

ГЕНОТИПИЗАЦИЈА HPV ВИРУСА RT-PCR МЕТОДОМ

Христина Господиновић,¹ Едита Грего,¹ Љиљана Павловић,¹
Марија Обрадовић,² Иван Чукић,² Верица Јовановић,¹ Софија Јовановић³

¹ Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут”, Београд, Србија

² Завод за здравствену заштиту студената, Београд, Србија

³ Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

HPV VIRUS GENOTYPING BY RT-PCR METHOD

Hristina Gospodinović,¹ Edita Grego,¹ Ljiljana Pavlović,¹
Marija Obradović,² Ivan Čukić,² Verica Jovanović,¹ Sofija Jovanović³

¹ Institute of Public Health of Serbia, “Dr. Milan Jovanović Batut,” Belgrade, Serbia

² Institute for Student Health Care, Belgrade, Serbia

³ Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Сажетак

Карцином грлића материце је други најчешћи тип канцера репродуктивних органа жена, односно трећи најчешћи малигни тумор код жена у свету глобално. Значај HPV генотипизације, методе којом се идентификују специфични HPV генотипови, препознат је последњих деценија као значајни инструмент раног откривања ризика за рак грлића материце. Последњих година направљен је такође велики напредак у разумевању молекуларне биологије HPV-а, развијен је велики број тестова и у току су истраживања повезаности са њиховом дијагностичком и терапијском употребом. У спроведеном истраживању за HPV генотипизацију коришћен је дијагностички кит произвођача *Sansure Biotech*. Овај тест садржи парове специфичних прајмера и специфичних флуоресцентних проба за генотипизацију 15 високоризичних HPV генотипова (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68). Од укупно 41 анализираних цервикалних бриса детектовано је 17 позитивних на 13 специфичних високоризичних HPV генотипова. Генотипови HPV 18 и HPV 52 нису детектовани у једном анализираним узорку, док су са највећом фреквенцом појављивања детектовани HPV 16 (14%) и HPV 31 (17%). Иако су резултати добијени на малом броју узорака, они свакако указују на значај примене наведеног метода детекције онкогених HPV варијанти, које указују на повећан ризик од настанка рака грлића материце код жена у програмима HPV скрининга у широј популацији.

Кључне речи: HPV, генотипизација, карцином грлића материце

Abstract

Cervical cancer is the second most common type of cancer of the female reproductive organs i.e., the third most common malignant tumor among women globally. The significance of HPV genotyping, a method used to identify specific HPV genotypes, has been recognized in recent decades as an important tool for the early detection of cervical cancer risk. In recent years, great progress has been made in understanding HPV molecular biology, a large number of tests have been developed, and there is ongoing research on the association between their diagnostic and therapeutic use. In the conducted research, a diagnostic kit manufactured by *Sansure Biotech* was used for HPV genotyping. This test comprises pairs of specific primers and specific fluorescent probes for genotyping 15 high-risk HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68). Out of a total of 41 cervical swabs analyzed, 17 were detected positive for 13 specific high-risk HPV genotypes. HPV 18 and HPV 52 genotypes were not detected in any analyzed sample, while HPV 16 (14%) and HPV 31 (17%) were detected with the highest frequency of occurrence. Although the results were obtained on a small number of samples, they have certainly indicated the importance of the application of the mentioned method for detecting oncogenic HPV variants that suggest an increased risk of cervical cancer in women in HPV screening programs in the wider population.

Key words: HPV, genotyping, cervical cancer

Увод

Карцином грлића материце је други најчешћи тип канцера репродуктивних органа жена, односно трећи најчешћи малигни тумор код жена широм света [1]. На основу података Светске здравствене организације (СЗО) 600.000 жена сваке године оболи и 340.000 умре, док у Србији 1237 жена годишње оболи а 551 умре од овог типа канцера [1, 2].

