Роля на ранното диагностициране и лечение на инфекцията с човешки папиломен вирус в устната кухина

Role of early diagnosis and management of human papilloma virus infection in the oral cavity

М. Милков¹, П. Недев², И. Ценев³, Ц. Тончев¹,
Д. Марев², Х. Маджова¹, Д. Конов³

¹Факултет по дентална медицина, МУ – Варна

²Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна

³Катедра по УНГ-болести на МФ на МУ – София

M. Milkov, P. Nedev, I. Tsenev, Ts. Tonchev,
D. Marev, H. Madzhova, D. Konov

Резюме

Ранната диагностика на оралната инфекция с човешки папиломен вирус (human papilloma virus, HPV) е предпоставка за своевременното и адекватно лечебно поведение при тези болни. В настоящия обзор се обсъждат някои основни диагностични методи, прилагани през последните години. Имат се предвид полимеразната верижна реакция (конвенционална и с примери) за ДНК на HPV, генотипизацията, *in situ* хибридизацията, имунохистохимията, серологията за антитела, специфични за HPV, тестът за захващане на хибрид-II и четковата биопсия. Болните с плоскоклетъчен орофарингеален рак представляват значителен интерес. При тях може да се прилагат химиотерапия (с цисплатин, цетуксимаб или рапамидин), лъчелечение, проантоцианидини и др.

Ключови думи: човешки папиломен вирус, орална инфекция, диагностика, химиотерапия, лъчелечение

Abstract

Early diagnosis of the oral infection with human papilloma virus (HPV) infection a precondition for the timely and adequate therapeutic behaviour in these patients. In the present survey, some recently applied basic diagnostic methods are discussed. The following methods are considered: polymerase chain reaction, both conventional and with primers, for HPV-DNA, genotyping, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, serology for HPV-specific antibodies, Hybrid Capture II test, and brush biopsy as well. The patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma represent a considerable interest. In them, chemotherapy (with cisplatin, cetuximab or rapamycin, radiotherapy, proanthocyanidins, etc. can be administered.

Key words: human papilloma virus, oral infection, diagnosis, chemotherapy, radiotherapy

Ранната диагностика на оралната инфекция с човешки папиломен вирус (HPV) е от несъмнено значение за ефективното лечение на заболяванията, свързани с този патоген. Понастоящем се използват предимно няколко основни метода: полимеразна верижна реакция (конвенционална и с примери) за ДНК на HPV и генотипизация, *in situ* хибридизация, имунохистохимия, серология за антитела, специфични за HPV, тест за захващане на хибрид-II и четкова биопсия.

Понастоящем в Полша се разработват подходящи биомаркери за оценка на HPV в клинични условия при заболявания, свързани с HPV, и съответен диагностичен алгоритъм (31).

Приложение на методите за диагностика на оралната инфекция с HPV

Проведено е съпоставително изследване на шест метода за идентифициране на високорискови HPV, основани на усилването на сигнала или на полимеразната верижна реакция, при 68 болни с инвазивен орален/орофарингеален плоскоклетъчен рак и при 10 препарати от сливици (12).

Ролята на HPV за развитието на плоскоклетъчния рак на главата и шията е проучена с помощта на теста за генотипизация в линейна редица на Roche,

разграничаващ общо 37 различни типа на вируса (16). Оралната инфекция с HPV е проучена при студенти чрез генотипизиране на HPV 16 и други 36 алфа-генотипа с помощта на полимеразна верижна реакция (5). Честотата на инфекцията с високорискови типове на HPV при болни деца на възраст между 2 и 11 г. и ученици на възраст между 12 и 17 г. в Невада, САЩ, е изследвана в слюнката с помощта на полимеразна верижна реакция. HPV 16 се открива при два, а HPV 18 – при един ученик, като общата честота на оралната инфекция с HPV възлиза на 2,5% от 118 случая (8).

