом за епителијалне ћелије, који доводе до инфекције коже и слузокоже (нпр. аногениталног тракта, орофаринкса) [1, 2]. До сада је препознато и секвенцирано преко 220 HPV генотипова [3]. Према тропизму вируса, генотипови се деле на типове HPV коже и слузокоже. Око 30–40 типова HPV вируса који нападају слузокожу инфицирају гениталну слузокожу, а према онкогеном потенцијалу они се деле на високоризичне (hr-HPV) и нискоризичне (lr-HPV) [1, 4].

## Introduction

Human papilloma viruses (HPV) are small, non-enveloped DNA viral particles with high affinity for epithelial cells causing infections of the skin and mucosa (e.g. anogenital tract, oropharynx) [1, 2]. So far, the genomes of over 220 HPV genotypes have been recognized and sequenced [3]. According to their tissue tropism, genotypes are grouped into cutaneous or mucosal HPV types. Approximately 30–40 mucosal HPV types infect genital mucosa and based on their oncogenic potential have been classified into high risk (hr-HPV) and low risk (lr-HPV) [1, 4].

During last few decades, numerous virological and epide-

У последњих неколико деценија, бројне вирусолошке и епидемиолошке студије су показале узрочно-последичну везу између hr-HPV типова и аногениталних канцера. Према Међународној агенцији за истраживање рака (IARC, енгл. *International Agency for Research on Cancer*), 12 различитих hr-HPV типова класификује се као карциноген (група 1), укључујући типове 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59, тип HPV 68 је категорисан као вероватно карциноген (група 2A), а HPV генотипови 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 и 97 се класификују као могући карциногени (група 2B) [5].

Генотипови који се најчешће налазе у ткивима рака грлића материце на глобалном нивоу су HPV 16 и HPV 18, у приближно 50% и 20% случајева сквамозелуларног карцинома грлића материце, редом. Међутим, оба ова типа hr-HPV-а јављају се код око 35% аденокарцинома грлића материце. Недавна епидемиолошка истраживања су показала да је удео канцера грлића материце који се доводе у везу са HPV 16/18 сличан у свим географским регионима (70–76%). Штавише, дистрибуција других hr-HPV типова, као што су HPV 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58 и 59, потврђена је као доследна у скоро свим регионима широм света [1, 5, 6].

Добро документована етиолошка повезаност између развоја карцинома грлића материце и инфекције hr-HPV вирусима указује на значај тестирања на HPV у примарној и секундарној превенцији рака грлића материце [7, 8]. Услед ограничених могућности директног откривања вируса, конвенционална лабораторијска дијагноза HPV-а представљала је проблем. Наиме, HPV се не може изоловати из ћелијских култура а примена електронске микроскопије за визуализацију вирусних честица, као и детекција антигена виралног омотача (капсида) имунолошким методама су ограничене, јер вирусне честице и антигени капсида нису равномерно распоређени чак ни код хистолошки дијагностификованих папилома или карцинома. Уз то, иако се зна да се током инфекције HPV-ом стимулише производња антитела, серолошка дијагноза није од великог клиничког значаја. Показано је да се антитела специфична за вирус, која се могу детектовати, могу наћи код око 50–70% жена са перзистентном цервикалном инфекцијом HPV-ом, док се код већине жена са пролазном инфекцијом антитела не могу детектовати или су присутна само током кратког временског периода [9, 10].

Развој техника молекуларне биологије током осамдесетих година 20. века омогућио је поуздану лабораторијску дијагнозу инфекције HPV-ом на основу детекције вирусне нуклеинске киселине у клиничким узорцима. Примена техника молекуларне биологије, које су висо-

миолошких студија су демонстрирале каузативну асоцијацију између hr-HPV типова и аногениталних канцера. Према Међународној агенцији за истраживање рака (IARC), 12 различитих hr-HPV типова класификује се као карциноген (Group 1) који укључује типове 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, и 59, тип HPV68 је категорисан као вероватно карциноген (Group 2A), а HPV генотипови 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, и 97 су класификују као могући карциногени (Group 2B) [5].

Генотипови који се најчешће налазе у ткивима рака грлића материце на глобалном нивоу су HPV 16 и HPV 18, у приближно 50% и 20% случајева сквамозелуларног карцинома грлића материце, редом. Међутим, оба ова типа hr-HPV-а јављају се код око 35% аденокарцинома грлића материце. Недавна епидемиолошка истраживања су показала да је удео канцера грлића материце који се доводе у везу са HPV 16/18 сличан у свим географским регионима (70–76%). Штавише, дистрибуција других hr-HPV типова, као што су HPV 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58 и 59, потврђена је као доследна у скоро свим регионима широм света [1, 5, 6].

Добро документована етиолошка повезаност између развоја карцинома грлића материце и инфекције hr-HPV вирусима указује на значај тестирања на HPV у примарној и секундарној превенцији рака грлића материце [7, 8]. Услед ограничених могућности директног откривања вируса, конвенционална лабораторијска дијагноза HPV-а представљала је проблем. Наиме, HPV се не може изоловати из ћелијских култура а примена електронске микроскопије за визуализацију вирусних честица, као и детекција антигена виралног омотача (капсида) имунолошким методама су ограничене, јер вирусне честице и антигени капсида нису равномерно распоређени чак ни код хистолошки дијагностификованих папилома или карцинома. Уз то, иако се зна да се током инфекције HPV-ом стимулише производња антитела, серолошка дијагноза није од великог клиничког значаја. Показано је да се антитела специфична за вирус, која се могу детектовати, могу наћи код око 50–70% жена са перзистентном цервикалном инфекцијом HPV-ом, док се код већине жена са пролазном инфекцијом антитела не могу детектовати или су присутна само током кратког временског периода [9, 10].

