

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**2012**

**MUDR. JAN HRBÁČEK**

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



**Význam infekce v etiopatogenezi  
karcinomu prostaty**

The role of infections in prostate  
cancer etiopathogenesis

Disertační práce

Praha, 2012

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Jan Hrbáček

Název dizertační práce:

**Význam infekce v etiopatogenezi karcinomu prostaty**

The role of infections in prostate cancer etiopathogenesis

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školitel: Doc. MUDr. Michael Urban

Školitel-konzultant: Doc. MUDr. Jiří Heráček, PhD., MBA

Rok obhajoby: 2012

Klíčová slova:

karcinom prostaty, benigní hyperplázie prostaty, etiopatogeneze, radikální prostatektomie, transvezikální prostatektomie, infekce, lidský cytomegalovirus, herpes simplex virus, lidský papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum

prostate cancer, benign prostate hyperplasia, etiopathogenesis, radical prostatectomy, open prostatectomy, infection, human cytomegalovirus, herpes simplex virus, human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracoval samostatně a použil výhradně uvedené citované prameny, literaturu a další odborné zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby má disertační práce byla používána ke studijním účelům.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze disertační práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému – SIS 3. LF UK jsou totožné.

V Praze dne 22. listopadu 2012

Jan Hrbáček

## Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli doc. MUDr. Michaelu Urbanovi, emeritnímu přednostovi Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, za to, že mi umožnil práci a postgraduální studium a za jeho záštitu po dobu mého působení na Urologické klinice. Dále děkuji školiteli-konzultantovi doc. MUDr. Jiřímu Heráčkovi, PhD., MBA za metodické vedení, kritické připomínky a neocenitelné rady, jimiž mne obohacoval.

Děkuji členům pracovní skupiny RNDr. Ruth Tachezy, PhD., RNDr. Evě Hamšíkové, a MUDr. Václavu Eisovi.

Poděkování si zasluhuje sestra Zuzana Borýsková za svědomité odběry biologických materiálů.

## Obsah

Obsah .....	5
Seznam použitých zkratek .....	7
1. Úvod .....	8
2. Seznam publikací, které jsou podkladem disertace .....	9
3. Prostata .....	10
4. Karcinom prostaty .....	12
Epidemiologie .....	12
Etiologie .....	13
Příznaky .....	13
Diagnostika .....	14
Léčba .....	16
Chirurgická léčba KP .....	16
Léčba zářením .....	17
Hormonální terapie .....	18
Chemoterapie .....	18
Paliativní léčba .....	19
Zjednodušené zásady léčby KP dle klinického stádia .....	19
5. Infekce a karcinogeneze .....	20
6. Vztah zánětu a karcinogeneze v prostatě .....	22
Spouštěče zánětu .....	22
Mechanismy zánětu .....	23
Mikroskopický obraz zánětu prostaty .....	23
Vztah prostatitidy, infekce a karcinomu prostaty .....	24
7. Infekce a karcinom prostaty .....	25
Lidský papillomavirus .....	25
Cytomegalovirus .....	27
Herpes simplex virus .....	27
Chlamydia trachomatis .....	28
Mycoplasma a ureaplasma .....	29
Neisseria gonorrhoeae a Treponema pallidum .....	30

8. Cíle práce.....	31
9. Publikace č. 1:.....	33
10. Publikace č. 2:.....	37
11. Publikace č. 3:.....	40
12. Publikace č. 4:.....	43
13. Závěr .....	45
14. Souhrn.....	47
15. Summary.....	48
16. Literatura.....	49
17. Přílohy .....	56

## Seznam použitých zkratk

3. LF UK	3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
BPH	benigní prostatická hyperplázie
CI	interval spolehlivosti
CMV	cytomegalovirus
COX	cyklooxygenáza
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	virus Epstein-Barr
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
GS	Gleasonovo skóre
HHV-8	lidský herpesvirus typ 8
HPV	lidský papillomavirus
HSV	herpes simplex virus
IGA MZ ČR	Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví České republiky
KP	karcinom prostaty
LHRH	hormon uvolňující luteinizační hormon
LPS	lipopolysacharid
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa-B
OR	podíl šancí
PIA	proliferativní zánětlivá atrofie
PIN	prostatická intraepiteliální neopláče
PSA	prostatický specifický antigen
RNA	ribonukleová kyselina
RRP	radikální retropubická prostatektomie
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfúze
XMRV	xenotropní virus příbuzný viru myší leukémie

# 1. Úvod

Disertační práce má formu souhrnu čtyř publikací (tří původních prací a jednoho přehledového článku) zabývajících se souvislostí infekčních onemocnění urogenitálního traktu a rizika vzniku karcinomu prostaty (KP).

V publikaci č. 1 podáváme souhrnný pohled na problematiku formou systematického přehledového článku, který mapuje dosavadní vědeckovýzkumné aktivity na tomto poli.

Publikace č. 2 zkoumá na našem souboru pacientů s KP a s benigní hyperplázií prostaty (BPH) rozdíl ve výskytu a výšce titrů sérových protilátek vůči vybraným infekčním agens urogenitálního traktu.

V publikaci č. 3 se na vlastním souboru pacientů zabýváme etiopatogenetickou rolí lidského papillomaviru (HPV) při vzniku KP. Přítomnost HPV jsme prokazovali pomocí tkáňových analýz a sérologie a pátrali také po možném rezervoáru HPV v mužském organismu.

Publikace č. 4 sérologickými metodami ověřuje na stejném souboru pacientů jako publikace č. 2 hypotézu, že KP ovlivňuje biologické chování již vzniklého KP.

Disertační práce je výsledkem spolupráce těchto pracovišť:

- Urologické kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (3. LF UK) a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV)
- Oddělení experimentální virologie Ústavu hematologie a krevní transfúze (ÚHKT)
- Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV
- Ústavu informatiky Akademie věd ČR, Oddělení nelineárního modelování.

## 2. Seznam publikací, které jsou podkladem disertace

HRBÁČEK, J., URBAN, M., HAMŠÍKOVÁ, E., TACHEZY, R., HERÁČEK, J. Thirty years of research on infection and prostate cancer: no conclusive evidence for a link. A systematic review. *Urol Oncol Semin Invest.* ISSN 1078-1439. V tisku. IF 3,22/2011

HRBÁČEK, J., URBAN, M., HAMŠÍKOVÁ, E., TACHEZY, R., EIS, V., BRABEC, M., HERÁČEK, J., 2011. Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer.* 11:53. ISSN 1471-2407. IF 2,74/2011

*I. cena České urologické společnosti za článek publikovaný v r. 2011 v časopise s IF*

TACHEZY, R., HRBÁČEK, J., HERÁČEK, J., SALÁKOVÁ, M., ŠMAHELOVÁ, J., LUDVÍKOVÁ, V., ŠVEC, A., URBAN, M., HAMŠÍKOVÁ, E., 2012. HPV persistence and its oncogenic role in prostate tumors. *J Med Virol.* 84(10), 1636-1645. ISSN 0146-6615. IF 2,82/2011

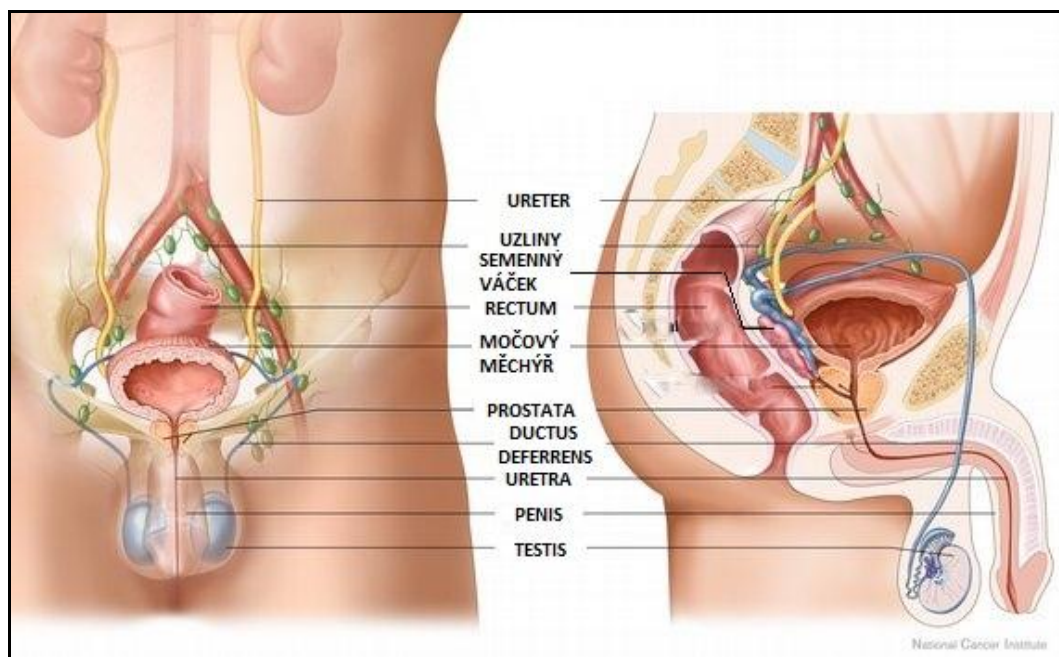
HRBÁČEK, J., URBAN, M., EIS, V., HAMŠÍKOVÁ, E., TACHEZY, R., BRABEC, M., HERÁČEK, J., 2011. Infekční onemocnění urogenitálního traktu v anamnéze nemají vliv na biologické chování a prognózu karcinomu prostaty. *Ces Urol.* 15(3), 172-180. ISSN 1211-8729.

### 3. Prostata

Předstojná žláza je nepárový orgán mužského pohlavního systému (obr. 1). Nachází se v malé pánvi pod močovým měchýřem, který na ni kraniálně těsně naléhá, kaudálně spočívá na svalech pánevního dna - m. levator ani a jeho části zvané m. levator prostatae. Klasická popisná anatomie na žláze rozlišuje bazi přiléhající k močovému měchýři, apex směřující kaudálně, kapsulu obalující žlázu, pravý a levý lalok prostaty a vazivový isthmus vpředu. Ve stromatu prostaty se nachází 30-50 tuboalveolárních žlázek (Čihák, 2002, s. 322-3).

V klinické urologické praxi se prostata dělí na tři okrsky se žlázami a přední fibromuskulární stroma, které je bez žlázek. Tzv. periferní zóna (70% objemu žlázaté části prostaty) obsahuje žlázy a dukty rozbíhající se od prostatické uretry laterálně a distálně od kolikulu. Přečodná zóna obkružuje prostatickou uretru proximálně od kolikulu, neobsahuje dukty, nýbrž pouze žlázky. Centrální zóna (25%) naléhá zezadu na přečodnou zónu a uretru,

**Obrázek 1: Prostata a její anatomické umístění. Upraveno z: <http://www.yourcancertoday.com/Cancers/Prostate-Cancer/78>**



zaujímá do sebe ductus ejaculatorii v jejich průběhu prostatou, než vyústí laterálně od kolikulu do prostatické části uretry. V periferní zóně vzniká většina karcinomů prostaty, zatímco přechodná zóna je zodpovědná za zbytnění předstojné žlázy při BPH (McNeal, 1981).

Cévní zásobení prostaty zajišťují větve z a. rectalis media, a. vesicalis inferior a a. pudenda interna. Žilní krev se sbírá v pleteni prostatického plexu na povrchu žlázy, propojeném s plexus venosus vesicalis a odtéká cestou vv. vesicales do v. iliaca interna (Čihák, 2002, s. 324).

Po bočních stěnách prostaty, zejména posterolaterálně probíhají nervově-cévní svazky zajišťující inervaci a krevní zásobení penisu. Klinický význam topografického uspořádání jmenovaných struktur spočívá v tzv. nervy šetřící radikální prostatektomii prováděné pro KP (Salonia et al., 2012).