Проведено е съпоставително изследване на диагностичната стойност на обичайната и гнездовата полимеразна верижна реакция за ДНК на HPV в слюнката на 43 сексуално активни жени. Честотата на ДНК на HPV при първия метод е 11,6%, а при втория – 44,2% от случаите. Всички положителни проби при първия метод са при петте жени с цитологични находки, като при тях рискът за установяване на HPV в слюнката по гнездовия метод е с 8,5 пъти по-голям ($p = 0,009$) (1). ДНК на 36 типа на HPV с помощта на полимеразна верижна реакция, опосредствана с комплекта от праймери MY09/MY11, в излющени орални епителни клетки на 379 лица, положителни за HIV и при 266 рискови лица, отрицателни за HIV. Оралната инфекция с HPV е сравнително честа – при 34% от случаите, като HPV 16 се среща при 5,7% от тях. Счита се, присъствието на HIV влияе върху развитието на оралната инфекция с HPV (2). Проведено е изследване на 53 биопсии от 31 болни с орални верукозни и папиларни увреждания с помощта на полимеразна верижна реакция, насочена към гена L1 на HPV и последвана от хибридизация *in situ* за идентифициране на типовете на HPV. Докато 15 биопсии (28,3%) са положителни за гена L1 (58,8%, от които при злокачествените и 13,9% – при доброкачествените верукозни лезии), само 8 (15,1%) са идентифицирани чрез хибридизация *in situ* (9).

Проведено е проучване на честотата на инфекцията с високорисковите типове HPV 16 и HPV 18 (с полимеразна верижна реакция) и експресията на TP53 (с имунохистохимични методи) при 94 болни с хистологично потвърден плоскоклетъчен рак на езика. Общо 20% от тях на възраст под 45 г. HPV 16 се установява при 10,6%, а HPV 18 – при 16% от случаите. При 70,2% от болните е налице свръхекспресия на TP53 (25).

Честотата на оралната инфекция с HPV е анализирана в рамките на крос-секционно проучване върху 60 болни с плоскоклетъчен рак на езика и при 46 лица с нормална лигавица на устната кухина посредством полимеразна верижна реакция с примери, специфични за HPV 16, чрез имунохистохимия за p16 (p16 IHC) и чрез *in situ* хибридизация. HPV 16 се идентифицира чрез полимеразна верижна реакция при 29 болни (48% от случаите), но не и при контролните лица ($p < 0,001$), при 18 болни (33% от случаите) – чрез p16 IHC, а при 10 болни (18% от случаите) – едновременно чрез двата метода (6).

Честотата на високорисковите HPV е проучена при 208 болни с орална субмукозна фиброза (потенциално пренеопластично заболяване) и 222 болни с орален плоскоклетъчен рак в Индия през периода от м. септември 2007 г. до м. март 2010 г. с помощта на теста за захващане на хибрид-II (HC-II) и на полимеразната верижна реакция. Е6 ДНК на HPV 16 се открива при почти 26% от случаите с орална субмукозна фиброза чрез полимеразната верижна реакция и при 27,4% от случаите – чрез HC-II, както и при 32,4% от случаите с орален плоскоклетъчен рак и при 31,4% от случаите – чрез HC-II. Двата метода показват съвпадение на 42 положителни и 154 отрицателни резултати (или общо при 85,4% от случаите с орална субмукозна фиброза). Чувствителността им е 73,7%, а специфичността – 92,05%. Налице е съвпадение между двата метода по отношение на 61 положителни и 152 отрицателни резултати при болните с орален плоскоклетъчен рак или при общо 88,3% от случаите. Чувствителността им е 87,14%, а специфичността – 92,76% (3). Установява се, че честотата на високорисковите HPV при 105 болни с орална субмукозна фиброза, проучена с помощта на теста за захващане на хибрид-II (HC-II), е 31,4% (18).

Инфекцията с HPV е диагностицирана при 57 болни с орални преканцерози и 50 болни с орален плоскоклетъчен рак с помощта на полимеразна верижна реакция с примерите MY09/MY11 и Gp5±Gp6 и на генотипизиране с микроредица на базата на тази реакция. Извършено е и имунохистохимично оцветяване за p16(INK4a). Положителни за HPV са 28 (96,6% от случаите) с инфекция на маточната шийка при полимеразната верижна реакция, а 24 (82,8% от случаите) – при генотипизирането. ДНК на HPV се уста-

новява с помощта на полимеразната верижна реакция при 9 (15,8% от случаите) с орални преканцерози и при 6 (12,0% от случаите) с орален плоскоклетъчен рак. Чрез генотипизирането се идентифицират шест (10,5% от случаите) с орални преканцерози и три (6,0% от случаите) с орален плоскоклетъчен рак. При общо 22,4% от случаите са налице положителни резултати за HPV – при 26,3% от болните с орални преканцерози и при 18,0% от тези с орален плоскоклетъчен рак. Общо 15 от болните с орални преканцерози (26,3%) и 8 (16,0%) от тези с орален плоскоклетъчен рак са положителни за p16(INK4a) (10).