Развој техника молекуларне биологије током осамдесетих година 20. века омогућио је поуздану лабораторијску дијагнозу инфекције HPV-ом на основу детекције вирусне нуклеинске киселине у клиничким узорцима. Примена техника молекуларне биологије, које су висо-

### HPV testing methods

Молекуларна HPV дијагноза укључује детекцију вирусне нуклеинске киселине (DNA или RNA) коришћењем различитих техника

коспецифичне и осетљиве, у лабораторијској дијагностици инфекција HPV-ом значајно је увећала могућност праћења HPV инфекција [10, 11].

**Методe тестирања за HPV**

Молекуларна дијагностика HPV-а ослања се на детекцију вирусне нуклеинске киселине (ДНК или РНК) применом различитих техника молекуларне биологије, као што су методе хибридизације, циљана амплификација, амплификација сигнала, амплификација проба и методе секвенцирања ДНК. Методе које се користе за дијагностику HPV инфекција укратко су представљене у табели 1 [10, 11, 12].

**Табела 1.** Кратак преглед најчешће коришћених молекуларних метода за дијагностику HPV-а

of molecular biology, such as hybridization methods, target amplification, signal amplification, probe amplification methods and DNA sequencing methods. The methods used for HPV diagnosis are summarized in the Table 1. [10, 11, 12].

**Table 1.** Summary of the commonly used molecular methods for HPV diagnosis

| Методe<br><i>Methods</i>                             | Врсте метода<br><i>Types of methods</i>   |
|--|---|
| Хибридизација<br><i>Hybridization</i>                | <i>In situ</i> хибридизација (ISH)<br><i>In situ hybridization (ISH)</i>  |
| Циљана амплификација<br><i>Target amplification</i>  | Ланчана реакција полимеразе (PCR)<br>PCR у стварном времену (RT-PCR)<br>PCR са пост PCR хибридизацијом<br>Микронизови<br>PCR са реверзном транскрипцијом<br>PCR ензимски имунотест (PCR-EIA)<br><i>Polymerase chain reaction (PCR)</i><br><i>Real-time PCR</i><br><i>PCR with post-PCR hybridization</i><br><i>Microarray</i><br><i>PCR with reverse transcription</i><br><i>PCR-Enzyme immunoassay (PCR-EIA)</i> |
| Амплификација сигнала<br><i>Signal amplification</i> | Хватање хибрида<br><i>Hybrid capture</i>  |
| Амплификација пробе<br><i>Probe amplification</i>    | Ланчана реакција лигазе (LCR)<br><i>Ligase chain reaction (LCR)</i>   |
| Секвенцирање<br><i>Sequencing</i>                    | Директно секвенцирање (Sanger)<br>Секвенцирање нове генерације (NGC)<br><i>Direct sequencing (Sanger)</i><br><i>Next-generation sequencing (NGS)</i>  |

Методe за тестирање на HPV се деле на дијагностичке и прогностичке тестове. Дијагностички тестови омогућавају откривање присуства HPV ДНК (скрининг) и идентификацију HPV генотипова (генотипизација). Детекција ДНК HPV-а има првенствено дијагностички значај, док генотипизација такође има и велики прогностички и терапијски значај, јер омогућава разликовање пацијенткиња које су под високим ризиком, од оних које су под ниским ризиком од развоја рака [9, 10, 11].

**Дијагностички тестови за HPV**

Недавни прегледни радови су идентификовали нај-

HPV testing methods are grouped into diagnostic and prognostic tests. Diagnostic tests enable detection the presence of HPV DNA (screening) and identification of HPV genotypes (genotyping). The detection of HPV DNA has primarily diagnostic significance, while genotyping has also great prognostic and therapeutic significance, as it enables the differentiation of patients who are at high or low risk for the development of cancer [9, 10, 11].

**HPV diagnostic tests**

Recent reviews have identified at least 254 commercial HPV tests and 425 tests variants which are available on

мање 254 комерцијална теста за HPV и 425 варијанти тестова доступних на глобалном тржишту, од којих се скоро половина производи у региону Азије/Пацифика, углавном у Кини (табела 2). Већина ових тестова (око 90%) није оцењена путем ригорозног протокола клиничке валидације [13, 14]. У складу са ажурираним смерницама СЗО за превенцију рака грлића материце, скоро сви, тј. 252 теста, усмерени су ка 12 hr-HPV типова (карциногени групе 1), док су неки, уз то, усмерени и ка типовима HPV 66 и 68 (14 hr-HPV типова) [13, 14, 15]. Око 15% свих тестова се користи за скрининг за ДНК hr-HPV вируса којим се детектује само присуство ових генотипова без идентификације конкретног типа. Већина ових тестова је клинички валидирана и они се најчешће користе у дијагностичким лабораторијама [13, 14].