Introduction

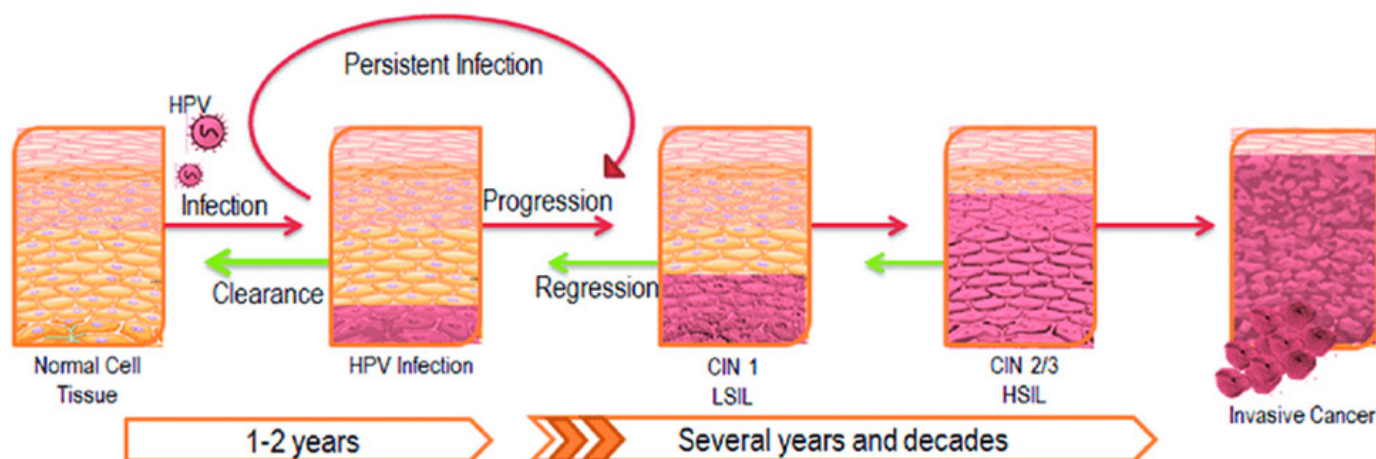
Cervical cancer is the second most common type of cancer of the female reproductive organs i.e., the third most common malignant tumor among women worldwide [1]. Based on data from the World Health Organization (WHO), 600,000 women are diagnosed with this type of cancer and 340,000 women die from the disease every year, while in Serbia there are 1,237 new cases and 551 cervical cancer deaths each year [1, 2].

Етиолошки фактор ризика за развој рака грлића материце је перзистентна високоризична HPV (*Human Papilloma Virus*) цервикална инфекција [3]. Хумани папилома вирус је дволанчани ДНК вирус, без омотача, величине од 50 до 55 nm у пречнику и дужине од ~8 kb [4]. Припада породици *Papillomaviridae* и данас је познато више од 200 генотипова, од којих 50 поседује потенцијал за инфекцију цервикалног епитела [3].

Постоје два могућа исхода постојеће HPV инфекције: излечење или прогресија, односно развој преканцерозног стања (слика 1) [3]. Већина инфекција је бенигна и нестаје код имунокомпетентних жена у периоду од једне до две године. Код 10% укупно инфицираних жена, након периода од 10 до 15 година перзистентне HPV инфекције грлића материце може доћи до промена на слузокожи грлића материце, које могу довести до појаве и развоја карцинома [3, 4, 5].

An etiological risk factor for the development of cervical cancer is persistent high-risk HPV (Human Papilloma Virus) cervical infection [3]. Human papillomavirus is a non-enveloped virus, containing double-stranded DNA, and is 50 to 55 nm in diameter and ~8 kb in length [4]. It belongs to the Papillomaviridae family, and more than 200 genotypes have been identified today, including 50 which have the potential to infect the cervical epithelium [3].

There are two possible outcomes of an existing HPV infection: clearance or progression i.e., the development of a precancerous condition (Figure 1) [3]. Most infections are benign and disappear in immunocompetent women within one to two years. In 10% of all infected women, after a period of 10 to 15 years of persistent HPV infection of the cervix, changes may occur in the cervical mucosa, which can lead to the formation and development of carcinoma [3, 4, 5].



Слика 1. Ток инфекције HPV вируса

Извор: Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection [6]

Figure 1. The course of HPV virus infection

Source: Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection [6]

На основу онкогеног потенцијала HPV генотипови се могу поделити на високоризичне и нискоризичне [7]. Данас је класификовано 16 високоризичних генотипова: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, од којих је 14 (искључујући генотипове 34 и 59) доведено у јаку узрочну везу са настанком карцинома грлића материце [8].

Based on the oncogenic potential, HPV genotypes can be divided into high-risk and low-risk ones [7]. Today, 16 high-risk genotypes have been classified: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, of which 14 (excluding genotypes 34 and 59) have demonstrated a strong causal relationship with the formation of cervical cancer [8].

Генотипови HPV 16 и 18 идентификовани су као посебно релевантни на основу њихове доминантности код карцинома грлића материце. Генотип HPV 16 одговоран је за развој 50–60% карцинома грлића материце, док је HPV 18 одговоран за 10–15% [9]. HPV 6 и 11 су типови ниског ризика, преовлађују као узрочници кондиллома, односно гениталних брадавица, и ретко изазивају лезије које напредују у карцином. Из тог разлога тестирање на нискоризичне типове HPV није од клиничког значаја [4, 10].