ДНК е изследвана в слюнката на 151 здрави лица във факултет по дентална медицина в САЩ с помощта на полимеразна верижна реакция за скрининг на двата високорискови типове на HPV – HPV 16 и HPV 18. HPV 16 се установява при 4 жени от испански произход, три от които на възраст под 65 г., докато всички резултати за HPV 18 са отрицателни (29).

Идентифицирането на HPV в натривки от оралната лигавица е извършено с полимеразна верижна реакция при 166 хомосексуални мъже с налична HIV-инфекция, проследени в продължение на 6 месеца (22). Полимеразната верижна реакция, опосредствана с комплекта от праймъри MY09/MY11, е използвана за идентифициране на ДНК на различни генотипове на HPV (4). Честотата на HPV е проучена при 53 болни с рак на устната кухина и при 22 болни с орофарингеален рак с помощта на теста за генотипизация в линейна редица на Roche, разграничаващ общо 37 различни типа на вируса (16).

Плоскоклетъчният рак на сливиците на езика и небцето се диагностицира посредством *in situ* хибридизация, полимеразната верижна реакция и имунохистохимия на p16 (17). Честотата, фенотипът и физическият статус на HPV са проучени при 36 болни с ранен плоскоклетъчен рак на езика в стадий T1 и T2 и при 25 контролни лица с помощта на полимеразната верижна реакция и генотипизиране. HPV 16 е най-честият тип при тези болни и се счита за един от възможните етиологични фактори за този рак, свързан с дълбочината на раковата инвазия (14). Честотата на инфекцията с високорискови HPV е изследвана при 26 болни с рак на устната

кухинна, 45 болни с орофарингеален рак и 10 болни с рак на хипофаринкса в Източна Австрия с помощта на имунохистохимия, полимеразна верижна реакция и *in situ* хибридизация (15).

Проведено е генотипизиране на HPV при 106 болни с плоскоклетъчен рак на главата и шията с кита Multimetrix®. Установява се, че 50% от мъжете са положителни за ДНК на HPV, като при 25% от тях се касае за инфекция с множество типове на HPV. Съответните стойности при жените са 72% и 31%. При 20,5% от случаите се касае за нискорискови типове на HPV. Болните, които не са подложени на химиотерапия и са носители на комбинирана инфекция на HPV с HSV-1, както и тези с нискорискови типове на HPV, подложени на радиотерапия, са с лоша прогноза (23).

В рамките на проучване „случай-контрола“ върху 325 болни с рак на устната кухина и 335 контроли без раково заболяване се установява, че серологично положителната находка за HPV 16 е свързана с повишен риск от орален рак. При комбинирането на генотиповете гените, свързани с p53, на нискорисковите полиморфизми със отрицателната серологична находка за HPV 16 се открива нисък риск за орален рак, докато нискорисковите, среднорисковите и високорисковите групи и положителната серологична находка за HPV 16 се открива статистически значимо по-висок риск за орален рак, особено при помлади индивиди (на възраст под 50 г.) и при хора, които никога не са пушили (30).

Наличието на ДНК на HPV е проучено в смивове от устата и серуми на 142 болни с орофарингеални и орални тумори. Като цяло, 59,2% от туморите са положителни за HPV, което корелира с установените серумни антитела, специфични за HPV. След едногодишно лечение се установява негативизиране на HPV-положителните смивове от устата при 84,8% от 66-те болни, докато средните стойности на титрите на онкопротеините E6 и/или E7 към HPV 16 продължават да бъдат статистически значимо по-ниски (13). Съчетаването на инфекцията с HPV с други рискови фактори за рак на главата и шията като тютюнопушене и алкохолизъм е анализирано при 201 болни с рак и 324 контролни лица с помощта на антитела 16, 18, 31 и 33 срещу вирусоподобните частици на HPV (27).