**Табела 2.** Групе HPV тестова који се користе у молекулској дијагнози инфекције HPV-ом

the global market and almost half of these assays are produced in the Asia-Pacific region, mainly in China (Table 2). The majority of these tests (about 90%) have not been evaluated by rigorous protocols of clinical validation [13, 14]. According to the updated WHO guideline for cervical cancer prevention, almost all or 252 tests target 12 hr-HPV types (Group 1 carcinogens) and some of these in addition target types HPV66 and 68 (14 hr-HPV types) [13, 14, 15]. About 15% of all tests are tests used for hr-HPV DNA screening that detect only the presence of these genotypes without the identification of specific types. The majority of these tests are clinically validated and the most widely used in diagnostic laboratories [13, 14].

**Table 2.** Groups of HPV tests used in molecular diagnosis of HPV infection

| Врста теста за HPV<br><i>Type of HPV testing</i>  |
|---|
| <b>Дијагностички тестови</b><br><i>Diagnostic tests</i>   |
| <b>Скрининг тестови за ДНК hr-HPV-а</b><br><b>Скрининг тестови за ДНК hr-HPV-а са делимичним тестовима генотипизације</b><br><b>Тестови за ДНК hr-HPV-а са тестовима генотипизације специфичним за одређени тип или групу</b><br><b>Тестови за ДНК hr-HPV-а са потпуном генотипизацијом</b><br><i>hr-HPV DNA screening tests</i><br><i>hr-HPV DNA screening tests with partial genotyping tests</i><br><i>hr-HPV DNA tests with type- or group specific genotyping tests</i><br><i>hr-HPV DNA full genotyping tests</i> |
| <b>Прогностички тестови</b><br><i>Prognostic tests</i>  |
| <b>Тестови за hr-HPV E6/E7 иРНК</b><br><b>Тестови метилације ДНК HPV-а/тестови метилације ћелијске ДНК</b><br><i>hr-HPV E6/E7 mRNA tests</i><br><i>HPV DNA methylation tests/Cellular DNA methylation test</i>  |

Од 254 комерцијална теста око 67% су тестови за делимичну генотипизацију, генотипизацију специфичну за тип или групу, као и пуну генотипизацију. Тестови за делимичну генотипизацију омогућавају скрининг за карциногене hr-HPV генотипове и идентификацију типова који су најјачи онкогени (углавном HPV 16 и HPV 18). Неки од ових тестова омогућавају генотипизацију неколико додатних генотипова (HPV 45, 31 и 33). Тестови специфични за тип или групу заснивају се на детекцији необичних hr-HPV типова или групе специфичних високоризичних типова. Већина ових тестова користи метод PCR-а у стварном времену (RT-PCR) [13, 14, 16]. Ови тестови се најчешће користе за тестирање на HPV у дијагностичким лабораторијама у Србији.

Out of 254 HPV commercial tests, about 67% are tests for partial, type- or group-specific genotyping and full genotyping. The tests with partial HPV genotyping enable screening for carcinogenic hr-HPV genotypes and identification of types with highest oncogenicity (mainly HPV16 and HPV18). Some of these tests allows the genotyping of few additional genotypes (HPV45, 31 and 33). Type- or group specific tests are based on the detection of peculiar hr-HPV types or a group of specific high-risk types. The majority of these test utilize Real-time PCR method [13, 14, 16]. These tests are the most frequently used for HPV testing in diagnostic laboratories in Serbia. HPV DNA full genotyping tests are commercially available in the largest number and are used for individual identi-



Тестови за потпуну генотипизацију ДНК HPV-а су комерцијално доступни, има их највише и користе се за појединачну идентификацију свих карциногенних hr-HPV генотипова, у само једној реакцији. Већина њих су тестови који се заснивају на PCR-у у стварном времену, који омогућавају идентификацију и/или квантитативно одређивање специфичних hr-HPV типова, као и PCR тестови са пост-хибридизацијом који омогућавају само идентификацију специфичних hr-HPV генотипова. У тим тестовима, број hr-HPV типова који се могу идентификовати креће се од 12 до 28 [13, 14, 16].

Једини молекуларни метод који омогућава детекцију HPV-а директно у зараженим ћелијама/ткивима јесте *in situ* хибридизација (ISH). Ови тестови се деле у две групе: тестови на бази HPV-ДНК за скрининг и/или генотипизацију hr-HPV типова и тестови на бази HPV-иРНК. Главно ограничење тестова заснованих на ISH HPV-ДНК је ниска осетљивост. Дерегулисана пролиферација ћелија током HPV инфекције, мали број копија и губитак вирусног генома могу да спрече детекцију вирусне ДНК [13, 16].

#### Прогностички или тријажни тестови за HPV

Процењено је да је ризик од гениталне инфекције hr-HPV-ом током целог животног века висок, али само мали део ових инфекција доводи до развоја рака грлића материце. Приближно 90% инфекција HPV-ом се изгуби у року од 18 до 24 месеца услед дејства имуног система. Уколико је инфекција упорна, може се утемељити као продуктивна инфекција која се цитолошки и хистолошки јавља у виду сквамозелуларне интраепителијалне лезије ниског степена (LSIL) или цервикалне интраепителијалне неоплазије ниског степена (CIN 1), или у виду трансформишућих инфекција које се јављају као сквамозелуларне интраепителијалне лезије високог степена (HSIL) или цервикалне интраепителијалне неоплазије високог степена (CIN 2 и 3) [1, 5].

Молекуларно тестирање на HPV може да детектује инфекцију рано у току овог процеса, стога је од великог значаја да се направи диференцијација, односно тријажа жена са овом инфекцијом које су под високим ризиком од развоја и/или прогресије рака грлића материце. Идентификовано је неколико биомаркера који могу да се користе за идентификацију жена које су под високим ризиком од рака грлића материце. Ови биомаркери могу да се детектују помоћу прогностичких или тријажних тестова (табела 2) [17, 18].