The HPV 16 and 18 genotypes have been identified as particularly relevant based on their predominance in cervical cancer. The HPV 16 genotype is responsible for the development of 50–60% of cervical cancers, while HPV 18 is responsible for 10–15% [9]. HPV 6 and 11 are low-risk types, predominant as the cause of condylomas i.e., genital warts, and rarely cause lesions that progress to cancer. For this reason, low-risk HPV testing is not of clinical importance [4, 10].

У преко 99% карцинома грлића материце детектована је инфекција неким од високоризичних HPV типова, тако да се присуство HPV-а високог ризика може користити као биомаркер за ову врсту неоплазме [3, 11].

За рано откривање стања преканцерозе примењује се скрининг метода дијагностике за промене на грлићу материце и детекција присуства различитих генотипова HPV-а применом методе RT-PCR. FDA (*Food and Drug Administration*) је 2014. године одобрила употребу RT-PCR HPV тестова за спровођење програма примарног скрининга карцинома грлића материце [5].

Значај HPV генотипизације, методе којом се идентификују специфични HPV генотипови, препознат је последњих деценија као дијагностички и скрининг метод за откривање ризика за настанак рака грлића материце и направљен је такође велики напредак у разумевању значаја молекуларне биологије HPV-а. Истовремено, развијен је велики број тестова за RT PCR HPV-а и у току су истраживања у вези са њиховом дијагностичком и терапијском употребом [3, 4]. Због веће осетљивости, HPV тестирање пружа мањи број лажно негативних резултата [5]. И поред велике употребе, неки од аспеката HPV тестирања су још увек неразјашњени, укључујући и оптимално тумачење позитивних резултата [5]. Један од развијених тестова *The Hybrid Capture 2 assay (HC2; Qiagen Inc., Gaithersburg, MD)*, одобрен од стране FDA, сматра се златним стандардом за детекцију 13 високоризичних HPV типова и годинама се користи као рутински скрининг тест [12]. Недостатак овог теста је немогућност идентификације специфичних HPV типова и немогућност детекције вишеструке инфекције. Ови недостаци су решени увођењем RT-PCR (*Real-time polymerase chain reaction*) тестова, односно тип-специфичних прајмера. Методе засноване на RT-PCR-у добијају све већу заступљеност и популарност у HPV дијагностици. Тај тренд се рефлектује и у примерима неколико аутоматизованих комерцијалних система, какав је Cobas 4800 HPV тест [12]. RT-PCR апарати који су данас доступни на тржишту поседују ограничен број канала за детекцију и самим тим немају могућност разликовања великог броја флуоресцентних боја, тако да је број генотипова који се могу детектовати ограничен. Овај проблем је делимично превазиђен додељењем унапред дефинисане температуре одвајања специфичних прајмера од ДНК матрице (*c-Tm-melting temperature*) за један тип HPV-а, чиме се омогућава детекција до пет различитих типова у једном каналу за детекцију [12].

У овом раду примењен је тест за генотипизацију који поседује могућност детекције четири HPV типа у јед-

In more than 99% of cervical cancer cases, infection by a high-risk type of HPV is detected, therefore, the presence of high-risk HPV can be used as a biomarker for this type of neoplasm [3, 11].

For the early detection of precancerous conditions, screening diagnostic methods for changes on the cervix and detection of the presence of different HPV genotypes using the RT-PCR method are applied. In 2014, the FDA (*Food and Drug Administration*) approved the use of RT-PCR HPV tests for the implementation of primary cervical cancer screening programs [5].

The importance of HPV genotyping, the method used to identify specific HPV genotypes, has been recognized in recent decades as a diagnostic and screening method for detecting the risk of cervical cancer, and great progress has been made in understanding the importance of HPV molecular biology. At the same time, there have been a large number of RT-PCR HPV tests developed as well as ongoing research regarding their diagnostic and therapeutic use [3, 4]. Due to higher sensitivity, HPV testing provides fewer false negative results [5]. Despite its widespread use, some aspects of HPV testing are still unclear, including the optimal interpretation of positive results [5]. One of the tests developed, *The Hybrid Capture 2 assay (HC2; Qiagen Inc., Gaithersburg, MD)*, approved by the FDA, is considered a gold standard in the detection of 13 high-risk HPV types and has been used as a routine screening test for years [12]. The disadvantage of this test is the inability to identify specific HPV types and the inability to detect multiple infections. These shortcomings have been overcome by introducing RT-PCR (*Real-time polymerase chain reaction*) tests i.e., type-specific primers. Methods based on RT-PCR are getting more represented and gaining increasing popularity in HPV diagnostics. This trend is also reflected in the examples of several automated commercial systems, such as the Cobas 4800 HPV test [12]. RT-PCR devices that are currently available on the market have a limited number of channels for detection and therefore lack the ability to distinguish a great number of fluorescent signals, so the number of genotypes that can be detected is limited. This problem has been partially overcome by assigning a predefined temperature of specific primers separation from the DNA matrix (*c-Tm-melting temperature*) for one type of HPV, thus enabling the detection of up to five different types in one detection channel [12].