## 4. Karcinom prostaty

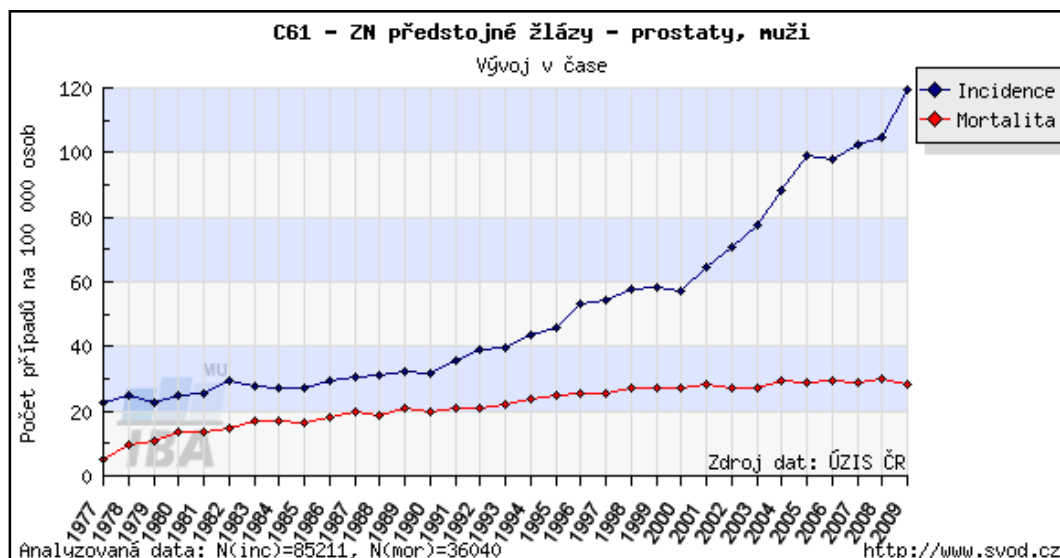
### Epidemiologie

Podle posledních dostupných údajů byla v roce 2009 incidence KP v České republice 119,3 a mortalita 28,5 případů na 100.000 mužů (obr. 2). Diagnostikováni byli tedy 6154 pacienti, 1472 osoby na KP zemřely. Incidence je stále na vzestupu, mortalita stagnuje - v posledních letech jsme dokonce zaznamenali mírný pokles a v r. 2009 byla úmrtnost na KP stejná jako v roce 1992 (Dušek et al., 2012).

Ve Spojených státech amerických, kde je incidence KP na 100.000 obyvatel velmi podobná ČR, se počet nových případů v r. 2012 odhadoval na 241.740, což je 29% ze všech zhoubných nádorů u mužů s výjimkou bazaliomů, dlaždicobuněčných kožních nádorů a karcinomů in situ (kromě močového měchýře). Mortalita má ve stejném roce být 28.170 osob (Siegel et al., 2012).

Analogické údaje pro 27 států Evropské unie v roce 2008 jsou 338.730 nových případů (25% všech nových zhoubných nádorů) a 70.820 úmrtí (Ferlay et al., 2010).

Obrázek 2: Vývoj incidence a mortality KP v ČR, 1977-2009. Převzato z: Dušek et al., 2012, [www.svod.cz](http://www.svod.cz).



## **Etiologie**

Prokázanými rizikovými faktory pro vznik KP jsou věk, rasa a pozitivní rodinná anamnéza. Výskyt KP u muže mladšího 50 let je zřídka, s narůstajícím věkem obzvláště od 60 let pravděpodobnost onemocnění KP stoupá. U Afroameričanů žijících v USA je incidence KP vyšší než v bílé populaci. U mužů, kteří mají mezi příbuznými první linie pacienta s KP, je riziko 2,5-4,6násobné. Negativní vliv obezity, západního typu stravy a dalších potenciálních rizikových faktorů nebyl zatím potvrzen (Kirby a Patel, 2009, s. 7-12).

## **Příznaky**

Karcinom prostaty probíhá dlouhou dobu bez jakýchkoli subjektivních příznaků. V pozdějších fázích se může manifestovat obstrukčními symptomy dolních močových cest, hematurií i akutní močovou retencí. U lokálně pokročilého onemocnění se lze setkat kromě výše uvedeného s obstrukcí horních močových cest a hydronefrózou (při prorůstání nádoru do oblasti trigona a ureterálních ústí. Obstrukce ductus ejaculatorius může způsobit hemospermii nebo snížený objem ejakulátu (Kawaciuk, 2009, s. 398). Per continuitatem se nádor šíří na corpora cavernosa penis a corpus spongiosum, do periprostatické tukové tkáně, cévních a nervových pletení a může se fixovat ke kostěné pánvi. Šíření na rektum je vzhledem k relativně pevné Denonvilliersově fascii méně časté.

Diseminace nádoru probíhá nejprve lymfatickou cestou do vnitřních a vnějších ilických uzlin, obturátorových a společných ilických uzlin. Predilekčním místem pro metastázy je osový skelet - žebra a páteř, dále pánevní a dlouhé kosti. Později nacházíme vzdálená ložiska v plicích, játrech a mozku.

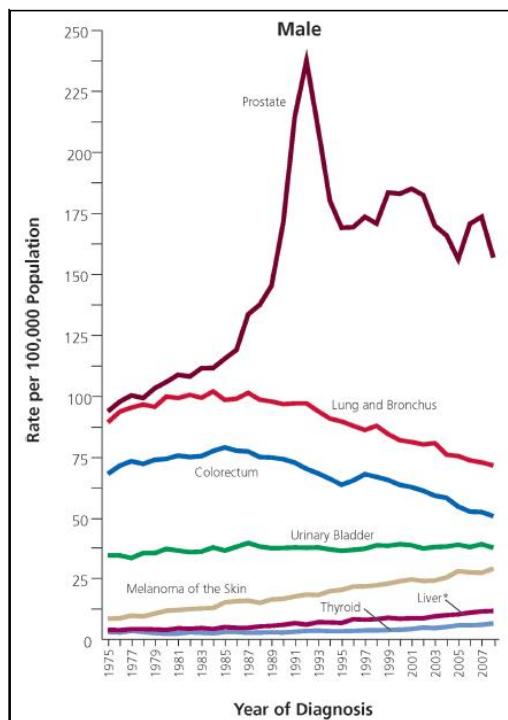
## Diagnostika

Dosud největším přelomem v diagnostice KP bylo zavedení screeningového testování prostatického specifického antigenu (PSA) u mužů starších 50 let v první polovině 90. let minulého století. PSA je glykoprotein s proteázovou aktivitou tvořený epiteliálními buňkami prostaty. Ve vysokých koncentracích proniká do spermatu, který zkapalňuje; jeho hladiny v séru jsou nízké (Kawaciuk, 2009, s. 395). Obr. 3 ukazuje, k jak strmému nárůstu incidence došlo před 20 lety v USA. Nejedná se pochopitelně o náhlý vzestup absolutního počtu případů KP, nýbrž o efekt testování PSA a biopsií pacientů s hodnotou převyšující normální meze. Za konvenční hranici normy se považuje koncentrace 4,0 ng/ml, avšak hodnota je věkově závislá a celá problematika (ab)normálních hodnot PSA svou komplexitou přesahuje rámec této práce. Přesto, že některé názory celý koncept screeningu založeného na PSA zpochybňují (Moyer, 2012), je v současnosti základním předpokladem pro úspěšnou léčbu KP.

V době před uvedením PSA do klinické praxe mělo zásadní význam v záchytu KP vyšetření per rectum, jež je součástí fyzikálního vyšetření pacienta ve všech základních medicínských oborech. Za suspektní považujeme pohmatový nález tvrdé, hrboлатé, asymetrické nebo laterálně neohraničené prostaty a v takových případech indikujeme biopsii k vyloučení přítomnosti KP.

Punkční jehlová biopsie prostaty dnes představuje jedinou průkaznou metodu stanovení

**Obrázek 3: Graf incidence KP v USA. Vrchol křivky v polovině 90. let odpovídá efektu zavedení screeningu pomocí PSA. Bližší vysvětlení v textu. Převzato z: Siegel et al, 2012.**



diagnózy KP před zahájením terapie. Provádí se tru-cut jehlou standardně transrektálně pod ultrazvukovou kontrolou (tzv. TRUS-biopsie prostaty) a počet odebíraných vzorků postupem času narostl ze šesti na současných 10-12. Nelze-li transrektální biopsii provést, je možné volit transperineální přístup.

Jiné metody detekce KP se buď ukázaly jako nepoužitelné (samostatně prováděná transrektální ultrasonografie, CT), anebo jsou ve stádiu výzkumů (markery PCA-3, pro-PSA, nukleární magnetická rezonance).

Scintigrafie skeletu se u pacientů s Gleasonovým skóre (GS) > 7 nebo PSA > 10 ng/ml používá k detekci kostních metastáz, součástí stagingu před operací je rentgenový snímek hrudníku.

**Tabulka 1: Aktuální TNM klasifikace KP (upraveno dle Heidenreich et al, 2012, s. 11).**

<b>T</b>	<b>primární nádor</b>
<b>TX</b>	rozsah nádoru nelze hodnotit
<b>T0</b>	nádor neprokázán
<b>T1</b>	klinicky nebo pomocí vyšetření neprokazatelný nádor
T1a	náhodný histologický nález nádoru v méně než 5 % resekované tkáně
T1b	náhodný histologický nález nádoru ve více než 5 % resekované tkáně
T1c	nádor identifikovaný biopsií (např. při zvýšení hodnoty PSA)
<b>T2</b>	nádor ohraničený na prostatu
T2a	nádor postihující polovinu jednoho laloku nebo méně
T2b	nádor postihující více než polovinu jednoho laloku, ale ne oba laloky
T2c	nádor postihující oba laloky
<b>T3</b>	nádor přesahující pouzdro prostaty
T3a	extrakapsulární šíření (unilaterální nebo bilaterální)
T3b	invaze tumoru do jednoho či obou semenných váčků
<b>T4</b>	nádor prorůstá do přilehlých struktur (rekta, pánevního dna, atp.)
<b>N</b>	<b>regionální lymfatické uzliny</b>
<b>NX</b>	regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit

<b>N0</b>	bez metastáz v regionálních lymfatických uzlinách
<b>N1</b>	metastázy v regionálních lymfatických uzlinách přítomny
<b>M</b>	<b>vzdálené metastázy</b>
<b>MX</b>	vzdálené metastázy nelze hodnotit
<b>M0</b>	vzdálené metastázy nejsou přítomny
<b>M1</b>	přítomnost vzdálených metastáz
M1a	v lymfatických uzlinách jiných než regionálních
M1b	v kostech
M1c	v jiných lokalizacích

## Léčba

V terapii KP mají místo všechny současné metody protinádorové léčby: operační přístupy, radioterapie, chemoterapie i hormonální léčba v závislosti na klinickém stadiu onemocnění (tab. 1). Možnosti nových přístupů jsou předmětem intenzivního výzkumu (biologická léčba, autovakcíny). Stále častěji se v poslední době diskutuje konzervativní přístup jako tzv. watchful waiting anebo active surveillance. První metodou rozumíme sledování průběhu onemocnění a paliativní léčebné postupy při jeho progresi. Druhá značí pečlivé sledování včetně kontrol PSA i opakovaných biopsií se zahájením kurativní léčby v okamžiku progresu choroby (Heidenreich et al, 2012, s. 36).

### *Chirurgická léčba KP*

Chirurgická léčba KP spočívá v provedení radikální prostatektomie, zpravidla retropubickým přístupem (RRP), kdy operatér odstraní celou předstojnou žlázu i s její kapsulou a semennými vajíčky. Pak provede anastomózu hrdla močového měchýře s močovou trubicí (Kawaciuk, 2009, s. 400-2). Kromě otevřené RRP se dnes standardně provádí laparoskopická operace a čím dále častěji také roboticky asistovaná laparoskopická RRP.

Typickou indikací pro RRP je lokalizované onemocnění (stádia T1-T2), GS 2-7 s koncentrací PSA  $\leq$  20 ng/ml u pacienta s očekávanou délkou života

alespoň 10 let. Tzv. nervy šetřící výkon lze provést u mužů s předoperačně zachovalou erektilní funkcí u nádorů T1c, GS < 7 a PSA < 10 ng/ml.

RRP můžeme také doporučit vybraným pacientům s vysoce rizikovým KP (tj. stádiem T3a nebo GS 8-10 nebo PSA>20 ng/ml) a úzké skupině mužů s nádorem velmi vysokého rizika, tj. cT3b-T4 N0 či N1 v rámci multimodální léčby. U pacientů s metastatickým postižením se RRP neprovádí (Heidenreich et al., 2012, s.44-51). Tab. 2 uvádí hlavní komplikace RRP.