Показано је да детекција E6/E7 iРНК има вишу позитивну предиктивну вредност од тестова за HPV на бази ДНК. Висока експресија HPV E6/E7 транскрипта је мар-

кације свих карциногенних hr-HPV генотипова у једној реакцији. Већина њих су тестови који се заснивају на Real-time PCR бази, који омогућавају идентификацију и/или квантитацију специфичних hr-HPV типова и PCR са пост-хибридизацијом који омогућавају само идентификацију специфичних hr-HPV генотипова. У тим тестовима, број hr-HPV типова који се могу идентификовати креће се од 12 до 28 [13, 14, 16].

Једини молекуларни метод који омогућава директно детекцију HPV у инфицираним ћелијама/ткивима јесте *in situ* хибридизација (ISH). Ови тестови се деле у две групе: HPV-DNA бази тест за скрининг и/или генотипизацију hr-HPV типова и HPV-mRNA бази тест. Главна ограничења ISH HPV-DNA бази тестова су ниска осетљивост. Зbog дерегулисане ћелијске пролиферације током HPV инфекције, мали број копија и губитак вирусног генома могу да спрече детекцију вирусне ДНК [13, 16].

#### HPV prognostic or triage tests

Имајући у виду да је ризик од гениталне инфекције hr-HPV-ом током целог животног века висок, али само мали део ових инфекција доводи до развоја рака грлића материце. Приближно 90% HPV инфекција се изгуби у року од 18-24 месеца услед дејства имуног система. Ако инфекција перзистира, она може бити продуктивна, што се манифестује као ниског степена лезија (LSIL) или ниског степена цервикалне интраепителијалне неоплазије (CIN 1), или високог степена лезија (HSIL) или високог степена цервикалне интраепителијалне неоплазије (CIN 2 и 3). [1, 5].

Молекуларно тестирање HPV може да детектује инфекцију рано у току овог процеса, стога је од великог значаја да се направи диференцијација, односно тријажа жена са овом инфекцијом које су под високим ризиком од развоја и/или прогресије рака грлића материце. Идентификовано је неколико биомаркера који могу да се користе за идентификацију жена које су под високим ризиком од рака грлића материце. Ови биомаркери могу да се детектују помоћу прогностичких или тријажних тестова (табела 2) [17, 18].

Имајући у виду да је ризик од гениталне инфекције hr-HPV-ом током целог животног века висок, али само мали део ових инфекција доводи до развоја рака грлића материце. Приближно 90% HPV инфекција се изгуби у року од 18-24 месеца услед дејства имуног система. Ако инфекција перзистира, она може бити продуктивна, што се манифестује као ниског степена лезија (LSIL) или ниског степена цервикалне интраепителијалне неоплазије (CIN 1), или високог степена лезија (HSIL) или високог степена цервикалне интраепителијалне неоплазије (CIN 2 и 3). [1, 5].

У последњим годинама, број студија које су демонстрирале корелацију између тежине цервикалне болести и нивоа метилације HPV ДНК је порастао. У овим студијама, метилација HPV ДНК је показала бољу предиктивну вредност од традиционалних тестова за HPV. [19].

кер активности hr-HPV типова и стога је предиктивна за преканцерозне лезије грлића материце [18, 19]. Девет комерцијалних прогностичких тестова за детекцију E6/E7 iPHK доступно је на глобалном тржишту, и то су углавном тестови на бази RT-PCR технике [13].

Последњих година бројне студије су показале поуздану корелацију између степена озбиљности болести грлића материце и степена метилације ДНК HPV-а, при чему је хиперметилација L1, L2, E2 и E4 региона HPV ДНК у корелацији са повећаним ризиком од  $\geq$ CIN 2 лезија и перзистентне инфекције. Већина ових тестова користи методе засноване на секвенцирању следеће генерације, а одређени број су тестови на бази PCR у стварном времену (RT-PCR) [12, 20, 21].

Различити HPV тестови, и дијагностички и прогностички, користе се у дијагностичким лабораторијама широм света. Одабир тестова умногоме зависи од доступности и карактеристика тестова, цене, доступности опреме и обучене радне снаге. Ефикасност превенције рака грлића материце ослања се на употребу одговарајућих клинички потврђених тестова за HPV.

#### **Тестирање на HPV у превенцији рака грлића материце**

Основни принцип превенције рака јесте детекција премалигних лезија код асимптоматске, наводно здраве популације применом специфичних тестова за скрининг. Први скрининг тест за рак грлића материце, који је још увек најчешће коришћен широм света, јесте цитолошки Папа тест, који је уведен у програме превенције рака грлића материце током шездесетих и седамдесетих година 20. века. Овај тест се заснива на микроскопском прегледу обојених цервикалних ћелија које су узете брисом зоне трансформације цервикса и ендоцервикса. Код већих абнормалности ћелија, лезије се додатно проверавају колпоскопијом или поновљеним цитолошким тестом. Доказ о томе да је инфекција HPV-ом кључни фактор у развоју рака грлића материце довео је до имплементације тестирања на hr-HPV у протоколе за скрининг на рак грлића материце [21, 22].