In this paper, a genotyping test that has the ability to detect four HPV types in one channel was applied. The aim of this research was to determine the distribution of high-risk HPV genotypes in women aged 19 to 25 years.

ном каналу. Циљ овог истраживања је био одређивање дистрибуције високоризичних HPV генотипова код жена старосне доби од 19 до 25 година.

Материјали и методе

У оквиру Одсека за молекуларну микробиологију Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ урађена је студија која је обухватала 41 жену старосне доби од 19 до 25 година. Из цервикалних брисева рађена је метода генотипизације rRT-PCR методом за детекцију високоризичних типова HPV-а. Клинички материјал (брис цервикалних епителних ћелија) прикупљен је у медијуму *eSwab*, транспортован на температури до 25 °C и чуван на температури од 4 °C до пет дана, како је прописано протоколом произвођача примењеног RT-PCR теста *Sansure Biotech Inc.* [13, 14]. Студија је спроведена уз учешће Завода за здравствену заштиту студената Београд током јула 2022. године, где су узорци и прикупљени од стране специјалиста гинекологије и акушерства.

Добијени подаци су обрађени и релативним бројевима али и нумерички, табеларно и графиконима, уз пропратну дискусију. Дескрипција нумеричких обележја у раду урађена је класичним методама описне статистике.

Екстракција виралне ДНК

За екстракцију ДНК из цервикалних брисева примењен је кит за магнетну екстракцију RealLine DNA – Extraction 3 (*Bioron diagnostics*), на апарату KingFisher Duo Prime (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) [15, 16]. Изолована ДНК се даље користила за rRT-PCR реакцију.

rRT-PCR HPV генотипизација

За HPV генотипизацију коришћен је дијагностички кит High-Risk Human Papillomavirus DNA (Genotype) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) (*Sansure Biotech Inc.*) [14]. Овај тест садржи парове специфичних прајмера и специфичних флуоресцентних проба за генотипизацију 15 високоризичних HPV генотипова (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68). Позитивна контрола теста (*Positive control* – PC) је параметар квалитета колектованог узорка, указује на постојање инхибитора реакције и параметар је за процену ефикасности екстракције нуклеинских киселина. Детекција интерне контроле β-глобина (*β-globin*) хуманих ћелија се примењује да би се избегли лажно негативни резултати.

Резултати су валидни уколико је Ct вредност (*Cycle threshold* – Ct) позитивне контроле на свим каналима

Methods and materials

The study that included 41 women aged 19 to 25 was conducted within the Molecular Microbiology Department of the Institute of Public Health of Serbia "Dr. Milan Jovanović Batut." Cervical swabs were used for genotyping by applying the rRT-PCR method to detect high-risk HPV types. The clinical material (cervical epithelial cell swab) was collected in the *eSwab* medium, transported at a temperature of up to 25 °C and stored at a temperature of 4 °C for up to five days, as prescribed by the protocol of the manufacturer of the applied RT-PCR test, *Sansure Biotech Inc.* [13, 14]. The study was conducted in July 2022, with the participation of the Belgrade Institute for Student Health Care, where the samples were collected by specialists in gynecology and obstetrics.

The obtained data were processed by means of relative numbers as well as numerically, tabularly and graphically, including an accompanying discussion. The description of numerical features in the paper was done using standard methods of descriptive statistics.

Viral DNA extraction

In order to extract DNA from the cervical swabs, the magnetic extraction kit RealLine DNA - Extraction 3 (*Bioron diagnostics*) was used, on the KingFisher Duo Prime instrument (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) [15, 16]. The isolated DNA was further used for the rRT-PCR reaction.

rRT-PCR HPV genotyping

The High-Risk Human Papillomavirus DNA (Genotype) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) (*Sansure Biotech Inc.*) was used for HPV genotyping [14]. This test comprises pairs of specific primers and specific fluorescent probes for genotyping 15 high-risk HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68). Positive control of the test (*Positive control* - PC) is a parameter of the quality of the collected sample, indicating the existence of reaction inhibitors, and is a parameter for evaluating the efficiency of nucleic acid extraction. The detection of internal control of the human β-globin (*β-globin*) is applied to avoid false negative results.