Експресията на p16 при 95 болни с плоскоклетъчен орофарингеален рак, положителен за HPV, е изследвана върху биопсични материали преди проведеното лечение с помощта на имунохистохимия, а високорисковите генотипове (както HPV 16 и HPV 18, така и подтиповете 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 и 68) – с полимеразна верижна реакция в реално време. Общо 59 тумора (62 %) са положителни за експресията на p16, а 50 (53%) – за познатите високорискови типове на HPV (21). Експресията на p16(INK4A), заместител на инфекцията с HPV и активирането на пътя на Akt-mTOR, са анализирани с помощта на международна тъканна микроредица за плоскоклетъчния рак на главата и шията, при болни, които са положителни или отрицателни за HPV (19).

ДНК на HPV е проучена в клетки от четкови биопсии и в биопсии, включени в парафин, от 83 последователни имунологично компетентни болни с орален плоскоклетъчен рак в Италия, с помощта на полимеразна верижна реакция, последвана от директно секвенциране на ДНК и генотипизиране на HPV чрез INNO-LiPA. ДНК на HPV се открива в четковите биопсии при 13 от болните (15,7%) и в другите биопсии – при 10 от болните (12,1% от случаите) ($p > 0,05$). Най-честите генотипове са HPV 51, HPV 16 и HPV 39 (28).

В рамките на крос-секционно проучване са анализирани четкови биопсии от болни с различни увреждания на орофаринкса в САЩ за наличието на инфекция с HPV 16 с използването на типово-специфична и/или полимеразна верижна реакция с примери. Налице е асоциация между самостоятелното присъствие на HPV 16 или съчетаването му с цитологични аномалии, от една страна, и орофарингеалния плоскоклетъчен рак, от друга (7).

Лечение на оралната инфекция с HPV

Болните с орофарингеален рак, положителен за HPV 16, се влияят по-добре от химиотерапията и лъчелечението, отколкото болните с това заболяване, отрицателно за HPV 16 (17). Проучването върху четири HPV-положителни и 14 HPV-отрицателни клетъчни линии на плоскоклетъчния рак на главата и шията показва

по-голяма резистентност спрямо цисплатин на HPV-положителните, отколкото на HPV-отрицателните линии. От друга страна, няма разлика между ефекта от приложението на цетуксимаб и лъчелечението. Предполага се, че благоприятната прогноза при болните с HPV-положителен плоскоклетъчен рак на главата и шията не е свързана с присъщата на тези туморни клетки чувствителност към химиотерапията или лъчелечението *in vitro* (20).

При повечето случаи на плоскоклетъчен рак на главата и шията, положителни за инфекцията с HPV, е налице активиране на пътя на mTOR, поради което инхибирането на mTOR с рапамицин и RAD001 *in vivo* намалява значително туморното натоварване и може да се използва като прицелен подход при лечението на злокачествените заболявания, свързани с HPV (19).

При 29 от болните с орофарингеален рак е приложено или само лъчелечение, или комбинирано лъчелечение с цисплатин или с цетуксимаб. Общо 11 от консервативно лекуваните болни са положителни, а останалите 18 са отрицателни за HPV. При болните, положителни за HPV, се постига много по-добър резултат, по-добра обща ($p = 0,015$) и безсимптомна преживяемост ($p = 0,001$) след комбинираната терапия, отколкото при тези, които са отрицателни за HPV (15).

Количествените характеристики на влиянието на проантоцианидина от растителен произход върху клетъчната пролиферация, модулирана от HPV 16, при оралния плоскоклетъчен рак са обект на редица изследвания *in vitro*. Предполага се, че назначаването на проантоцианидин може да предизвика апоптоза на клетъчните линии при рака на устната кухина, потискайки пролиферацията на нормалните контролирани клетъчни линии, което представлява потенциален терапевтичен подход при това заболяване (11). Установява се, че екстрактите от люспите и семките на зърната от грозде и черните малини съдържат високи концентрации на проантоцианидин, който потиска избиращо туморогенните фенотипове на оралния рак и по-специално – на оралния плоскоклетъчен рак (24, 26).