#### **Примарно тестирање на hr-HPV или котестирање у скринингу на рак грлића материце**

Тестирање на HPV је високо осетљива, објективна и репродуктивна метода за скрининг на рак грлића материце која не укључује интерпретацију резултата базираних на морфологији ћелија, што је у цитологији субјективно и извор варијабилности резултата у зависности од особе која посматра брис [22, 23]. Бројне лонгитудиналне студије као што су *SwedeScreen* у Шведској, *ARTISTIC* у Енглеској, *POBASCAM* у Холандији, *NTCC*

of L1, L2, E2 | E4 regions of HPV DNA correlates with an increased risk of  $\geq$ CIN2 lesions and persistent infection. The majority of these tests utilize Next-generation sequencing based methods and several are Real-time PCR based tests [12, 20, 21].

Different HPV tests, both diagnostic and prognostic, are used in diagnostic laboratories around the world. The selection of tests largely depends on the availability and characteristics of tests, cost, availability of equipment and trained personnel. The efficiency of cervical cancer prevention relies on the use of proper clinically validated HPV tests.

#### **HPV testing in cervical cancer prevention**

The basic principle of cancer prevention is detection of premalignant lesions in asymptomatic, allegedly healthy population with the use of specific screening tests. The first and still the most frequently used screening test for cervical cancer around the world is Pap smear cytology, which was introduced in cervical cancer prevention programs during 1960s and 1970s in many countries worldwide. This test is based on the microscopic examination of the stained cervical cells collected by swab from the transformation zone of cervix and endocervix. Due to the severity of the cell abnormalities, the lesions are further assessed with colposcopy or repeated cytology. The demonstration that HPV infection is a key factor in the development of cervical cancer has led to the implementation of hr-HPV testing in cervical cancer screening protocols [21, 22].

#### **Primary hr-HPV testing or co-testing in cervical cancer screening**

HPV testing is a highly sensitive, objective and reproducible method to screen for cervical cancer which does not include the interpretation of results based on cell morphology, which is in cytology subjective and the source of inter-observer variability [20, 23]. Numerous longitudinal studies such as *Swedescreen* in Sweden, *ARTISTIC* in England, *POBASCAM* in the Netherlands, *NTCC* in Italy, *Finnish RCT*, *CCCaST* in Canada, *KPNC* in USA etc., have proven the significantly higher sensitivity of primary hr-HPV testing as a screening method compared to Pap cytology for the detection of premalignant lesions and cervical cancer. The results of these studies have showed that the sensitivity of primary hr-HPV testing was 90-95% for CIN3 lesions or worse while sensitivity of cytology was 30-87% [12, 20, 23, 24]. In addition, hr-HPV testing is found to be more effective than cytology in the diagnosis of adenocarcinoma, where HPV testing significantly missed less cervical adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma in comparison to Pap test (18.7 vs. 51.1% and 11.4 vs. 47.4%, respectively) [12, 20, 23, 24]. It has been also re-

у Италији, RCT у Финској, CCCaST у Канади, KPNC у САД итд. показале су значајно вишу осетљивост примарног тестирања на hr-HPV као методе скрининга, у поређењу са цитолошким Папа тестом за детекцију премалигних лезија и рака грлића материце. Резултати ових студија показали су да је осетљивост примарног тестирања на hr-HPV 90–95% за CIN 3 лезије или лезије вишег градуса, док је осетљивост цитологије била 30–87% [12, 20, 23, 24]. Уз то, показано је да је тестирање на hr-HPV делотворније од цитологије за дијагнозу аденокарцинома, где су тестови на HPV пропустили да детектују значајно мањи број цервикалних аденокарцинома *in situ* и аденокарцинома у поређењу са Папа тестом (18,7 наспрам 51,1% и 11,4 наспрам 47,4%, редом) [12, 20, 23, 24]. Такође је објављено да тестови на hr-HPV имају високу негативну предиктивну вредност. Ове студије су показале да је инциденција инвазивног канцера грлића материце код жена које су негативне на HPV значајно мања након периода праћења од 3,5 и 5,5 година, у поређењу са групом жена која је била негативна на цитолошком скринингу. У складу са овим резултатима, постављена је хипотеза да је скрининг помоћу тестова на hr-HPV сваких пет година у најгорем случају подједнако безбедан као цитолошки скрининг на сваке три године ако се користи сам [20, 23, 24].

Котестирање је комбинација тестирања на hr-HPV и цитолошког тестирања у скринингу за рак грлића материце. Неколико рандомизованих студија са контролним групама процењивало је ефикасност котестирања у скринингу на рак грлића материце. Резултати су показали веома високу специфичност, осетљивост и негативну предиктивну вредност (92, 100 и 100%, редом). Међутим, није пронађена значајна разлика између негативног котеста и негативног HPV резултата у оцени петогодишњег кумулативног ризика од рака; детекција HPV је више од 10 пута повећавала ризик од CIN 2+ лезија (37,4 за HPV+/цитологија + у односу на 3,24 за HPV-/цитологија +) [12, 20, 23, 24, 25].

Једно важно ограничење тестирања hr-HPV јесте ниска специфичност, што може да повећа број колпоскопија, контролних прегледа или претераног третмана жена са пролазним HPV инфекцијама, посебно код младих жена, где је учесталост пролазних HPV инфекција веома висока. Стога Европске и Америчке смернице за превенцију рака грлића материце препоручују примену примарног HPV тестирања или котестирања почев од 30. године старости. Уз то, како би се ублажиле последице овог ограничења, веома су важне стратегије тријаже жена позитивних на присуство hr-HPV-а [11, 12, 23, 24].

ported that hr-HPV test has high negative predictive value. These studies have revealed that the incidence of invasive cervical cancer in HPV negative women was significantly lower after 3.5 and 5.5 years follow-up compared to negative cytology group. According to these results, it has been suggested that hr-HPV screening every 5 years is at least safe as cytology alone every 3 years [20, 23, 24].