**Tabulka 2: Nejčastější komplikace a nežádoucí následky RRP a jejich výskyt v procentech. Upraveno dle Heidenreich et al, 2012, s. 52**

Erekttilní dysfunkce	29-100%
Mírná stresová inkontinence	4-50%
Závažná stresová inkontinence	0-15%
Píštěl, únik moči	0-15%
Striktura anastomózy	1-15%

V indikovaných případech doprovází RRP pánevní lymfadenektomie. Podle současných doporučení není nutná u KP stádia T1a-T2a, GS 2-6 a PSA < 10 ng/ml. Význam lymfadenektomie je stagingový s dopadem na rozhodnutí o případné adjuvantní léčbě a může být i kurativní, pokud vede k odstranění uzlinových (mikro)metastáz. Odstraňují se lymfatické uzliny okolo a. et v. iliaca externa, ve fossa obturatoria a mediálně a laterálně od a. iliaca interna (Heidenreich et al, 2012, s. 50).

### *Léčba zářením*

Radioterapie je alternativou k RRP v kurativní léčbě KP. Používá se lineárního urychlovače a tzv. brzdného záření. Účinná dávka má rozmezí 70-80 Gy a podává se ve formě 3-dimezionální konformní radioterapie přizpůsobené tvaru prostaty. Cílem je minimalizace ozáření přilehlých tkání při maximálním účinku na cílový orgán. Radioterapie modulovanou intenzitou paprsku (intensity modulated radiotherapy - IMRT) využívá pokročilý

software k naplánování léčby a řízení intenzity paprsku během ozařování. K zevnímu ozáření je alternativní nebo komplementární metodou brachyterapie izotopem  $^{192}\text{Ir}$  (Kawaciuk, 2009, s. 402-3).

### *Hormonální terapie*

KP se považuje za hormonálně podmíněný nádor, ačkoliv přesné mechanismy účinku androgenů na buňky karcinomu a vztah mezi mužskými pohlavními hormony a karcinogenezí v prostatě zůstávají dodnes neobjasněny.

Jednou z léčebných modalit je proto androgenní deprivace na různých úrovních působení pohlavních hormonů. Má buď formu chirurgické kastrace, která okamžitě a definitivně připraví organismus o většinu androgenů, nebo farmakologické kastrace, která sníží hodnoty cirkulujícího testosteronu na minimum. Dnes se hojně využívají analoga hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH) způsobující down-regulaci receptorů LHRH v hypofýze a pokles sérového testosteronu za 2-4 týdny. Depotní injekční formy se aplikují po 1, 2, 3 nebo 6 měsících. Další varianty androgenní suprese zahrnují podávání steroidních či nesteroidních antiandrogenů anebo estrogenů. Antiandrogeny blokují vazbu endogenních androgenů na jejich receptory, steroidní antiandrogeny navíc inhibují sekreci gonadotropinů v hypofýze. Estrogeny snižují zpětnou vazbou produkci LHRH a luteinizačního hormonu, ale vzhledem k nežádoucím účinkům se používají minimálně (Kawaciuk, 2009, s. 405-6).

### *Chemoterapie*

K chemoterapii KP se dnes používají deriváty alkaloidů, především docetaxel. U pacientů s generalizací karcinomu prostaty prodlužuje přežití o cca 7 měsíců (Kawaciuk, 2009, s. 406). Při relapsu onemocnění po léčbě docetaxelem se podává cabazitaxel nebo abirateron (Heidenreich et al., 2012, s. 151). Výzkum léčiv kastrálně rezistentního KP prodělává bouřlivý rozvoj; řada klinických studií právě probíhá.

### *Paliativní léčba*

Do této skupiny léčebných postupů řadíme dezobstrukční operační výkony - transuretrální resekce prostaty nebo zajištění derivace horních močových cest. Patří sem pochopitelně také léčba bolesti od nesteroidních analgetik přes opiáty, analgetické ozáření kostních metastáz až po aplikaci radionuklidů samaria. K ochraně kostí a prevenci kostních příhod se podávají bisfosfonáty (Babjuk et al, 2009, s. 41).

### *Zjednodušené zásady léčby KP dle klinického stádia*

#### Léčba lokalizovaného KP (T1-2 N0 M0)

- radikální prostatektomie
- radioterapie
- watchful waiting

#### Léčba lokálně pokročilého KP (T3-4 N0-1 M0)

- watchful waiting
- radioterapie (+/- hormonální suprese)
- radikální prostatektomie
- androgenní deprivace jako moneterapie (orchiektomie/analoga LHRH)

#### Léčba metastatického KP (T1-4 N0-1 M1)

- antiandrogenní hormonální léčba primárně jako moneterapie
- sekundární hormonální manipulace po selhání primární léčby
- chemoterapie

(upraveno dle Babjuk et al, 2009, s. 39-41)

## 5. Infekce a karcinogeneze

Odhaduje se, že z celkového počtu 12,7 milionu zhoubných nádorů diagnostikovaných v roce 2008 jich 16,1% bylo přímo způsobeno infekcí. V tomto zastoupení existují geografické rozdíly: v subsaharské Africe činil podíl malignit způsobených infekcí 32,7%, v Evropě a Severní Americe 7%, resp. 4% (de Martel et al., 2012). Značnému počtu zhoubných nádorů by se tedy dalo předejít, pokud bychom uměli léčit a léčili jejich infekční původce.

Jsou známy tři hlavní mechanismy, kterými infekční agens působí při iniciaci a udržování karcinogeneze: chronickým zánětem, buněčnou transformací a potlačením imunitního systému (Dalton-Griffin a Kellam, 2009).

Chronický zánět vzniká jako odpověď imunitního systému na perzistující infekci. Příkladem je virus hepatitidy C, který svou přítomností a trvalou replikací v játrech podporuje zánětlivou reakci, zvýšenou proliferaci s rizikem onkogenní transformace a v důsledku vede ke vzniku hepatocelulárního karcinomu. Na podobném principu působí chronický zánět *Helicobacter pylori* nebo *Schistosoma haematobium*.

Virový genom může v hostitelské buňce způsobit její nekontrolované dělení (jako např. virus Epstein-Barr (EBV) u B-lymfocytů), anebo se integrovat do buněčného genomu jako HPV, původce karcinomu děložního hrdla. Onkogenní viry vedou k nádorové transformaci buňky dvěma cestami podle svého původu. DNA viry kódují specifické proteiny, které interagují s buněčnými proteiny včetně antionkogenů pRb, p53 aj. Takto působí EBV u nazofaryngeálního karcinomu, HPV u karcinomu cervixu a virus hepatitidy B u hepatocelulárního karcinomu. RNA viry naproti tomu nejdříve přepíší svou virovou RNA do jednovláknové DNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Působením DNA polymerázy se zdvojí a jako dvojitá DNA integruje do hostitelského genomu. (Klener, 2002, s. 44-46).

Imunosupresivní účinek některých virů (např. viru lidské imunitní nedostatečnosti - HIV) nevede ke zhoubnému bujení přímo, ale oslabením

imunitního systému. Při setkání s karcinogenním činitelem není pak organismus schopen účinné obrany (Dalton-Griffin a Kellam, 2009).

## 6. Vztah zánětu a karcinogeneze v prostatě

Některé práce v minulosti spojovaly vznik KP s prostatickým zánětem. V meta-analýze z roku 2002 měli pacienti s prostatitidou v anamnéze vyšší pravděpodobnost rozvoje KP (podíl šancí - odds ratio (OR) 1,6; 95% interval spolehlivosti (CI) 1,0-2,4) (Dennis et al, 2002). Průřezová studie 5821 mužů nad 65 let z r. 2004 udává u prostatitidy v osobní anamnéze OR pro KP 5,4 (95% CI 4,4-6,6) (Daniels et al, 2005). Jiná rozsáhlá populační studie případů a kontrol však tento závěr nepotvrdila (Sutcliffe et al, 2006). Vzhledem k předpokládané úzké spojitosti infekce se zánětlivou odpovědí organismu předkládáme stručný přehled současných znalostí z této oblasti.

### *Spouštěče zánětu*

Bez ohledu na svůj původ způsobuje zánětlivý pochod karcinogenezi poškozením buňky a její genetické informace a vytvořením tkáňového mikroprostředí bohatého na cytokiny a růstové faktory. Ty zvyšují buněčnou replikaci, angiogenezi a vyvolávají pochody vedoucí k opravě poškozené tkáně.

Spouštěčem zánětu prostaty mohou být různé inzulty. Na prvním místě stojí infekce, dalším je chemické a fyzikální poškození se zvláště významnou rolí močového refluxu. V několika studiích byla zvýšená frekvence ejakulací označena za faktor snižující incidenci KP, snad díky odstraňování škodlivých činitelů z orgánu a snižování doby kontaktu mezi nimi a tkání. Vliv na karcinogenezi mají dietní zvyklosti: expozice laboratorních potkanů heterocyklickým aminům vede ke vzniku zhoubného bujení, mj. i v prostatě. Svou roli může sehrát i imunitní systém: řada prostatických antigenů se exprimuje až po pubertě. Poškození prostatické buňky může vést k uvolnění dosud skrytých antigenů do oběhu a zahájit tak imunitní reakci proti vlastní tkáni (De Marzo et al, 2007).

### *Mechanismy zánětu*

Zánět je komplexní proces zahrnující humorální (cytokiny aj.) a buněčné (leukocyty) komponenty. Předpokládá se, že účelem zánětu je vytvořit tkáňové prostředí, které podpoří rozeznání a opravu poškozených buněk a eradikaci cizích částic, infikovaných a nevratně poškozených buněk. Primární mediátory nespecifické imunity jsou volné radikály: hydroxylový radikál ( $\text{OH}\cdot$ ), peroxyinitritový anion ( $\text{ONOO}^-$ ) a nitroxidový radikál ( $\text{NO}\cdot$ ). Tyto částice alterují strukturu bílkovin, vedou k peroxidaci lipidů a změnám genomu somatických buněk. Volné radikály mohou posttranslačně modifikovat klíčové bílkoviny včetně těch, které se podílejí na opravách DNA, apoptóze, buněčné signalizaci a důležitých enzymatických pochodech. Peroxidace lipidů spouští dráhu syntézy prostaglandinů aktivací cyklooxygenázy-2 (COX-2). V několika studiích byla zjištěna zvýšená exprese COX-2 v oblastech proliferativní zánětlivé atrofie (PIA) a KP ve srovnání s normální tkání. Navíc mohou reakce s COX-2 samy způsobit další buněčné a genetické poškození (Palapattu et al., 2004).

### *Mikroskopický obraz zánětu prostaty*

Fokální atrofie je běžným histologickým nálezem v prostatě u starších mužů. V řadě případů je spojena s akutním nebo chronickým zánětem a jsou v ní přítomny proliferující epiteliální buňky. Nachází se obvykle v periferní zóně prostaty, kde především se vyskytují karcinomy (Palapattu et al., 2004). Kvůli výskytu proliferujících buněk a častému spojení se zánětem se pro ni začal používat název PIA (De Marzo et al., 2007). PIA zahrnuje široké spektrum morfologických obrazů a v současnosti je předmětem mezinárodního klasifikačního projektu.

Existují důkazy o roli PIA jako prekursoru nádorového bujení. PIA pravděpodobně vzniká jako následek poškození epitelu ischemií, infekcí nebo expozicí exo- či endogenním toxinům s následnou regenerací a zánětem. Zánět může sám vést k oxidativnímu poškození epiteliálních buněk. Buňky

v místech PIA mají vysokou míru exprese GSTP1, GSTA1 a COX-2, což svědčí pro buněčný stres (Palapattu et al, 2004).

Ne všechny PIA jsou spojeny s karcinomem a ne všechny nádory se vyskytují v blízkosti PIA. Současná představa je taková, že PIA je odpovědí tkáně na stres mikroprostředí. Ložiska PIA, která se nejsou schopna efektivně bránit oxidativnímu poškození genetické informace, mohou časem progredovat do prostatické intraepiteliální neoplázie (PIN) či karcinomu. Předpokládá se, že high-grade PIN se může vyvinout z PIA, PIA může přejít přímo do karcinomu bez mezistupně PIN, některé karcinomy vznikají z PIN bez PIA a konečně existují nádory beze stopy po prekurzorovém procesu v blízkém okolí (Palapattu et al, 2004).