Литература

- Adamopoulou, M., E. Vairaktaris, E. Nkenke, D. Avgoustidis, P. Karakitsos, V. Sioulas, et al. Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women.- *Gynecol. Oncol.*, 129, 2013, No 2, 395-400.
- Beachler, D. C., K. M. Weber, J. B. Margolick, H. D. Strickler, R. D. Cranston, R. D. Burk, et al. Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults.- *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 21, 2012, No 1, 122-133.
- Chaudhary, A. K., S. Pandya, R. Mehrotra, A. C. Bharti, M. Singh, M. Singh. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma.- *Virol. J.*, 7, 2010 Sep 23, 253. doi: 10.1186/1743-422X-7-253.
- Durzyńska, J., J. Pacholska-Bogalska, M. Kaczmarek, T. Hanć, M. Durda, M. Skrzypczak, et al. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland.- *Eur. J. Pediatr.*, 170, 2011, No 6, 757-761.
- Edelstein, Z. R., S. M. Schwartz, S. Hawes, J. P. Hughes, Q. Feng, M. E. Stern, et al. Rates and determinants of oral human papillomavirus infection in young men.- *Sex. Transm. Dis.*, 39, 2012, No 11, 860-867.
- Elango, K. J., A. Suresh, E. M. Erode, L. Subhadradevi, H. K. Ravindran, S. K. Iyer, et al. Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma.- *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 12, 2011, No 4, 889-896.
- Fakhry, C., B. T. Rosenthal, D. P. Clark, M. L. Gillison. Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal „pap-test equivalent“ in high-risk populations.- *Cancer Prev. Res. (Philadelphia)*, 4, 2011, No 9, 1378-1384.
- Flake, C., J. Arafa, A. Hall, E. Ence, K. Howard, K. Kingsley. Screening and detection of human papillomavirus (HPV) high-risk strains HPV16 and HPV18 in saliva samples from subjects under 18 years old in Nevada: a pilot study.- *BMC Oral Health*, 12, 2012 Oct 22, 43.
- Hwang, C. F., C. C. Huang, C. Y. Chien, S. C. Huang, C. H. Yang, C. Y. Su. Human papillomavirus infection in oral papillary and verrucous lesions is a prognostic indicator of malignant transformation.- *Cancer Epidemiol.*, 36, 2012, No 2, e122-e127.
- Ishibashi, M., M. Kishino, S. Sato, E. Morii, Y. Ogawa, K. Aozasa, et al. The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control.- *Int. J. Clin. Oncol.*, 16, 2011, No 6, 646-653.
- King, M., K. Chatelain, D. Farris, D. Jensen, J. Pickup, A. Swapp, et al. Oral squamous cell carcinoma proliferative phenotype is modulated by proanthocyanidins: a potential prevention and treatment alternative for oral cancer.- *BMC Complement. Altern. Med.*, 7, 2007 Jun 19, 22.
- Kingma, D. W., R. A. Allen, S. K. Caughron, M. Melby, W. E. Moore, E. M. Gillies, et al. Comparison of molecular methods for detection of HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.- *Diagn. Mol. Pathol.*, 19, 2010, No 4, 218-223.
- Koslubova, E., E. Hamsikova, M. Salakova, J. Klotzar, E. Foltynova, E. Salkova, et al. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors.- *Int. J. Cancer*, 2013 Apr 6. doi: 10.1002/ijc.28194.
- Lee, S. Y., N. H. Cho, E. C. Choi, S. J. Baek, W. S. Kim, D. H. Shin, et al. Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer.- *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 39, 2010, No 7, 678-683.
- Lill, C., G. Kornek, B. Bachtary, E. Selzer, C. Schopper, M. Mittlboeck, et al. Survival of patients with HPV-positive oropharyngeal cancer after radiochemotherapy is significantly enhanced.- *Wien. Klin. Wochenschr.*, 123, 2011, No 7-8, 215-221.
- Machado, J., P. P. Reis, T. Zhang, C. Simpson, W. Xu, B. Perez-Ordóñez, et al. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas.- *Head Neck Oncol.*, 2, 2010 Mar 12, 6. doi: 10.1186/1758-3284-2-6.