Co-testing is combination of hr-HPV testing and cytology in the screening of cervical cancer. Several randomized control trials evaluate the efficacy of co-testing in cervical cancer screening and have showed very high specificity, sensitivity, and negative predictive value (92.5, 100 and 100%, respectively). However, no significant difference was found between negative co-test and negative HPV result in five-years cumulative risk of cancer but HPV detection by more than 10-fold increased the risk of CIN2+ lesions (37.4 for HPV+/cytology+ vs. 3.24 for HPV-/cytology+) [12, 20, 23, 24, 25].

One of important limitation of hr-HPV testing is low specificity which can increase the number of colposcopy, follow-up or overtreatment of women with transient HPV infection, especially in young women, where the frequency of transient HPV infection is very high. Therefore, it is recommended by European and American guidelines for cervical cancer prevention to use primary HPV testing or co-testing after the age of 30 as the starting age. In addition, in order to mitigate this limitation, triaging strategies for hr-HPV-positive women are of great importance [11, 12, 23, 24].

Currently, 10 clinically validated hr-HPV DNA assays have been suggested for use in HPV-based cervical cancer screening using cervical samples collected by gynecologists: HC2, GP5p/6p PCR-EIA, Cobas4800/6800, Abbott RealTime, PapilloCheck, Alinity, Xpert HPV, Anyplex HR, HPV-Risk and Onclarity [14].

#### hr-HPV testing in triage of women with high risk

Several triaging tests are recommended for risk stratification such as genotyping for HPV 16 and 18, detection of E6/E7 mRNA and methylation marker tests [20, 22, 23].

#### hr-HPV Genotyping

Numerous studies have demonstrated that cervical infection with HPV 16 and HPV 18 have the highest risk for the development of premalignant lesions and cancer. The most prevalent HPV genotype is HPV 16 in both squamous cell carcinoma (59.3%) and adenocarcinoma (36.3%) around the world. Type 18 has been found with the higher frequency in adenocarcinoma (36.8%) compared to squamous cell

У овом тренутку се препоручује примена 10 клинички проверених ДНК тестова за hr-HPV у скринингу за рак грлића материце заснованом на HPV-у, из узорака цервикса које узимају гинеколози: HC2, GP5p/6p PCR-EIA, Cobas4800/6800, *Abbott RealTime*, *PapilloCheck*, *Alinity*, *Xpert HPV*, *Anyplex HR*, *HPV-Risk* и *Onclarity* [14].

### Тестирање на hr-HPV у тријажи жена под високим ризиком

Неколико тријажних тестова се препоручује за стратификацију ризика, као што су генотипизација за HPV 16 и 18, детекција E6/E7 iPHK и тест за метилацију маркера [20, 22, 23].

### Генотипизација hr-HPV

Бројне студије су показале да инфекција грлића материце HPV 16 и HPV 18 вирусом доводи до највећег ризика од развоја премалигних лезија и канцера. Најчешћи генотип HPV је HPV 16, како код сквамозеларних карцинома (59,3%), тако и код аденокарцинома (36,3%), на глобалном нивоу. Тип 18 чешће се налази код аденокарцинома (36,8%) у поређењу са сквамозеларним карциномима (13,2%). У литератури је објављено да је преваленција других онкогених HPV вируса код рака грлића материце нижа, али није без значаја [1, 5, 6].

Неколико лонгитудиналних студија истиче значај упливања жена позитивних на HPV 16 и HPV 18 на колпоскопију без одлагања, за ранију детекцију преканцерозних лезија. Већина тих студија показала је да је више од 90% CIN 2 лезија или лезија вишег степена позитивно на hr-HPV у периоду скрининга у коме је HPV 16 био преобладајући тип [12, 20, 22]. Стога идентификација конкретне hr-HPV типа може да предвиди већи ризик од настанка преканцерозних лезија на грлићу материце.

### hr-HPV E6/E7 iPHK

Добро је познато да је експресија вирусних онкогена E6 и E8 круцијални механизам онкогенезе HPV. Стога се мерење експресије E6/E7 у ћелијама инфицираним HPV-ом може користити као прогностички маркер за идентификацију високоризичних лезија. У литератури је објављено да су концентрације E6/E7 iPHK hr-HPV-а много више у премалигним цервикалним лезијама у поређењу са пролазним инфекцијама HPV-ом. Неколико студија које су оцењивале тестове за E6/E7 iPHK hr-HPV-а (HPV 16/16/45) показало је већу специфичност и сличну осетљивост као и тестови који су се заснивали на ДНК HPV-а. Уз то, ове студије су показале да HPV iPHK тестови имају веома високе негативне предиктивне вредности од > 99% за одсуство CIN 3+ након 5–7

carcinoma (13.2%). The prevalence of other oncogenic HPVs in cervical cancer have been reported to be lower but not without significance [1, 5, 6].

Several longitudinal studies highlight the importance of immediate referral for colposcopy in women with HPV 16 and 18 for earlier identification of precancerous lesions. The majority of these studies have showed that more than 90% of CIN2 lesions or worse were hr-HPV positive at the screening period where HPV16 was the predominant type [12, 20, 22]. Therefore, the identification of particular hr-HPV types can predict an increased risk of development of cervical precancerous lesions.