The results are valid if a Ct value (*Cycle threshold* - Ct) of the positive control is between 24 and 30 in all channels, and if the negative control (*Negative control* - NC) has not been detected in any of the four channels. The results are positive when a Ct value of one of the target HPV genes in the patient samples was less than or equal to 39, with the presence of the internal control (*Internal control* - IC) with a Ct value ≤40. Retesting of samples in order to obtain valid results is necessary in case the values for PC, NC and

између 24 и 30, а негативна контрола (*Negative control* – NC) није детектована ни у једном од четири канала. Резултати су позитивни када је Ct вредност неког од таргетних HPV гена у узорцима пацијената била мања или једнака 39, уз присуство интерне контроле (*Internal control* – IC) са Ct вредношћу ≤ 40 . Ретестирање узорака у циљу добијања валидних резултата неопходно је у случају да вредности за PC, NC и IC не одговарају наведеним (табела 1) [14].

Табела 1. Ct вредности за позитивну и негативну контролу теста (*Sansure Biotech Inc.*) [14]

| | High-risk HPV-Positive Control | High-risk HPV-Negative Control |
|-------------------------|---|--|
| Ct вредност Ct value | 24 ≤ Ct ≤ 30 на каналу I in the channel FAM, HEX/VIC, ROX, CY5 | No Ct на каналу I in the channel FAM, HEX/VIC, ROX, CY5 |

Параметри циклуса за rRT-PCR износе: 50 °C – 2 минута, 94 °C – 5 минута, праћено са 45 циклуса од 94 °C – 15 секунди и 57 °C – 30 секунди. Примењени дијагностички кит детектује 15 HPV генотипова на четири канала и у сваком каналу поседује могућност детекције четири типа HPV-а (табела 2).

Табела 2. Специфични HPV генотипови и детекција на различитим RT-PCR каналима

| Канал Channel | HPV генотип HPV genotype | Ct вредност Ct value |
|------------------|-----------------------------|-------------------------|
| FAM | Type 16, 45, 51, 56 | ≤ 39 |
| HEX / VIC | Type 18, 59, 53, 58 | |
| ROX | Type 39, 35, 68, β-globin | |
| CY5 | Type 33, 66, 52, 31 | |

Статистичка анализа

Процентуална заступљеност позитивних и негативних резултата представљена је тортним графиком, док је проценат заступљености детектованих HPV генотипова представљен Паретовим дијаграмом, коришћењем програма *Microsoft Office Excel 365 software (Microsoft Inc, Redmond, WA)*.

Резултати

Од укупно 41 анализираног цервикалног бриса детектовано је 17 (41%) позитивних на 13 специфичних ви-коризичних HPV генотипова (графикон 1а). Генотипови HPV 18 и 52 нису детектовани ни у једном анализираном узорку, док су HPV 16 и HPV 31 генотипови са највећом фреквенцијом појављивања (табела 3). Од укуп-

IC do not correspond to those mentioned above (Table 1) [14].

Table 1. Ct values for the positive and negative controls of the test (*Sansure Biotech Inc.*) [14]

The cycle parameters for rRT-PCR were as follows: 50 °C - 2 minutes, 94 °C - 5 minutes, followed by 45 cycles of 94 °C - 15 seconds and 57 °C - 30 seconds. The applied diagnostic kit detects 15 HPV genotypes in four channels and it has the ability to detect four types of HPV in each channel (Table 2).

Table 2. Specific HPV genotypes and detection in different RT-PCR channels

Statistical analysis

The percentage of positive and negative results is presented by a pie chart, while the percentage of the detected HPV genotypes is shown by a Pareto chart, using *Microsoft Office Excel 365 software (Microsoft Inc, Redmond, WA)*.

Results

Out of a total of 41 cervical swabs analyzed, 17 (41%) positive for 13 specific high-risk HPV genotypes were detected (Chart 1a). The HPV 18 and 52 genotypes were not detected in any of the analyzed samples, while HPV 16 and HPV 31 were the genotypes with the highest frequency of occurrence (Table 3). Out of the total number of positive results obtained, the HPV 16 and HPV 31 genotypes were

ног броја добијених позитивних резултата, генотипови HPV 16 и HPV 31 су детектовани у 11 позитивних узорка, односно заједно чине 64% добијених позитивних резултата.

detected in 11 positive samples i.e., together they make up 64% of the positive results obtained.