#### *Vztah prostatitidy, infekce a karcinomu prostaty*

Většina studií zabývajících se vztahem prostatitidy a karcinomu prostaty vychází ze subjektivních informací získaných od pacienta. Zkoumají tedy vesměs vztah prostatitidy typu I-III dle současné klasifikace (Kawaciuk, 2009, s. 217-9) (I – akutní bakteriální prostatitida, II – chronická bakteriální prostatitida, III – chronická abakteriální prostatitida/syndrom chronické pánevní bolesti, IV – asymptomatická prostatitida zjištěná histologickým vyšetřením vzorku tkáně) a karcinomem. Subjektivně podávané informace však mohou být zkreslené, laik nemusí být schopen odlišit prostatitidu od uretritidy či cystitidy, infekce urogenitálního traktu mohou i nemusejí být pohlavně přenosné; pro průkaz kauzality zánětu a karcinogeneze nejsou tyto přístupy dostatečně validní.

Souvislost mezi prostatitidou a vznikem KP zatím prokázána nebyla. Ve dvou rozsáhlých klinických studiích zánět statisticky významně souvisel pouze s věkem subjektů a objemem prostaty (Robert et al, 2009).

## 7. Infekce a karcinom prostaty

Jako první vyslovil domněnku o možné kauzální spojitosti KP a pohlavně přenosné infekce Ravich (1950). Následovala řada výlučně retrospektivních studií, které se zabývaly KP v souvislosti s pohlavně přenosnými chorobami v osobní anamnéze nebo s rizikovým chováním jako nepoužíváním kondomu a styky s prostitutkami. Studie publikované do 90. let minulého století naznačovaly sice hraniční asociaci mezi rizikovým chováním nebo kapavkou a příjící v anamnéze a zvýšeným rizikem vzniku KP (Hayes et al., 2000), ale jejich závěry zdaleka nevyznívaly jednoznačně. Meta-analýza publikací z let 1966-2004 čítající 6.022 pacientů s KP a 7.320 kontrol udávala mírně zvýšené riziko KP u mužů s jakoukoli pohlavně přenosnou nemocí v anamnéze (OR 1,6; 95% CI 1,26-1,73) (Taylor et al., 2005), ale nedávná rozsáhlá prospektivní studie žádné konkrétní sexuálně přenosné onemocnění, jež by bylo spojeno s rizikem KP, neidentifikovala (Huang et al., 2008).

Využívání anamnestických údajů v pátrání po etiologii KP je nespolehlivé z několika důvodů: 1) pacienti mohou zapomínat; 2) nemusejí být ochotni přiznat proběhlou pohlavně přenosnou nemoc z důvodu společenské stigmatizace; 3) infekce mohla proběhnout bezpříznakově (Sutcliffe et al., 2007). Proto je laboratorní průkaz přítomnosti patogenu nebo protilátek objektivně spolehlivějším měřítkem.

Následující podkapitoly uvádějí teoretické předpoklady onkogenního působení vybraných infekčních činitelů na prostatické buňky. Jedná se o patogeny, po nichž jsme pátrali v našem vlastním výzkumném projektu; z něj také vycházejí naše původní práce komentované níže.

### *Lidský papillomavirus*

HPV je epiteliotropní virus přenášený přímým kontaktem, nejčastěji pohlavním stykem včetně non-penetračních aktivit (Shew, 2005). Typickým místem vstupu je locus minoris resistentiae - kožní mikrotrauma, vlasový folikul nebo hranice cylindrického a dlaždicového epitelu děložního hrdla či

análního kanálu (Doorbar, 2007). Po vstupu do bazálních buněk epitelové vrstvy přežívá virus v hostitelské buňce v episomální formě. S vývojem buňky a jejím postupem vzhůru epitelovou vrstvou se replikuje. Až v nejvyšších vrstvách začíná exprimovat geny L1 a L2 pro malý a velký kapsidový protein, jež autoagregují do pentamerních kapsomer a vznikají z nich kapsidy (Pagliusi a Garland, 2009). Hlavními onkogenními geny HPV jsou E6 a E7. Gen E6 kóduje protein o 160 aminokyselinách, který svojí vazbou inhibuje protein p53 a urychluje jeho degradaci ubikvitin-dependentní proteolýzou (ubikvitiny označují proteiny určené k likvidaci). Tak se po dobu p53 sníží z několika hodin na 20 minut (Münger a Howley, 2002). Genový produkt E7 se váže na aktivní (hypofosforylovanou) formu tumorsupresorového proteinu pRb. Vazba významně snižuje jeho aktivitu a usnadní degradaci pRb v proteasomech, znamenající naprostou ztrátu jeho funkce (Münger a Howley, 2002). Imortalizace buněk a destabilizace genomu jsou tedy hlavními mechanismy onkogenního působení HPV na epiteliální hostitelskou buňku.

V rámci více než 100 dnes známých genotypů HPV odlišujeme nízké rizikové (low-risk: HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, ...) a vysoce rizikové (high-risk: HPV 16, 18, 31, 33, 35, ...) typy viru. Infekce high-risk HPV je jednoznačně spjata s karcinomy děložního hrdla: HPV 16 se spojuje s dlaždicobuněčnými karcinomy i adenokarcinomy, HPV 18 především s adenokarcinomy cervixu (Brink et al., 2007). U anogenitálních tumorů převažuje detekce HPV 16 nad HPV 18. S HPV je spojeno 85% dlaždicobuněčného karcinomu anu a 50% karcinomů penisu (Giuliano et al., 2008). Pro vznik nádoru je nutná dlouhodobá přítomnost viru v tkáni. Pokud infekce v organismu přetrvává, vyvíjejí se v tkáni prekancerózy - cervikální intraepiteliální neoplázie I, II a III - a následně karcinom (Doorbar, 2007).

V experimentech in vitro vedla infekce buněk prostatického karcinomu HPV 18 k jejich imortalizaci (Naghashfar et al., 1996; Weijerman et al., 1994). Nenádorové buňky dospělé lidské prostaty infikované genomem HPV 18 ztratily schopnost apoptózy (Rhim et al., 1994).

### *Cytomegalovirus (CMV)*

Na rozdíl od viru Epstein-Barrův nebo lidského herpesviru-8 (HHV-8) nebyl tento zástupce skupiny herpesvirů zatím kauzálně spojen s žádným lidským maligním nádorem. Ve Spojených státech je séroprevalence tohoto pohlavně přenosného patogenu v populaci 60-90% (Staras et al, 2006).

In vitro infikuje CMV 30% exponovaných buněk laboratorní karcinomové prostatické buněčné linie PC-3 (na rozdíl od 5% buněk linie LNCaP a <1% linie DU-145) a významně zvyšuje jejich adhezivitu k endotelu a proteinům extracelulární matrix kolagenu, lamininu a fibronektinu. Indukuje také expresi povrchového integrinu  $\beta 1$ , integrinové kinázy (ILK) a fokální adhezivní kinázy (FAK) (Blaheta et al, 2006). Řada studií prokázala další účinky CMV, spojované s karcinogenezí, na různé typy buněk. CMV chrání fibroblasty před apoptózou indukovanou adenovirovým proteinem E1A. Buňky neuroblastomu infikované CMV vykazují vyšší mobilitu a adhezivitu k lidskému cévnímu endotelu. Infekce endoteliálních buněk CMV má proangiogenní účinek zprostředkovaný integriny  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  a receptorem epidermálního růstového faktoru (EGFR). Cytomegalové proteiny US2, US3, US6 a US11 snižují expresi hlavních histokompatibilních komplexů (MHC) I a II, čímž napadená buňka hostitele uniká imunitnímu dohledu. Infikované buňky produkují imunosupresivní cytokiny obdobné endogennímu interleukinu IL-10. CMV způsobuje chromosomální poškození a nestabilitu genomu (Michaelis et al, 2009).

### *Herpes simplex virus*

HSV1 je rozšířeným původcem orolabiálních infekcí a přenáší se nepohlavní cestou. HSV2 způsobuje anogenitální infekce a přenáší se hlavně sexuálním stykem. Příležitostně mohou oba subtypy působit oba druhy postižení (Xu et al, 2002).

Stejně jako u cytomegaloviru, ani u viru herpes simplex (HSV) zatím nebyl podán důkaz o jeho spojitosti s nádorovým bujením. Zájem výzkumníků o HSV vrcholil v této souvislosti v 70. a na počátku 80. let minulého století, kdy

byl virus mylně spojován s karcinomem děložního hrdla (Sabin a Tarro, 1973). Od té doby setrvale klesá.

Nukleární faktor kappa-B (NF- $\kappa$ B) je proteinovým komplexem řídícím transkripci DNA. Reaguje na různé stimuly včetně mikrobiálních antigenů; jeho porušená funkce se spojuje s patologickými procesy v organismu včetně šoku, autoimunitních chorob a nádorových procesů. Kundu v experimentu in vitro vystavil nativní nenádorové prostatické epiteliální buňky, stejně jako laboratorně používanou buněčnou linii RWPE-1 působení (1) lipopolysacharidu (LPS) Gram-negativních bakterií a (2) sekvencí DNA (tzv. CpG) analogických DNA virů HPV a HSV. Oba antigeny, které se in vivo vyskytují v mužském urogenitálním systému běžně, vedly buňky k proliferativní reakci. LPS i CpG dále zvýšily 3-5x aktivitu NF- $\kappa$ B a měly antiapoptotické účinky (Kundu et al., 2008). Autoři studie vyvozují, že strukturální součásti mikrobiálních agens včetně HPV a HSV mohou vychýlit rovnováhu buněčných dějů ve prospěch nekontrolované proliferace.

### *Chlamydia trachomatis*

V současnosti rozeznáváme čtyři druhy těchto obligátně intracelulárních patogenů; prokázanými lidskými patogeny jsou jen *C. pneumoniae* a *C. trachomatis*. Chlamydiové infekce patří mezi nejčastější sexuálně přenosné nemoci. Množení bakterie je provázeno zánikem hostitelské buňky s uvolněním infekčních elementárních tělísek na povrch sliznice s následnou zánětlivou reakcí, buněčnou proliferací a jizvením tkáně - konečnými důsledky chlamydiové infekce (Wagenlehner et al., 2006).

Existují zprávy o souvislosti *C. psittaci* s očními lymfomy ze slizniční lymfatické tkáně (tzv. MALT-lymfomy) (Velásquez et al., 2011) a *C. pneumoniae* s karcinomem plic (Zhan et al., 2011).

Mechanismus, kterým by chlamydie mohly alespoň potenciálně spouštět karcinogenezi v prostatické buňce, není dosud popsán. V úvahu přichází iniciace nádoru cestou chronického zánětu, avšak zatím neexistuje

průkaz ani spojitosti chlamydiové infekce se zánětem prostaty, ani prostatitidy se vznikem karcinomu.

### *Mycoplasma a ureaplasma*

Mykoplazmata jsou nejmenší organismy schopné samostatného rozmnožování. Žijí na povrchu eukaryotní buňky nebo uvnitř ní a nemají vlastní buněčnou stěnu. Dodnes bylo popsáno 16 druhů mykoplazmat, nejprozkoumanějšími jsou *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis* a *Ureaplasma urealyticum* (Ketcham et al, 2005).

PC-3 a DU-145 jsou klasickými buněčnými liniemi KP používanými v laboratorní praxi. Protein p37 je produktem genu p37 nalezeného u *M. hominis*, mykoplazmata infikujícího vepře, a dle některých pozorování má vztah k nádorové invazivitě. Aplikace rekombinantního proteinu p37 na buňky PC-3 a DU-145 zvýšila jejich invazivitu úměrně použité dávce. Účinek aplikace zcela blokovala monoklonální protilátka proti p37 (Ketcham et al, 2005). V jiném pokusu kultivace buněčných linií za přítomnosti proteinu p37 vedla k vyšší proliferaci buněk DU-145; na množení buněk PC-3 vliv neměla (Goodison et al, 2007). Namiki zkoumal vliv mykoplazmat na benigní linii prostatických buněk BPH-1 in vitro a in vivo. Infekce prostatických buněk *M. hominis* a *M. genitalium* zvyšovala jejich schopnost migrace, invaze, růstu a tvorby kolonií v agaru. Vedla ke změnám karyotypu buněk, zejména chromozomální polysomii a dalším aberacím. Inokulace buněk BPH-1 infikovaných uvedenými mykoplazmaty do podkoží laboratorních myší vedla v některých případech k nádorovému růstu s mikroskopicky prokazatelnou mitotickou aktivitou, jadernými atypii a invazí mezi buňky příčně pruhované svaloviny. Zaznamenána byla i dlaždicobuněčná diferenciací. Žádný z pokusů provedených s neinfikovanými buňkami BPH-1 k tumorigenezi nevedl (Namiki et al, 2009).