### hr-HPV E6/E7 mRNA

It is well known that expression of the viral oncogenes E6 and E7 is crucial mechanism of HPV oncogenesis. Therefore, the measurement of E6/E7 expression in HPV infected cells may be used as prognostic marker for the identification of high-risk lesions. It has been reported that the levels of hr-HPV E6/E7 mRNA are much higher in cervical premalignant lesions compared to transient HPV infections. Several studies evaluating the hr-HPV E6/E7 mRNA assays (HPV 16/16/45) showed higher specificity and similar sensitivities as a HPV-DNA based assay. In addition, these studies have demonstrated that HPV-mRNA tests have very high negative predictive values of >99% for absence of CIN3+ after 5-7 years of follow-up of women aged more than 30 years of age [7, 17, 18, 19].

### HPV DNA methylation tests/Cellular DNA methylation test

DNA methylation is biochemical process which includes the transfer of methyl group onto DNA molecule. This enzyme-induced modification usually occurs within cytosine-guanine dinucleotide-rich areas (CpG islands) in human gene promoter regions, that induce changes in gene activity or function. One of the important mechanism during oncogenesis is inactivation of tumor suppressor genes induced by CpG methylation. Usually, this process occurs in early phase of the development of the cancer and it is often present in premalignant lesions of different types of cancers. HPV genome does not possess classical CpG islands but high-density CpG sites are present in L1, L2, E2 I E4 regions of HPV DNA.

It has been suggested that CpG methylation levels within promoter regions of viral genes and cellular genes may be used as a prognostic marker of precancerous lesions. These markers are stable and may be used for identification of women who are at increased risk for cervical cancer development [7, 20].

Currently, there is no unified opinion on which host gene methylation profiles can be used as prognostic biomark-



година праћења код жена старијих од 30 година [7, 17, 18, 19].

### Тестови метилације ДНК HPV-а/тестови метилације ћелијске ДНК

Метилација ДНК је биохемијски процес који укључује пренос метил групе на ДНК молекула. Ова модификација под дејством ензима обично се одвија у областима богатим цитозин-гуанин динуклеотидима (CpG острва) у промотерским регионима хуманих гена, што доводи до промена у активности или функцији гена. Један од важних механизма током онкогенезе је инактивација туморских супресорских гена до које доводи CpG метилација. Обично се овај процес дешава у раној фази развоја рака и често се среће у премалигним лезијама различитих врста канцера. Геном HPV-а нема класична CpG острва, али су места богата CpG динуклеотидима присутна у L1, L2, E2 и E4 регионима ДНК HPV-а.

Указано је да степен метилације CpG унутар промотерских региона вирусних и ћелијских гена може да се користи као прогностички маркер за преинвазивне лезије. Ови маркери су стабилни и могу да се користе за идентификацију жена које су под повећаним ризиком од развоја канцера грлића материце [7, 20].

Тренутно не постоји јединствено мишљење о генима чији би профили метилације могли да се користе као прогностички биомаркери. Неки од ћелијских биомаркера који највише обећавају су гени 19 (*chemokine (C–C)-motif-like member A4 (FAM19A4)*) и микроРНК 124-2 (miR-124-2). Резултати оцењивања панела FAM19A4/miR-124-2 у цервикалним узорцима показали су осетљивост од око 70% и специфичност од 68 до 76% за детекцију лезија  $\geq$  CIN 3 лезија [27]. У другој студији, резултати испитивања метилације ДНК касних вирусних региона HPV 16, 18, 31 и 33 и EPB41L3 региона домаћина открили су вишу укупну осетљивост и специфичност од генотипизације у идентификацији лезија  $\geq$  CIN 2 код жена позитивних на hr-HPV [28].

Иако су ови тестови перспективни, ефикасност тестова метилације ДНК мора се потврдити да би се они могли примењивати у клиничкој пракси.

### Закључак

Постоје обилни докази о томе да су дијагностички и прогностички тестови за hr-HPV важни алати за скрининг на рак грлића материце. Одговарајуће смернице СЗО и Европске смернице препоручују укључивање тестирања на HPV у националне програме за скрининг на рак грлића материце, као додатних тестова или као

ers. One of the most promising cellular biomarkers are 19 (chemokine (C–C)-motif)-like member A4 (FAM19A4) and microRNA 124-2 (miR124-2) genes. The results of biomarker panel FAM19A4/miR-124-2 evaluation in cervical samples have showed sensitivity of about 70% and a specificity of 68–76% for the detection of  $\geq$ CIN3 lesions [27]. In other study, the reports of DNA methylation levels of viral late gene regions of HPV 16, 18, 31, and 33 and host EPB41L3 region have revealed a higher overall sensitivity and specificity than genotyping in the identification of  $\geq$ CIN2 lesions in hr-HPV-positive women [28].

Although, these tests are promising, the efficacy of DNA methylation assays needs to be validated for clinical practice.

### Conclusion

It is well demonstrated that both diagnostic and prognostic hr-HPV testing is an important tool in the screening of cervical cancer. Relevant WHO and European guidelines have recommended the inclusion of HPV testing into national cervical screening programs as an adjuvant test or as a primary screening method. The incidence and mortality of cervical cancer in Serbia is among the highest in Europe. For an efficient reduction of cervical cancer pervasiveness in Serbia, the implementation of cervical cancer organized population-based screening program that includes HPV testing is essential.