Табела 3. Преваленца HPV генотипова у анализираним узорцима

Table 3. Prevalence of HPV genotypes in the analyzed samples

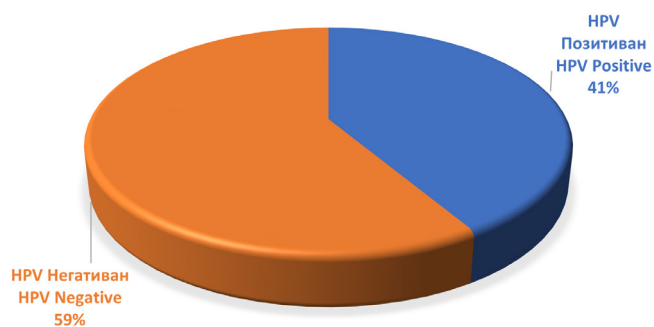
| HPV | 16 | 18 | 31 | 33 | 35 | 39 | 45 | 51 | 52 | 53 | 56 | 58 | 59 | 66 | 68 |
|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Број узорка Number of samples | 5 | / | 6 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | / | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 |

Подједнак удео показују генотипови HPV 45, 51, 53, 56 и 59 од којих је сваки детектован у по три позитивна узорка, затим генотипови HPV 58 и 66 чије је присуство детектовано у по два позитивна узорка и генотипови HPV 33, 35, 39 и 68 са најмањим уделом и детекцијом у по једном узорку. Фреквенција заступљености узорка приказана је у процентима (графикон 1б).

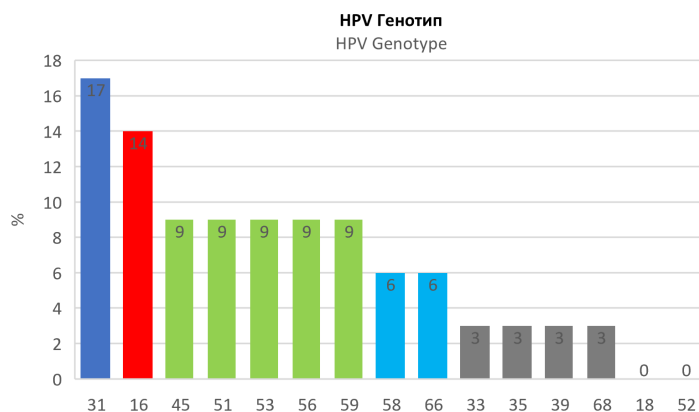
An equal share is shown by the HPV 45, 51, 53, 56 and 59 genotypes, each of which was detected in three positive samples, followed by the HPV 58 and 66 genotypes, whose presence was detected in two positive samples respectively, and by the HPV 33, 35, 39 and 68 genotypes with the smallest share and respective detection in one sample. The frequency of representation of the samples is shown in percentages (Chart 1b).

Графикон 1. а) процентуална заступљеност позитивних и негативних узорка добијених методом RT-PCR генотипизације б) процентуална заступљеност сваког од детектованих HPV генотипова у односу на укупан број добијених позитивних резултата.

Chart 1. a) the percentage of positive and negative samples obtained by the RT-PCR genotyping method b) the percentage of each of the detected HPV genotypes in relation to the total number of positive results obtained.



а / а)



б / б)

Дискусија

Испитивање дистрибуције HPV генотипова у свету показало је да је најчешћи HPV тип код појединачних или вишеструких инфекција – HPV 16, а затим HPV 42, HPV 58, HPV 31, HPV 18, HPV 56, HPV 81, HPV 35, HPV 33, HPV 45 и HPV 52 [17]. На основу података добијених у бројним истраживањима у Европи, HPV 16 је био присутан у 25,5% случајева, а затим HPV 31 (9%) [17]. Резултати студије рађене у региону која је обухватала укупно 406 жена узраста од 19 до 83 године, са разли-

Discussion

Analysis of the distribution of HPV genotypes in the world has shown that the most common HPV type in single or multiple infections is HPV 16, followed by HPV 42, HPV 58, HPV 31, HPV 18, HPV 56, HPV 81, HPV 35, HPV 33, HPV 45, and HPV 52 [17]. Based on data obtained in numerous studies in Europe, HPV 16 was present in 25.5% of cases, followed by HPV 31 (9%) [17]. The results of a study conducted in the region, which included a total of 406 women aged 19 to 83, with different pathohistological diagnoses,

читим патохистолошким дијагнозама, указали су на високу преваленцу генотипа HPV 16 који је био присутан у чак 59,2% укупно анализираних узорака, док је преваленца осталих високоризичних генотипова била следећа: HPV 31 (12,6%), HPV 18 (6,7%), HPV 33 (6,1%), HPV 52 (5,6%) и HPV 58 (5,0%) [18]. У другој студији рађеној у региону која је обухватала 189 жена, узраста од 20 до 68 година, резултати су показали да је генотип HPV 16 присутан са највећом преваленцом од 36,8%, други по учесталости генотип био је HPV 58 (10,5%), док је HPV 31 био присутан у 7,9% укупно анализираних узорака [19].