### *Neisseria gonorrhoeae a Treponema pallidum*

*N. gonorrhoeae* je původcem „klasické“ sexuálně přenosné infekce - kapavky. Gram pozitivní diplokok se přenáší výhradně sexuálním kontaktem, nikoli však pouze vaginálním pohlavním stykem. Po kontaktu s buňkami hostitele se bakterie váží na epiteliální buňky svými fimbriemi. Množí se ve slizničních buňkách i fagosomech leukocytů (Porš et al., s. 113-4).

*T. pallidum* je etiologickým agens syfilis a sexuální styk je hlavním způsobem přenosu. Po infekci spirocheta sice uniká časně imunitní reakci organismu díky své antigenní struktuře a povrchové slizové vrstvě, ale brzy zaplaví oběh antigeny z rozpadlých buněk a rozvine se protilátková a buněčná imunitní odpověď. V postižených tkáních prokazujeme poškození kapilár, patologické změny zprostředkované imunokomplexy a později rozsáhlé tkáňové destrukce (Porš et al., s. 118).

Potenciální onkogenní působení *N. gonorrhoeae* a *T. pallidum* by tedy mohlo být zprostředkováno rozvojem a udržováním chronické zánětlivé odpovědi v infikovaných tkáních.

## 8. Cíle práce

V publikaci č. 1 jsme se zabývali dříve publikovanými pracemi, které se zabývaly souvislostí KP a různých infekcí urogenitálního traktu. Publikace má formu tzv. systematického přehledového článku, do nějž jsme zahrnuli 74 prací z let 1980-2011, které splňovaly předem definovaná kritéria.

Cílem práce bylo podat ucelený přehled o vědeckovýzkumné činnosti na poli urogenitálních infekčních onemocnění a KP.

V publikaci č. 2 jsme na vlastním souboru pacientů zjišťovali výskyt a výšku hladin protilátek proti vybraným infekčním agens.

Cílem práce bylo porovnat séroprevalenci a průměrnou výšku titrů protilátek ve skupině pacientů s KP a ve skupině mužů s BPH.

V publikaci č. 3 jsme na vlastním souboru pacientů zkoumali rozdíly v séroprevalenci a přítomnosti DNA HPV v prostatické tkáni u pacientů s KP versus u mužů s BPH. Dále jsme pátrali v různých tkáních urogenitálního systému po případných rezervoárech HPV.

Cílem práce bylo porovnat séroprevalenci a tkáňový výskyt HPV mezi skupinou pacientů s KP a s BPH.

V publikaci č. 4 jsme se na stejném souboru pacientů jako v publikaci č. 2 porovnávali průměrnou sérovou koncentraci PSA a agresivitu nádoru vyjádřenou GS mezi séropozitivními a séronegativními pacienty s KP. Dále jsme srovnávali výskyt protilátek u pacientů s lokalizovaným a s lokálně pokročilým onemocněním.

Cílem práce bylo zjistit, zda se biologické vlastnosti KP liší v závislosti na prodělané infekci urogenitálního traktu.

Pracovní hypotézy:

Hypotéza 1: Pacienti s KP mají častěji protilátky anebo vyšší titry protilátek proti sledovaným infekčním agens než pacienti s BPH.

Hypotéza 2: Markery infekčních agens jsou detekovány v prostatách pacientů s KP častěji než v prostatách pacientů s BPH.

## 9. Publikace č. 1:

### **Třicet let výzkumu na poli infekce a karcinomu prostaty: důkaz o spojitosti chybí. Systematický přehledový článek.**

#### Úvod a cíle studie

Případná úloha infekce urogenitálního traktu v etiopatogenezi KP je předmětem zájmu výzkumníků již přes 30 let. K pátrání po jejich vzájemném vztahu se využívají dva základní přístupy: vyšetřování tkání (polymerázová řetězová reakce, imunohistochemie, hybridizace in situ) a sérologické metody (enzymoimunoanalýza - ELISA, imunofluorescence, atp.). Přehledový článek hledá odpověď na otázku, zda může infekce mužského urogenitálního ústrojí příčinně souviset s rozvojem KP.

#### Materiál a metoda

Provedli jsme systematický výběr a kritické zhodnocení publikovaných prací evidovaných v bibliografické databázi MEDLINE/PubMed do prosince 2011 včetně. Jako vyhledávací hesla jsme použili tyto výrazy: „karcinom prostaty“, „infekce“ a konkrétní jména jednotlivých infekčních agens. Další články jsme našli v seznamech literatury. Do výběru jsme zahrnuli celkem 74 publikací pokrývajících tyto infekční činitele: HPV, CMV, HSV, EBV, lidský herpesvirus, BK virus, JC virus, C. trachomatis, mykoplazmata, ureaplazmata, T. vaginalis, N. gonorrhoeae, T. pallidum, Propionibacterium acnes, xenotropní virus příbuzný viru myši leukémie a Candida albicans.

#### Výsledky

Přes rozličné metodické přístupy a různé konstrukce hodnocených studií jejich závěry nevypovídají o tom, že by některé ze zkoumaných patogenů souvisely se vznikem KP.

## Diskuse

Nejčastějším infekčním agens, na něž se zaměřovaly výzkumy uplynulých desetiletí, byl HPV. Důvodem je jeho prokázaná spojitost s karcinomem děložního hrdla. Jako první detekovali DNA HPV v prostatické tkáni McNicol a Dodd (1990), čímž odstartovali bouřlivý rozvoj na tomto poli. Hlavní charakteristikou všech studií týkajících se vztahu HPV a KP je jejich metodologická a velikostní rozrůzněnost. Týká se především velikosti zkoumané populace (17-300 subjektů), spektra vyšetřovaných typů HPV, laboratorních metod, způsobu odběru vzorků a jejich dalšího zpracování. Z tohoto důvodu je obtížné porovnávat jednotlivé práce mezi sebou.

Stručně vzato, statisticky významný rozdíl ve výskytu HPV mezi pacienty s KP a kontrolní skupinou (nejčastěji šlo o prostaty s BPH, výjimečně o prostaty „zdravé“) zaznamenaly jen 4 práce z 35 hodnocených.

S přímou detekcí patogenů v tkáňových vzorcích jsou spojeny některé potenciální problémy (Sutcliffe a Platz, 2007): a) patogen zodpovědný za nádorové bujení nemusí být v tkáni v okamžiku testu přítomen, b) počty vzorků bývají nízké, c) existuje možnost výběrového zkreslení (tzv. selection bias), d) není jasná časová souslednost přítomnosti patogenu a nádorového bujení, e) výsledek závisí na detekovaných sekvencích DNA, f) výsledek může být ovlivněn koncentrací patogenu a jeho lokalizací v tkáni, g) může dojít ke kontaminaci vzorku během jeho zpracování.

Obdobná úskalí mají i sérologické metody: a) zkříženou reaktivitu protilátek, b) možnost jejich vymizení v čase a nedostatečné znalosti o době jejich přetrvávání, c) ani zde není jasná časová souslednost infekce a vzniku nádorového bujení (Sutcliffe a Platz, 2007).

Z herpesvirů byly předmětem zkoumání CMV, HSV, EBV a HHV-8.

Identifikovali jsme 7 tkáňových a 2 sérologické studie, které se zabývaly vztahem CMV a KP. Jeho detekce v tkáni byla nízká (22 z 478 individuálních případů) a ani z přítomnosti protilátek není zřejmé, že by virus hrál etiologickou roli v patogenezi KP.

Baker et al. (1981) zaznamenali u pacientů s KP vyšší výskyt protilátek proti HSV i vyšší úspěšnost imunofluorescenční detekce HSV než u mužů s

BPH. Následující práce však přinesly jak rozporuplné, tak i přímo negativní výsledky. Tři ze čtyř sérologických prací nedoložily vztah mezi infekcí HSV a vyšším rizikem KP.

HHV-8 je prokazatelně spjat se vznikem Kaposiho sarkomu. Moniniho et al. (1996) nález HHV-8 v prostatě vedl dalším výzkumům, ale virus byl prokázán i v prostatách mužů bez KP. Ukázalo se, že jeho přítomnost v prostatě je spíše důsledkem jeho přítomnosti v těle pacientů s Kaposiho sarkomem než příčinou KP. Ani sérologické studie nehovoří pro kauzální vztah HHV-8 a KP.

Jako první publikovali nález EBV v buňkách KP Grinstein et al. (2002). Studií zaměřených tímto směrem je relativně málo a jako celek nepodporují hypotézu o propojení KP s infekcí EBV.

Onkogenní potenciál polyomavirů (BK virus a JC virus) je stále předmětem diskusí. Většina promořené populace se s infekcí setká již v dětství. Primoinfekce může proběhnout asymptomaticky, poté virus přetrvává v latentní formě, predilekčně v orgánech urogenitálního traktu. V okamžiku oslabení imunity je možná reaktivace (Zambrano et al., 2002). Onkogenní účinky polyomavirů zprostředkovává jejich tzv. antigen T, který blokuje funkci tumorsupresorových proteinů pRb a p53. Zajímavé jsou zprávy o přítomnosti antigenu T v ložiscích PIA, ale nikoli ve zdravém prostatickém epitelu (Das et al., 2008). Celkově vzato se však ani u polyomavirů nepodařilo prokázat souvislost s KP.

Časté sexuálně přenosné infekce *C. trachomatis* a *T. vaginalis* se vzhledem k vysoké prevalenci také staly předmětem zájmu výzkumníků. Dle valné většiny prací však dnes nejsou spojovány s vyšším rizikem KP.

Zajímavou prací týkající se mykoplazmat publikovali Barykova et al. (2011). Ribosomální 16S rRNA mykoplazmat detekovali u 25-55% prostat s karcinomem, avšak u žádné kontroly s BPH. Rozdíl v séropozitivitě byl statisticky signifikantní s vyšším výskytem u pacientů s KP. Koncentrace DNA mykoplazmat ve vzorcích měřená kvantitativní PCR stoupala v sekvenci BPH-PIN-KP (Barykova et al., 2011)! Případnou souvislost infekce mykoplazmaty s

onemocněním prostaty, ať již maligním či benigním, je však třeba v budoucnu dále ověřit.

V prostatě bylo v minulosti popsáno více mikroorganismů, přesnou totožnost některých z nich se však nepodařilo prokázat. Jejich přítomnost dokumentuje nález ribosomální bakteriální 16S rDNA ve fagosomech makrofágů. Četnější zmínky v literatuře se však týkají prakticky jen mikroba *Propionibacterium acnes* (Fassi-Fehri et al, 2011).

V roce 2006 byl popsán nový  $\gamma$ -retrovirus, tzv. xenotropní virus příbuzný viru myší leukémie (XMRV). Nalezen byl v prostatách pacientů homozygotních v genu pro ribonukleázu L (R462Q), který kóduje enzym s nižší aktivitou (Urisman et al, 2006). Podle posledních zpráv je však za novým virem ve skutečnosti laboratorní kontaminace (Hué et al, 2010, Cohen a Enserink, 2011). Zda je XMRV skutečně patogenem schopným působit na člověka, zůstává zatím otevřenou otázkou.

#### Závěr

Úlohu infekce v etiopatogenezi KP se nepodařilo objasnit přes úsilí trvajícím 30 let. Identifikace infekčního agens zodpovědného za vznik KP by přitom byla objevem zásadní důležitosti.

## 10. Publikace č. 2:

### **Sérové protilátky vůči infekčním agens urogenitálního ústrojí u pacientů s karcinomem prostaty a s benigní hyperplázií prostaty: studie případů a kontrol**

#### Úvod a cíle studie

Infekce hraje svou roli při vzniku řady lidských maligních nádorů. Zda mezi ně náleží i KP - významný zdravotní problém pro stárnoucí mužskou populaci v západních státech - je předmětem výzkumu od 70. let minulého století.

Přítomnost sérových protilátek je znakem probíhající nebo minulé infekce. Cílem studie bylo porovnat sérové protilátky vůči různým urogenitálním infekčním činitelům mezi pacienty s KP a s BPH. Předpokládali jsme, že vyšší hladiny nebo vyšší prevalence protilátek u pacientů s KP by podporovaly příčinnou souvislost mezi urogenitální infekcí v osobní anamnéze a vyšším rizikem KP.

Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky (IGA MZ ČR) NS9984. Je výsledkem spolupráce 4 institucí: Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, Oddělení experimentální virologie ÚHKT, Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV a Ústavu informatiky Akademie věd ČR, Oddělení nelineárního modelování.