- Marur, S., G. D'Souza, W. H. Westra, A. A. Forastiere. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic.- *Lancet Oncol.*, 11, 2010, No 8, 781-789.
- Mehrotra, R., A. K. Chaudhary, S. Pandya, S. Debnath, M. Singh, M. Singh. Correlation of addictive factors, human papilloma virus infection and histopathology of oral submucous fibrosis.- *J. Oral Pathol. Med.*, 39, 2010, No 6, 460-464.
- Molinolo, A. A., C. Marsh, M. El Dinali, N. Gangane, K. Jennison, S. Hewitt, et al. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 18, 2012, No 9, 2558-2568.
- Nagel, R., S. R. Martens-de Kemp, M. Buijze, G. Jacobs, B. J. Braakhuis, R. H. Brakenhoff. Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines.- *Oral Oncol.*, 49, 2013, No 6, 560-566.
- Nichols, A. C., S. S. Dhaliwal, D. A. Palma, J. Basmaji, C. Chapeskie, S. Dowthwaite, et al. Does HPV type affect outcome in oropharyngeal cancer?.- *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 42, 2013, No 1, p. 9.
- Parisi, S. G., M. Cruciani, R. Scaggiante, C. Boldrin, S. Andreis, F. Dal Bello, et al. Anal and oral human papillomavirus (HPV) infection in HIV-infected subjects in northern Italy: a longitudinal cohort study among men who have sex with men.- *BMC Infect. Dis.*, 11, 2011 May 25, 150. doi: 10.1186/1471-2334-11-150.
- Rautava, J., J. Kuuskoski, K. Syrjänen, R. Grenman, S. Syrjänen. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas.- *J. Clin. Virol.*, 53, 2012, No 2, 116-120.
- Rodrigo, K. A., Y. Rawal, R. J. Renner, S. J. Schwartz, Q. Tian, P. E. Larsen, et al. Suppression of the tumorigenic phenotype in human oral squamous cell carcinoma cells by an ethanol extract derived from freeze-dried black raspberries.- *Nutr. Cancer*, 54, 2006, No 1, 58-68.
- Seraj, J. M., N. Yazdani, Z. O. Ashtiani, S. M. Seraj, S. M. Hasheminasab, B. Memar, et al. TP53 gene expression in HPV-positive oral tongue SCC and its correlation with nodal metastasis.- *Pathol. Res. Pract.*, 207, 2011, No 12, 758-761.
- Shirataki, Y., M. Kawase, S. Saito, T. Hurihara, W. Tanaka, K. Satoh, et al. Selective cytotoxic activity of grape peel and seed extracts against oral tumor cell lines.- *Anticancer Res.*, 20, 2000, No 1A, 423-426.
- Smith, E. M., L. M. Rubenstein, T. H. Haugen, E. Hamsikova, L. P. Turek. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers.- *Cancer Causes Control*, 21, 2010, No 9, 1369-1378.
- Termine, N., L. Giovannelli, V. Rodolico, D. Matranga, G. Pannone, G. Campisi. Biopsy vs. brushing: comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity.- *Oral Oncol.*, 48, 2012, No 9, 870-875.
- Turner, D. O., S. J. Williams-Cocks, R. Bullen, Catmull J, Falk J, Martin D, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) screening and detection in healthy patient saliva samples: a pilot study.- *BMC Oral Health*, 11, 2011 Oct 10, 28. doi: 10.1186/1472-6831-11-28.
- Wang, Z., E. M. Sturgis, Y. Zhang, Z. Huang, Q. Zhou, Q. Wei, et al. Combined p53-related genetic variants together with HPV infection increase oral cancer risk.- *Int. J. Cancer*, 131, 2012, No 3, e251-e258.
- Wierzbicka, M., A. Józefiak, J. Szydlowski, A. Marszałek, C. Stankiewicz, E. Hassman-Poznańska, et al. Recommendations for the diagnosis of human papilloma virus (HPV) high and low risk in the prevention and treatment of diseases of the oral cavity, pharynx and larynx. Guide of experts PTORL and KIDL.- *Otolaryngol. Pol.*, 67, 2013, No 3, 113-134.