Кнежевић и сарадници спровели су студију у којој су учествовале 204 младе жене (узраста од 19 до 31 године) и студија је показала да је преваленца високоризичних генотипова у Србији слична као и у Европи (64,1%), као и присуство најчешћег типа HPV 16 (23%), док високоризични HPV 18, као и генотип HPV 52 нису детектовани у наведеној студији [20].

Резултати свих наведених истраживања су показали да се највећа преваленца високоризичног генотипа односи на генотип HPV 16. У свету нешто нижу стопу заступљености показују HPV 42, HPV 58, HPV 31 и HPV 18, док је у региону детектована већа заступљеност генотипа HPV 31 са најмањом учесталости генотипа HPV 18. У овом истраживању, где су најчешће детектовани генотипови HPV 31 и HPV 16, резултати показују сличност са резултатима добијеним у региону, уз ограничење које настаје због малог броја анализираних узорака.

Закључак

RT-PCR тест примењен у изведеној студији детектује 15 HPV генотипова на четири различита канала. Наведени резултати омогућавају вишеструке информације о анализираном узорку, тј. испитиваној популацији младих жена. Предност примењеног теста је велика нарочито зато што поред детекције омогућава и HPV типизацију, односно идентификацију HPV генотипа који се могу довести у везу са ризиком за настанак карцинома грлића материце.

На основу добијених података може се закључити да су доминантни генотипови изоловани из брисева у женској популацији обухваћеној истраживањем, узраста 19 до 25 година, HPV 16 (14%) и HPV 31 (17%), док HPV 18 и HPV 52 нису детектовани у анализираним узорцима. Подаци добијени у овом раду уједно потврђују да је висок проценат жена узраста до 25 година инфициран неким од генотипова HPV-а.

indicated a high prevalence of the HPV 16 genotype, which was present in as many as 59.2% of the total analyzed samples, while the prevalence of other high-risk genotypes was as follows: HPV 31 (12.6%), HPV 18 (6.7%), HPV 33 (6.1%), HPV 52 (5.6%) and HPV 58 (5.0%) [18]. In another study conducted in the region that included 189 women, aged 20 to 68 years, the results showed that the HPV 16 genotype was present with the highest prevalence of 36.8%, the second most common genotype was HPV 58 (10.5%), while HPV 31 was present in 7.9% of all the samples analyzed [19].

Knežević et al. conducted a study that included a sample of 204 young women (aged 19 to 31) and the study has shown that the prevalence of high-risk genotypes in Serbia is similar to that in Europe (64.1%), including the presence of the most common HPV 16 type (23%), while the high-risk HPV 18 genotype, as well as HPV 52, were not detected in the mentioned study [20].

The results of all the aforementioned studies have shown that the highest prevalence of high-risk genotypes refers to the HPV 16 genotype. In the world, HPV 42, HPV 58, HPV 31, and HPV 18 show a slightly lower prevalence rate, while in the region a higher prevalence of the HPV 31 genotype has been detected with the lowest frequency of the HPV 18 genotype. In this study, where the HPV 31 and HPV 16 genotypes were the most common ones detected, the results have been similar to the findings obtained in the region, with a limitation arising from the small number of analyzed samples.

Conclusion

The RT-PCR test applied in the conducted study detects 15 HPV genotypes in four different channels. The above results provide multiple information about the analyzed sample i.e., the examined population of young women. The advantage of the applied test is great, especially because, in addition to detection, it also enables HPV typing i.e., the identification of HPV genotypes that can be associated with the risk of cervical cancer.

On the basis of the obtained data, it can be concluded that the dominant genotypes isolated from swabs in the female population, aged 19 to 25 years, included in the research are HPV 16 (14%) and HPV 31 (17%), while HPV 18 and HPV 52 were not detected in the analyzed samples. The data obtained in this paper also confirm that a high percentage of women under the age of 25 are infected with some of the HPV genotypes.

Although this very specific and informative test has been

Иако је до сада овим веома специфичним и информативним тестом урађена анализа дистрибуције генотипова на малом броју узорака, може се јасно увидети неопходност тестирања већег броја жена старосне доби од 30 до 60 година у циљу раног откривања и превенције карцинома грлића материце изазваног HPV вирусом. Тестирање млађих жена је такође важан показатељ репродуктивног здравља младе популације и препознавања потребе за додатним интервенцијама у области превенције сексуално преносивих инфекција и здравственог васпитања.

used so far to analyze the distribution of genotypes on a small number of samples, it can be clearly seen that it is necessary to test a greater number of women aged 30 to 60 with the aim of early detection and prevention of cervical cancer caused by the HPV virus. Testing of younger women is also an important indicator of the reproductive health of the young population and of recognition of the need for additional interventions in the area of prevention of sexually transmitted infections and in the field of health education as well.