#### Materiál a metody

Do studie jsme zahrnuli 434 mužů, kteří na Urologické klinice 3. LF a FNKV podstoupili v letech 2004-2010 otevřenou operaci prostaty: 329 pacientů s KP a 105 kontrol s BPH. Séra mužů zařazených do studie jsme vyšetřovali enzymoimunoanalýzou, komplement-fixačním testem a nepřímou imunofluorescencí. Hledali jsme protilátky proti běžným infekcím urogenitálního systému: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, HSV 1 a 2, CMV, C. trachomatis, M. hominis, U. urealyticum, N. gonorrhoeae a T. pallidum. Porovnávali jsme séroprevalence a výšky hladin protilátek mezi pacienty s

karcinomem a kontrolami. Hledali jsme souvislost mezi gradingem a stagingem nádoru a sérologickými nálezy.

### Výsledky

U pacientů s KP jsme zaznamenali vyšší výskyt protilátek proti *U. urealyticum* (OR 2,06; 95% CI 1,08-4,28). Naopak muži s BPH měli častěji protilátky vůči HPV 18 (OR 0,23; 95% CI 0,09-0,61) a *C. trachomatis* (OR 0,45; 95% CI 0,21-0,99) a také vyšší hladiny protilátek proti CMV ( $p=0,0004$ ). V podskupině pacientů s KP byla séropozitivita proti HPV 6 spojena s vyšším GS ( $p=0,0305$ ).

### Diskuse

Jediným způsobem, jak spolehlivě potvrdit či vyloučit přítomnost KP je histopatologické vyšetření preparátu z otevřené prostatektomie. V tom také spočívá jedinečnost naší studie (v kontextu celého dosavadního písemnictví), neboť takto striktní přístup k definici karcinomové a kontrolní skupiny dosud nikdo nepoužil.

Většina populačních studií těžila kontroly ze zdravotních registrů a spokojila se s absencí diagnózy KP jako dostatečným kvalifikačním kritériem pro zařazení do kontrolní skupiny. KP se však subklinicky vyvíjí roky, možná desetiletí a včlenění muže s latentním KP do kontrolní skupiny mohlo vychýlit konečnou statistiku ve prospěch nulové hypotézy.

Výlučné použití preparátů z otevřených výkonů umožnilo také korelovat sérologická data s lokálním stagingem onemocnění a jeho biologickou agresivitou (gradingem). Ani z takového úhlu pohledu se zatím žádná studie touto problematikou nezabývala. Zde jsme zaznamenali rozdíl v případě HPV 6 - séropozitivní pacienti měli v průměru vyšší GS než séronegativní podskupina (viz. Diskuse u Publikace č. 4).

Muži s BPH měli častěji protilátky proti HPV 18 a *C. trachomatis*. Z dříve publikovaných studií pouze jedna dospěla k obdobnému výsledku u chlamydií (Antilla et al., 2005). V případě HPV naopak jediná z publikovaných

prací našla vyšší prevalenci protilátek vůči HPV 18 u pacientů s KP (OR 4,0; 95% CI 1,17-5,75) (Dillner et al, 1998).

Naše zjištění nepodporují hypotézu o souvislosti infekcí s etiopatogenezí KP. Nepřímo však podporují tvrzení některých autorů o tom, že BPH může být mimo jiné výsledkem imunitních zánětlivých procesů (Kramer et al, 2007).

Dosud žádná práce se nezabývala potenciální souvislostí KP s mykoplazmovou infekcí. Dle našeho nejlepšího vědomí a svědomí jako první přinášíme zprávu o vyšším výskytu protilátek proti *U. urealyticum* ve skupině pacientů s KP oproti kontrolám s BPH (OR 2,06; 95% CI 1,08-4,28).

Výskyt protilátek proti *N. gonorrhoeae* a *T. pallidum* byl v obou srovnávaných skupinách obdobný. Nízká četnost výskytu těchto chorob však limituje možnosti statistiky, i kdyby séroprevalence byla významně odlišná.

#### Závěr

Přítomnost protilátek vůči zkoumaným infekčním agens nebyla v našem souboru spojena s vyšším rizikem vzniku KP. Pouze v případě *U. urealyticum* jsme našli protilátky častěji u pacientů s KP než u mužů s BPH. Vyšší séroprevalenci protilátek vůči *U. urealyticum* u pacientů s KP referujeme jako první v celosvětovém kontextu.

Vyšší hladiny sérových protilátek nemají v našem souboru spojitost s rizikem KP.

Přítomnost nebo nepřítomnost protilátek nebyla prediktorem stádia onemocnění.

## 11. Publikace č. 3:

### **Přítomnost HPV v organismu a jeho role v onkogenezi nádorů prostaty.**

#### Úvod a cíle studie

HPV působí karcinogenně v několika anatomických lokalizacích u mužů i žen. Zda přítomnost HPV v močopohlavním ústrojí mužů představuje vyšší riziko vzniku KP, se zkoumá již delší dobu a závěry stále nejsou jednoznačné. Stejně tak nepanuje dosud shoda na tom, jaké místo v organismu je rezervoárem HPV.

Studie si klade za cíl zkoumat vztah KP a infekce HPV vyjádřené přítomností protilátek v séru nebo DNA HPV v prostatické tkáni. Druhým cílem je přispět k nalezení rezervoáru HPV v mužském organismu.

Práce vznikla za finanční podpory IGA MZ ČR NS9984 a NS10656-3. Je výsledkem spolupráce 3 institucí: Oddělení experimentální virologie ÚHKT, Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV a Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV.

#### Materiál a metody

Pomocí polymerázové řetězové reakce jsme vyšetřovali tkáňové vzorky 146 pacientů s KP (n=51) a s BPH (n=95) na přítomnost DNA HPV a u pozitivních vzorků jsme dále určovali jeho genotyp. U všech pacientů jsme pátrali po přítomnosti HPV v močové trubici formou uretrálního výtěru v den operace. Séra všech pacientů a 172 zdravých kontrol (registrovaných dárců krve) byla podrobena enzymoimunoanalýze. Dále jsme vyšetřili nenádorovou tkáň 256 bioptických vzorků získaných při otevřených operacích z různých anatomických lokalizací.

#### Výsledky

Rozborem tkání jsme nezjistili žádný rozdíl v přítomnosti HPV u histopatologických vzorků KP a BPH (v obou případech 2%). Hladiny sérových protilátek se také významně nelišily s výjimkou protilátek proti HPV 6, které

se častěji vyskytovaly u pacientů s karcinomem ( $p=0,018$ ). Rozdíl jsme nezaznamenali v přítomnosti protilátek proti onkoproteinům E6/E7 HPV 16.

Ze 146 uretrálních výtěrů se amplifikace PCR nezdařila u 10%. Nalezli jsme celkem 17 různých genotypů HPV, nejčastější byl výskyt HPV 16. Vyšší míru detekce jsme zaznamenali u mužů s BPH ( $p=0,040$ ).

HPV jsme detekovali ve 4% z 256 bioptických vzorků z různých tkání, nejčastěji v prepuciu.

## Diskuse

Účelem studie bylo zkoumat potenciální spojitost mezi KP a infekcí HPV současným použitím epidemiologických, molekulárně biologických a imunologických metod. Vyhodnocovali jsme přítomnost DNA HPV v prostatické tkáni, v uretře operovaných pacientů a přítomnost protilátek proti různým typům HPV. Pacienti vyplňovali dotazník týkající se rizikových faktorů infekce HPV (kouření, věk při zahájení pohlavního života) a potenciálních rizikových faktorů nádorového onemocnění (pozitivní rodinná anamnéza, předchozí protinádorová léčba atd.).

V žádném z rizikových faktorů obsažených v dotazníku jsme mezi skupinou s KP a s BPH nezaznamenali významný rozdíl, včetně údaje o zánětlivých onemocněních urogenitální soustavy v osobní anamnéze.

Snažili jsme se vyhnout nedostatkům dříve publikovaných studií, které by mohly mít vliv na validitu výsledků. Ke zvýšení senzitivity a specifity jsme k detekci HPV v tkáni používali tzv. vmezeřenou (nested) PCR, která využívá k detekci DNA dvou setů primerů - degenerovaného MY09/11 a obecného GP5+/6+. U vyšetřování uretrálních stěrů následovala reverzní hybridizace na membráně, která dokáže odlišit až 37 různých typů HPV a zjistit i multiplicitní infekci. Korelace tkáňových a uretrálních nálezů měla sloužit k vyloučení možné kontaminace prostatické tkáně HPV usídlenými v močové trubici.

Detekce DNA v tkáni byla shodně 2% u pacientů s KP i s BPH; rozdíl nezaznamenala ani většina předcházejících prací. Z nedávné meta-analýzy vyplynulo, že pacienti s KP měli v prostatě častěji DNA HPV 16 než kontroly

(OR 1,6; 95% CI 1,07-2,20) (Lin et al, 2011). Vzhledem k rozdílnosti studijních schémat a dalším faktorům (diskutovaným v Publikaci č. 1) je však validita jakékoli meta-analýzy diskutabilní.

Vyšší detekce HPV DNA v močové trubici našich pacientů oproti předchozím pracem (Giuliano et al., 2007) může být způsobena odlišnou metodikou, kterou jsme použili (zahrnující koncentraci získané DNA) nebo geografickými rozdíly.

V prevalenci protilátek vůči různým typům HPV jsme nenalezli podstatné rozdíly, což je ve shodě s většinou dřívějších publikací. Výjimku tvoří HPV 6: protilátky se vyskytovaly častěji pacientů s KP než u kontrolní skupiny zdravých osob. K podobnému závěru zatím žádná jiná studie nedospěla; musíme tedy brát v úvahu možnost, že se jedná o náhodu.

Protilátky proti onkoproteinům HPV E6/E7 se běžně vyskytují u pacientů s malignitami, jež jsou etiologicky spojeny s HPV. U zdravých osob je prakticky nenalézáme. Ani v tomto případě jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů s BPH a s KP.

V rámci pátrání po rezervoáru HPV v mužském organismu našly dříve publikované práce HPV na prepuciu, na glandu i na kůži skrota. Jiné pátraly po HPV ve spermiích versus seminální plasmě (Lai et al, 1996). Prevalence udávané v různých studiích se liší především podle používaných systémů pro detekci HPV. V naší studii jsme nejvyšší výskyt DNA HPV zaznamenali na prepuciu (14,8%) a nejčastějším detekovaným subtypem byl HPV 16.

### Závěr

Výsledky naší studie podporují dosavadní publikovaná data, která nenaznačují souvislost HPV s etiopatogenezí KP. Řada lokalizací mužského pohlavního systému se však může uplatňovat jako rezervoár HPV.

## 12. Publikace č. 4:

### **Infekční onemocnění urogenitálního traktu v anamnéze nemají vliv na biologické chování a prognózu karcinomu prostaty**

#### Úvod a cíle studie

Souvislost mezi infekčním onemocněním urogenitálního traktu a KP se ani po 30 letech výzkumů na tomto poli nepodařilo prokázat. Zatím se však nikdo nezabýval otázkou, zda infekce může ovlivnit vlastnosti a průběh tohoto maligního onemocnění. Přítomnost specifických sérových protilátek je znakem prodělané infekce: hledali jsme možnou spojitost mezi přítomností sérových protilátek proti rozličným pohlavně přenosným infekčním činitelům a biologickým chováním KP.

Práce vznikla za finanční podpory IGA NS9984. Je výsledkem spolupráce 4 institucí: Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, Oddělení experimentální virologie ÚHKKT, Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV a Ústavu informatiky Akademie věd ČR, Oddělení nelineárního modelování.

#### Materiál a metody

Do naší studie případů a kontrol jsme zahrnuli 317 pacientů, kteří podstoupili RRP pro klinicky lokalizovaný KP. Zkoumali jsme tyto sexuálně přenosné uropatogeny: CMV, HSV 1 a 2, HPV 6, 11, 16, 18, 31 a 33, C. trachomatis, M. pneumoniae, U. urealyticum, N. gonorrhoeae a T. pallidum. Přítomnost a titry specifických protilátek jsme vyhodnotili ve vztahu k histopatologickým charakteristikám tumoru: k lokálnímu rozsahu, GS a hladině PSA.

#### Výsledky

Průměrný věku pacientů byl 63 (39-81) let, průměrná koncentrace PSA 9,1 ng/ml. V definitivních histopatologických preparátech byly stejnou měrou zastoupeny lokalizované a lokálně pokročilé formy onemocnění. Polovina pacientů měla GS  $\leq 6$ , 11% nádorů mělo GS 8-10.