примарног метода за скрининг. Инциденција и морталитет од рака грлића материце у Србији су међу највишим у Европи. За ефикасно смањење распрострањености рака грлића материце у Србији неопходна је примена организованог популационог скрининг програма који укључује HPV тестирање.

## Литература / References

1. Doorbar J, Jenkins D, Stoler MH, Bergeron C. Biology of the Human Papillomavirus Life Cycle: The Basis for Understanding the Pathology of Pre-cancer and Cancer. *Human Papillomavirus*. 2020; 67–83. doi:10.1016/b978-0-12-814457-2.00005-2
2. Mac M, Moody CA. Epigenetic Regulation of the Human Papillomavirus Life Cycle. *Pathogens*. 2020; 9:483. doi:10.3390/pathogens9060483
3. PaVE: Papilloma Virus Genome Database. Available online: <https://pave.niaid.nih.gov/> (accessed on 17 August 2022)
4. De Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013; 445:2-10. doi:10.1016/j.virol.2013.04.023
5. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2014; 26:13–21. doi:10.1016/j.semcancer.2013.11.002
6. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). *Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 22 October 2021*. [17 August 2022]
7. Gradíssimo A, Burk RD. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17(4):379–391. doi:10.1080/14737159.2017.1293525
8. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26:579-583. doi:10.1016/j.cmi.2019.09.006
9. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005; 10:32S:S43-S51. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.004
10. Chan PKS, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2012; 49(4):117–136. doi: 10.3109/10408363.2012.707174
11. Aboulnasr A, Sherif N, Ali M, Elmahy M, Shalaby M, Soliman A, Salem M. Molecular Diagnosis of Human Papilloma Virus Infection. *Med J Cairo Univ*. 2020; 88(1):471-480. [https://mjcu.journals.ekb.eg/article\\_94013\\_018e6ca045467c1551f067895011fee4.pdf](https://mjcu.journals.ekb.eg/article_94013_018e6ca045467c1551f067895011fee4.pdf)
12. Rajaram S, Gupta B. Screening for cervical cancer: Choices & dilemmas. *Indian J Med Res*. 2021; 154:210-220. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_857\_20
13. Poljak M, Valencak AO, Domjanic GG, Xu L, Arbyn M. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26:1144-1150. doi:10.1016/j.cmi.2020.03.033
14. Arbyn M, Simon M, Peeters E, Xu L, Meijer CJLM, Berkhof J. et al. 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. *Clin Microbiol Infect*. 2021; 27:1083-1095. doi: 10.1016/j.cmi.2021.04.031

15. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition. Geneva: World Health Organization; 2021.
16. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. *Exp Rev Mol Med*. 2017; 19(e1):1-20. doi:10.1017/erm.2017.2
17. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol*. 2016; 76(Suppl 1): S49–S55. doi:10.1016/j.jcv.2015.11.015.
18. Rossi PG, Carozzi F, Ronco G, Allia E, Bisanzi S, Gillio-Tos A, et al. p16/ki67 and E6/E7 mRNA Accuracy and Prognostic Value in Triaging HPV DNA-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*. 2021; 113(3):djaa105. doi: 10.1093/jnci/djaa105
19. Forslund O, Miriam Elfstrom K, Lamin H, Dillner J. HPV-mRNA and HPV-DNA detection in samples taken up to seven years before severe dysplasia of cervix uteri. *Int J Cancer*. 2019; 144:1073–1081. doi: 10.1002/ijc.31819
20. Olivas AD, Barroeta JE, Lastra RR. Role of Ancillary Techniques in Gynecologic Cytopathology Specimens. *Acta Cytologica*. 2020; 64:63–70. doi: 10.1159/000496569
21. Mirabello L, Schiffman M, Ghosh A, Rodriguez AC, Vasiljevic N, Wentzensen N, et al. Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2013; 132(6):1412–22. doi:10.1002/ijc.27750.
22. Basu P, Mittal S, Bhadra Vale D, Chami Kharaji Y. Secondary prevention of cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018; 47:73-85. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.012.
23. Chrysostomou AC, Kostrikis LG. Methodologies of Primary HPV Testing Currently Applied for Cervical Cancer Screening. *Life*. 2020; 10:290-302. doi:10.3390/life10110290
24. Ronco G, Rossi PG. Role Of Hpv Dna Testing In Modern Gynaecological Practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018; 47:107-118. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.002
25. Lina Jans L, Zetterström K, Bergengren L, Helenius G. The value of adding a single co-test in HPV primary screening. *Preventive Medicine* 2021; 149:106617. doi:10.1016/j.ypmed.2021.106617
26. De Strooper LM, Verhoef VM, Berkhof J, Hesselink AT, de Bruin HM, van Kemenade FJ, et al. Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol Oncol*. 2016; 141(2):341–7. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.02.012
27. Lorincz AT, Brentnall AR, Scibior-Bentkowska D, Reuter C, Banwait R, Cadman L, et al. Validation of a DNA methylation HPV triage classifier in a screening sample. *Int J Cancer*. 2016; 138(11):2745–51. doi: 10.1002/ijc.30008



### Кореспонденција / Correspondence

Александра Кнежевић - Aleksandra Knežević  
[aleksandra.knezevic@med.bg.ac.rs](mailto:aleksandra.knezevic@med.bg.ac.rs)