Литература / References

1. Burmeister AC, Khan FS, Schäfer G, Mbatani N, Adams T, Moodley J, Prince S. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Research*. 2022; 13: 200238. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2022.200238>.
2. Kovacevic G, Milosevic V, Nikolic N, Patric A, Radovanov J, Hrnjakovic Cvjetkovic I, Petrovic V, Petrovic M. The prevalence of 30 HPV genotypes detected by EUROArray HPV in cervical samples among unvaccinated women from Vojvodina province, Serbia. *PLoS ONE*. 2021; 16(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249134>
3. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2007. 90 : 1-636. PMID 18354839.
4. Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *J Gynecol Oncol*. 2016; 27(2):e21. <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e21>
5. Demarco M, Hyuna N, Carter-Pokras O, Raine-Bennett TR, Cheung L, Chen X, Hammer A, Campos N, et al. A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine*. 2020; 22: 100293. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100293>
6. Shanmugasundaram S, You J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. 2017. 9(8): 229. <https://doi.org/10.3390/v9080229>
7. Harlé A, Guillet J, Thomas J, Sastre-Garau X, Rouyer M, Ramacci C. Evaluation and validation of HPV real-time PCR assay for the detection of HPV DNA in oral cytobrush and FFPE samples. *SCIENTIFIC REPORTS*. 2018; 8:11313. DOI:10.1038/s41598-018-29790-z
8. Bihl MP, Tornillo L, Kind AB, Obermann E, Noppen C, Chaffard R, Wynne P, Grilli B, Foerster A, Terracciano LM, Hoeller S. Human Papillomavirus (HPV) Detection in Cytologic Specimens: Similarities and Differences of Available Methodology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017; 25(3):184–189. doi: 10.1097/PAI.0000000000000290
9. Cuzick J, Adcock R, Wheeler CM. HPV genotype-specific risk for cervical cancer. 2021 www.HPVWorld.com.
10. Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol*. 2010. 5(10): 1493–1506. DOI: 10.2217/fmb.10.107
11. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. 2021; 13: 321. <https://doi.org/10.3390/v13020321>
12. Liao Y, Zhou Y, Guo Q, Xie X, Luo E, Li J, Li Q. Simultaneous Detection, Genotyping, and Quantification of Human Papillomaviruses by Multicolor Real-Time PCR and Melting Curve Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(2): 429–435. doi: 10.1128/JCM.02115-12
13. Copanusa, dostupno na: <https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/eswab/>. Pristupljeno: 25.8.2022.

14. Sansureglobal, dostupno na / *available at*: <https://www.sansureglobal.com/product/s3027e-hpv-g15/#:~:text=This%20High%2Drisk%20HPV%20DNA,exfoliated%20cells%20from%20females'%20cervix.> Pristupljeno: 25.8.2022.
15. Bioron, dostupno na / *available at*: https://www.bioron.de/ifufiles/IFU_Express_VBC8899_Rev09_0919_EN.pdf. Pristupljeno: 23.8.2022.
16. Thermofisher, dostupno na / *available at*: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/kingfisher-duo-prime-purification-system-brochure.pdf>. Pristupljeno: 22.8.2022.
17. Clifford G, Franceschi S, Diaz M. Chapter 3: HPV Type-Distribution in Women with and without Cervical Neoplastic Diseases. *Vaccine*. 2006; 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.026>
18. Karadza M. Molekularna analiza humanih papilomavirusa i inačica HPV 16 u bolesnica s cervikalnom intraepitelnom lezijom visokog stupnja i karcinomom vrata maternice. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet. 2021. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:035394>
19. Vujošević D, Vuksanović V, Poljak M, Jokmanović N. Human papillomavirus genotype spectrum in studied group of Montenegrin women. *Acta Medica*, 2012. 55: 130–132.
20. Knezevic A, Aleksic G, Soldatovic I, Banko A, Jovanovic T. cervical human papillomavirus infection in Serbia: risk factors, prevalence and genotype distribution in women with normal cervical cytology. *Arch. Biol. Sci.* 2012; 64 (4): 1277–1283. DOI:10.2298/ABS1204277K



Кореспонденција / Correspondence

Христина Господиновић - Hristina Gospodinović
hristina_gospodinovic@batut.org.rs