Nezaznamenali jsme statisticky významný rozdíl mezi séropozitivními a séronegativními pacienty ani ve výšce PSA, ani GS s výjimkou HPV 6. Nebyl rozdíl ve výšce titrů protilátek u pacientů s lokalizovaným vs. lokálně pokročilým onemocněním.

#### Diskuse

Navzdory velikosti zkoumaného souboru a zahrnutí řady uropatogenních mikroorganismů do statistických rozborů se nám nepodařilo prokázat, že by prodělaná urogenitální infekce ovlivňovala biologické chování KP. Jediným statisticky významným zjištěním byl rozdíl v průměrné výšce GS mezi pacienty s protilátkami proti HPV 6 a jejich séronegativními protějšky. Ačkoli statisticky významná, z klinického pohledu se tato odlišnost průměrné hodnoty GS 6,45 v séronegativní a 6,75 v séropozitivní skupině nejeví jako podstatná. Jednak představuje rozdíl 0,3 na škále GS od 2 do 10 přibližně 4 procentní body, jednak se stále pohybujeme v pásmu GS 2-7, pro něž (při splnění dalších kritérií) aktuální guidelines Evropské urologické společnosti doporučují jako hlavní modalitu léčby RRP (Heidenreich et al, 2012, s. 53).

HPV 6 a 11 jsou spojovány s benigními kožními lézemi typu špičatých kondylomat. Zajímavou je v této souvislosti informace o možné souvislosti HPV 6/11 s maligní transformací benigního onemocnění dýchacího systému – rekurentní respirační papilomatózy (Jeong et al, 2009).

Pokud je nám známo, nikdo – a to ani ve světové literatuře – se dosud nezabýval problematikou infekce a KP z takového úhlu pohledu jako naše studie. K provedeným analýzám (stanovení rozsahu nádoru a definitivního GS) je totiž třeba vyšetřit celou prostatu, tzn. preparát z otevřené prostatektomie, což je technicky a organizačně náročné.

#### Závěr

V našem souboru jsme neprokázali vztah mezi biologickým chováním KP (tedy jeho prognózou) a infekčním onemocněním urogenitálního traktu v anamnéze pacientů.

## 13. Závěr

Cílem této disertační práce bylo přispět k objasnění vztahu mezi prodělanou infekcí urogenitálního traktu a pozdějším vznikem KP. Zahrnuje 4 publikované práce, které se touto problematikou zabývají.

V publikaci č. 1 jsme podali ucelený přehled dosavadních výsledků vědeckovýzkumné činnosti na tomto poli. Formou systematického přehledového článku jsme kriticky zhodnotili 74 relevantních původních prací. Z rozboru plných textů publikací vyplynulo, že naprostá většina dosud shromážděných dat nepodporuje hypotézu o etiologické roli zkoumaných infekčních činitelů v patogenezi KP. K ojediněle se vyskytujícím pracem, které přinášejí zprávy o pozitivní asociaci KP s některou infekcí, je třeba přistupovat kriticky a vyčkat vícenásobného potvrzení takových nálezů v průběhu času.

V publikaci č. 2 jsme na vlastním souboru pacientů sérologickými metodami ověřovali hypotézu, že pacienti s KP mají vyšší séroprevalenci nebo vyšší hladiny sérových protilátek než muži s BPH. To by naznačovalo úlohu infekce v rozvoji KP. Zjistili jsme statisticky významně vyšší výskyt protilátek proti *U. urealyticum* ve skupině pacientů s karcinomem oproti kontrolní skupině mužů s BPH. Naopak statisticky významně nižší byla prevalence protilátek proti HPV 18 a *C. trachomatis* a také průměrný titr protilátek proti CMV. Nejsme si vědomi, že by kdokoli před námi zkoumal vztah mezi mykoplazmaty a KP. Data udávající vyšší výskyt protilátek proti *U. urealyticum* u pacientů s KP jsou první svého druhu na světě.

V publikaci č. 3 jsme na našem souboru pacientů zkoumali vztah mezi HPV a rizikem vzniku KP a pátrali po rezervoáru HPV v mužském organismu. Neprokázáli jsme žádný rozdíl ve výskytu DNA HPV v prostatické tkáni pacientů s KP versus s BPH. Nelišil se ani výskyt sérových protilátek proti HPV s výjimkou genotypu HPV 6: vyšší prevalenci jsme našli u pacientů s karcinomem. Nejčastějším místem detekce HPV byla předkožka.

V publikaci č. 4 jsme na stejném souboru pacientů jako v publikaci č. 2 ověřovali možnost, že by prodělaná infekce urogenitálního traktu mohla

ovlivnit histopatologické charakteristiky a biologické chování již vzniklého KP. Porovnávali jsme hladinu PSA a GS nádoru u séropozitivních versus séronegativních pacientů a také průměrnou výšku titrů protilátek mezi pacienty s lokalizovanými a lokálně pokročilými nádory. Nezjistili jsme významné rozdíly v žádném z porovnání s výjimkou průměrného GS, které bylo vyšší u pacientů séropozitivních vůči HPV 6 než u pacientů bez protilátek proti HPV 6. Z klinického hlediska však rozdíl za významný nepovažujeme.

Naše výsledky získané v tomto výzkumném projektu potvrzují negativní vyznění většiny dosud publikovaných prací. Originální přínos spočívá v dříve neaplikované metodice založené výhradně na histopatologických rozborech celých prostat získaných otevřenou operací. Jako první jsme zkoumali vztah mezi infekcí mykoplazmaty a rizikem KP a přinesli zprávu o vyšším výskytu protilátek vůči *U. urealyticum* u pacientů s KP. I zde platí, že toto dosud izolované pozorování musí potvrdit další studie, než bude možné z něj vyvodit jakékoli důsledky.

## 14. Souhrn

Možnou existencí kauzálního vztahu mezi infekčními onemocněními urogenitálního traktu a vyšším rizikem vzniku KP se od 80. let minulého století zabývala řada studií. Nalezení infekčního agens etiopatogeneticky spjatého s KP by umožnilo prevenci tohoto častého onemocnění a cíleně zaměřený screening v exponovaných populacích.

V našem vědeckém projektu jsme hledali protilátky proti vybraným uropatogenům ve skupině pacientů s histologicky potvrzeným KP a v kontrolní skupině mužů s BPH. Ověřovali jsme hypotézu, že subjekty s KP budou mít častěji protilátky proti některým mikrobiálním činitelům, což by hovořilo ve prospěch teorií o příčinné souvislosti KP s předchozí expozicí infekčnímu agens. V případě HPV jsme také provedli tkáňové analýzy ve snaze detekovat DNA viru v prostatické tkáni.

Jako první v celosvětovém měřítku jsme hledali možný vztah mezi KP a infekcí *M. hominis* a *U. urealyticum* a našli významně vyšší prevalenci protilátek proti *U. urealyticum* u pacientů s KP. Zatím také nikdo nezkoumal, zda prodělaná infekce může měnit biologické vlastnosti již vzniklého KP. Naše subanalýza k takovému závěru nedospěla. Další získaná data potvrzují většinu dosud publikovaných výsledků, které nesvědčí o kauzální roli infekce při vzniku KP.

Originální přínos práce spočívá v dosud nepoužité metodice založené na exaktním histopatologickém rozboru preparátů výhradně z otevřených prostatektomií, což nám umožnilo jednoznačné zařazení subjektů mezi případy, nebo kontroly.

Kauzální vztah mezi KP a infekcí urogenitálního traktu v anamnéze jsme v našem souboru pacientů nepotvrdili. Otázka zůstává nicméně otevřena, stejně jako celá problematika etiopatogeneze KP, a jistě bude předmětem dalšího bádání.

## 15. Summary

A number of studies have addressed the role of genitourinary infections in prostate cancer (PC) pathogenesis since 1980's. Identification of an infectious agent responsible for prostatic carcinogenesis would make it possible to screen for and prevent the disease in exposed populations.

In our project, we investigated the prevalence of antibodies to selected genitourinary pathogens in patients with histopathological evidence of PC and in men with benign prostatic hyperplasia. We were testing the hypothesis that PC patients would be more likely to harbor antibodies than controls. This would favor the infectious theory of PC initiation. In case of human papillomavirus (HPV), tissue analyses were performed aimed at the detection of HPV DNA in prostatic tissue samples.

To our knowledge, we were the first to look for a potential association between PC and *Mycoplasma hominis*/*Ureaplasma urealyticum* infection. Men with PC were more likely to have *U. urealyticum* antibodies. We analyzed the subset of PC patients to find whether infection may change PC biological behavior, with a null result. Other data obtained in our study support the negative findings from the majority of previously published studies.

Besides the abovementioned results, an original contribution of this work lies in the methodology used. Open prostate surgery specimens only were used for exact histopathological assessment which allowed for a definite allocation of a subject either to PC or control group.

A link between genitourinary infections and the risk of developing PC was not identified in our patient sample. However, the question remains unresolved as well as the whole issue of PC etiopathogenesis. Further research in the field is therefore warranted.

## 16. Literatura

- ANTILLA, T., TENKANEN, L., LUMME, S., et al, 2005. Chlamydial antibodies and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(2), 385-389. ISSN 1055-9965.
- BABJUK, M., MATOUŠKOVÁ, M., FÍNEK, J., et al, 2009. *Konsenzuální doporučené postupy v uroonkologii*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-639-7.
- BAKER, L.H., MEBUST, W.K., CHIN, T.D. et al, 1981. The relationship of herpesvirus to carcinoma of the prostate. *J Urol.* 125, 370-4. ISSN 0022-5347.
- BARYKOVA, Y.A., LOGUNOV, D.Y., SHMAROV, M.M., et al, 2011. Association of Mycoplasma hominis infection with prostate cancer. *Oncotarget.* 2(4), 289-97. ISSN 1949-2553.
- BLAHETA, R.A., WEICH, E., MARIAN, D., et al, 2006. Human cytomegalovirus infection alters PC3 prostate carcinoma cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix. *Neoplasia.* 8(10), 807-16. ISSN 1522-8002.
- BRINK, A.A.T.P., SNIJDERS, P.J.F., MEIJER, C.J.L.M., 2007. HPV detection methods. *Dis Markers.* 23, 273–281. ISSN 0278-0240.
- COHEN, J., ENSERINK, M., 2011. Virology. False positive. *Science.* 333, 1694-1701.
- ČIHÁK, R., 2002. *Anatomie 2*. 2. uprav. a doplněné vyd. Praha: Grada. ISBN 80-247-0143-X.
- DALTON-GRIFFIN, L., KELLAM, P., 2009. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol.* 8(7), 67. ISSN 2158-9151.
- DANIELS, N.A., EWING, S.K., ZMUDA, J.M., WILT, T.J., BAUER, D.C., 2005. Correlates and prevalence of prostatitis in a large community-based cohort of older men. *Urology.* 66, 964–70. ISSN 0090-4295.
- DAS, D., WOJNO, K., IMPERIALE, M.J., 2008. BK Virus as a Cofactor in the Etiology of Prostate Cancer in Its Early Stages. *J Virol.* 82(6), 2705-14. ISSN 0022-538X.

- DE MARTEL, C., FERLAY, J., FRANCHESCHI, S., et al, 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13(6), 607-15. ISSN 1470-2045.
- DE MARZO, A.M., PLATZ, E.A., SUTCLIFFE, S., et al, 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 7(4), 256-269. ISSN 1474-175X.
- DENNIS, L.K., LYNCH, C.F., TORNER, J.C., 2002. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*. 60(1), 78-83. ISSN 0090-4295.
- DILLNER, J., KNEKT, P., BOMAN, J., et al, 1998. Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int J Cancer*. 75, 564-567. ISSN 1097-0215.
- DOORBAR, J, 2007. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers*, 23, 297-313. ISSN 0278-0240.
- DUŠEK, L., MUŽÍK, J., KUBÁSEK, M., KOPTÍKOVÁ, J., ŽALOUDÍK, J., VYZULA, R., 2005. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita, [cit. 2012-11-13]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. ISSN 1802-8861.
- FASSI FEHRI, L., MAK, T.N., LAUBE, B., et al, 2011. Prevalence of Propionibacterium acnes in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells. *Int J Med Microbiol*. 301(1), 69-78. ISSN 1438-4221.
- FERLAY, J., PARKIN, D.M., STELIAROVA-FOUCHER, E., 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 46, 765-781. ISSN 1365-2354.
- GIULIANO, A.R., NIELSON, C.M., FLORES, R., et al, 2007. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: The HPV detection in men study. *J Infect Dis*. 196, 1146-1152. ISSN:0022-1899.
- GIULIANO, A.R., TORTOLERO-LUNA, G., FERRER, E., et al, 2008. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions. *Vaccine*. 26(Suppl 10), K17-K28. ISSN 0264-410X.

- GOODISON, S., NAKAMURA, K., ICZKOWSKI, K.A., ANAI, S., BOEHLEIN, S.K., ROSSER, C.J., 2007. Exogenous mycoplasmal p37 protein alters gene expression, growth and morphology of prostate cancer cells. *Cytogenet Genome Res.* 118, 204–213. ISSN 1424-8581.
- GRINSTEIN, S., PRECIADO, M.V., GATTUSO, P., et al, 2002. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res.* 62, 4876-4878. ISSN 0008-5472.
- HAYES, R.B., POTTERN, L.M., STRICKLER, H., et al, 2000. Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer*:82(3), 718–725. ISSN 0007-0920.
- HEIDENREICH, A., BASTIAN, P.J., BELLMUNT, J., et al, 2012. Guidelines on Prostate Cancer. In: *European Association of Urology Guidelines, 2012 edition*. Arnhem: Drukkerij Gelderland. ISBN/EAN 978-90-79754-83-0. Dostupné také z: <http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/>
- HUANG, W.Y., HAYES, R., PFEIFFER, R., et al, 2008. Sexually Transmissible Infections and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(9), 2374–2381. ISSN 1055-9965.
- HUÉ, S., GRAY, E.R., GALL, A. et al, 2010. Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology.* 7:111.
- JEONG, W.J., PARK, S.W., SHIN, M., et al, 2009. Presence of HPV type 6 in dysplasia and carcinoma arising from recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck.* 31(8), 1095–1101. ISSN 1097-0347.
- KAWACIUK, I., 2009. *Urologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-627-7.
- KETCHAM, C.M., ANAI, S., REUTZEL, R., et al, 2005. p37 Induces tumor invasiveness. *Mol Cancer Ther.* 4(7), 1031-8. ISSN 1543-9135.
- KIRBY, R.S., PATEL M.I., 2009. *Fast Facts: Prostate Cancer*. Oxford: Health Press. ISBN 978-1-90583257-6.
- KLENER, P., 2002. Etiologie a patogeneze nádorového procesu. In: KLENER, P, ABRAHÁMOVÁ, J., FAIT, V, et al. *Klinická onkologie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-151-3.

- KRAMER, G., MITTEREGGER, D., MARBERGER, M., 2007. Is Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) an Immune Inflammatory Disease? *Eur Urol* 51, 1202-1216. ISSN 0302-2838.
- KUNDU, S.D., LEE, C., BILLIPS, B.K., et al, 2008. The Toll-Like Receptor Pathway: A Novel Mechanism of Infection-Induced Carcinogenesis of Prostate Epithelial Cells. *Prostate*. 68, 223-229. ISSN 1097-0045.
- LAI, Y.M., YANG, F.P., PAO, C.C., 1996. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril* 65, 1026-30. ISSN 0015-0282.
- LIN, Y., MAO, Q., ZHENG, X., et al, 2011. Human papillomavirus 16 or 18 infection and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Ir J Med Sci*. 180, 497-503. ISSN 0021-1265.
- McNEAL, J.E., 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. 2(1), 35-49. ISSN 1097-0045.
- McNICOL, P., DODD, J.G., 1990. Detection of Human Papillomavirus DNA in Prostate Gland Tissue by Using the Polymerase Chain Reaction Amplification Assay. *J Clin Microbiol*. 28(3), 409-412. ISSN 0095-1137.
- MICHAELIS, M., DOERR, H.W., CINATL, J., 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: Increasing evidence and open questions. *Neoplasia*. 11(1), 1-9. ISSN 1522-8002.
- MONINI, P., de LELLIS, L., FABRIS, M., RIGOLIN, F., CASSAI, E., 1996. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med*. 334(18), 1168-72. ISSN 0028-4793.
- MOYER, V.A., 2012. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 17, 157(2), 120-34. ISSN 0003-4819.
- MÜNGER, K., HOWLEY, P.M., 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 89, 213-228. ISSN 0168-1702.
- NAGHASHFAR, Z., DiPAOLO, J.A., WOODWORTH, C.D., PASSANITI, A., 1996. Immortalization of human adult prostatic adenocarcinoma cells by human papilloma virus HPV16 and -18 DNA. *Cancer Lett*. 100, 47-54. ISSN 0304-3835.

- NAMIKI, K., GOODISON, S., PORVASNIK, S., et al, 2009. Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS ONE*. 4(9), e6872. ISSN 1932-6203.
- PAGLIUSI, S.R., GARLAND, S.M., 2007. International standard reagents for HPV detection. *Dis Markers*. 23, 283–296. ISSN 0278-0240.
- PALAPATTU, G.S., SUTCLIFFE, S., BASTIAN, P.J., et al, 2004. Prostate carcinogenesis and inflammation: Emerging insights. *Carcinogenesis*. 26, 1170-1181. ISSN 0143-3334.
- PORŠ, J., KOLOMBO, I., HANUŠ, T., PORŠOVÁ, M., 2007. Sexuálně přenosné nemoci. In: KOLOMBO, I., HANUŠ, T., PORŠ, J., et al. *Infekce močových cest*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-445-8.
- RAVICH, A., RAVICH, R.A., 1950. Prophylaxis of cancer of the prostate, penis, and cervix by circumcision. *NY State J Med*. 50, 1519-1520. ISSN 0028-7628.
- RHIM, J.S., WEBBER, M.M., BELLO, D., et al, 1994. Stepwise immortalization and transformation of adult human prostate epithelial cells by a combination of HPV-18 and v-Ki-ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6, 91(25), 11874-8. ISSN 1091-6490.
- ROBERT, G., DESCAZEAUD, A., ALLORY, Y., VACHEROT, F., de la TAILLE, A., 2009. Should We Investigate Prostatic Inflammation for the Management of Benign Prostatic Hyperplasia? *Eur Urol Suppl* 8, 879-886. ISSN 1569-9056.
- SABIN, A.B., TARRO, G., 1973. Herpes simplex and herpes genitalis viruses in etiology of some human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(11), 3225-9. ISSN 1091-6490.
- SALONIA, A., BURNETT, A.L., GRAEFEN, M., et al, 2012. Prevention and management of postprostatectomy sexual dysfunctions. Part 1: choosing the right patient at the right time for the right surgery. *Eur Urol*. 62(2), 261-72. ISSN 0302-2838.
- SHEW, M.L., FORTENBERRY, J.D., 2005. HPV infection in adolescents: natural history, complications, and indicators for viral typing. *Semin Pediatr Infect Dis*. 16(3), 168-74. ISSN:1045-1870.

- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A., 2012. Cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin.* 62(1), 10-29. ISSN 0007-9235.
- STARAS, S.A.S., DOLLARD, S.C., RADFORD, K.W., FLANDERS, W.D., PASS, R.F., CANNON, M.J., 2006. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Inf Dis.* 43, 1143-1151. ISSN 1058-4838.
- SUTCLIFFE, S., GIOVANNUCCI, E., De MARZO, A.M., LEITZMANN, M.F., WILLETT, W.C., PLATZ, E.A., 2006. Gonorrhea, Syphilis, Clinical Prostatitis, and the Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(11), 2160-2166.
- SUTCLIFFE, S., GIOVANNUCCI, E., GAYDOS, C.A., et al, 2007. Serum antibodies against Chlamydia trachomatis, human papillomavirus, and human herpesvirus type 8 in relation to prostate cancer: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(8), 1573-1580. ISSN 1055-9965.
- SUTCLIFFE, S., PLATZ, E.A., 2007. Inflammation in the etiology of prostate cancer: An epidemiologic perspective. *Urol Oncol.* 25, 242-249. ISSN 1078-1439.
- TAYLOR, M.L., MAINOUS, A.G., WELLS, B.J., 2005. Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis. *Fam Med.* 37(7), 506-512. ISSN 1544-1709.
- URISMAN, A., MOLINARO, R.J., FISCHER, N., et al, 2006. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.* 2(3), e25. ISSN 1553-7374.
- VELÁSQUEZ, E., PEIX, A., GÓMEZ-ALONSO, A., 2011. Microorganismos y cáncer: evidencias científicas y nuevas hipótesis. *Cir Esp.* 89(3), 136-144. ISSN 0009-739X.
- WAGENLEHNER, F.M.E., WEIDNER, W., NABER, K.G., 2006. Chlamydial infections in urology. *World J Urol.* 24, 4-12. ISSN 0724-4983.
- WEIJERMAN, P.C., KÖNIG, J.J., WONG, S.T., NIESTERS, H.G., PEEHL, D.M., 1994. Lipofection-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Res.* 54(21), 5579-83. ISSN 0008-5472.

- XU, F., SCHILLINGER, J.A., STERNBERG, M.R., et al, 2002. Seroprevalence and Coinfection with Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in the United States, 1988–1994. *J Infect Dis.* 185, 1019–1024. ISSN 0022-1899.
- ZAMBRANO, A., KALANTARI, M., SIMONEAU, A., JENSEN, J.L., VILLARREAL, J.R., 2002. Detection of Human Polyomaviruses and Papillomaviruses in Prostatic Tissue Reveals the Prostate as a Habitat for Multiple Viral Infections. *Prostate.* 53, 263-276. ISSN 1097-0045.
- ZHAN, P., SUO, L.J., QIAN, Q., et al, 2011. Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer.* 47(5), 742-7. ISSN 0959-8049.

## 17. Přílohy

1/ HRBÁČEK, J., URBAN, M., HAMŠÍKOVÁ, E., TACHEZY, R., HERÁČEK, J. Thirty years of research on infection and prostate cancer: no conclusive evidence for a link. A systematic review. *Urol Oncol Semin Invest.* ISSN 1078-1439. V tisku. IF 3,22/2011

2/ HRBÁČEK, J., URBAN, M., HAMŠÍKOVÁ, E., TACHEZY, R., EIS, V., BRABEC, M., HERÁČEK, J., 2011. Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer.* 11:53. ISSN 1471-2407. IF 2,74/2011

*I. cena České urologické společnosti za článek publikovaný v r. 2011 v časopise s IF*

3/ TACHEZY, R., HRBÁČEK, J., HERÁČEK, J., SALÁKOVÁ, M., ŠMAHELOVÁ, J., LUDVÍKOVÁ, V., ŠVEC, A., URBAN, M., HAMŠÍKOVÁ, E., 2012. HPV persistence and its oncogenic role in prostate tumors. *J Med Virol.* 84(10), 1636-1645. ISSN 0146-6615. IF 2,82/2011

4/ HRBÁČEK, J., URBAN, M., EIS, V., HAMŠÍKOVÁ, E., TACHEZY, R., BRABEC, M., HERÁČEK, J., 2011. Infekční onemocnění urogenitálního traktu v anamnéze nemají vliv na biologické chování a prognózu karcinomu prostaty. *Ces Urol.* 15(3), 172-180. ISSN 1211-8729.



## Review article

# Thirty years of research on infection and prostate cancer: No conclusive evidence for a link. A systematic review<sup>☆</sup>

Jan Hrbacek, M.D.<sup>a,b</sup>, Michael Urban, M.D.<sup>a,b</sup>, Eva Hamsikova, M.Sc.<sup>c</sup>,  
Ruth Tachezy, M.Sc., Ph.D.<sup>c</sup>, Jiri Heracek, M.D., Ph.D.<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Charles University in Prague, 3rd Faculty of Medicine, Department of Urology, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Královské Vinohrady Teaching Hospital, Department of Urology, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

Received 20 November 2011; received in revised form 30 January 2012; accepted 31 January 2012

## Abstract

**Background:** The potential role of genitourinary infection in the etiology of prostate cancer (CaP) has been extensively investigated for 30 years. Two basic approaches have been used: tissue-based methods (polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization) and serologic assays (enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence, etc.). The objective of this review was to answer the question of whether infection of the male genitourinary tract may have a role in the etiology of CaP.

**Materials and methods:** We have carried out a systematic review of the evidence that was published in the MEDLINE/PubMed database until December 2011. The search terms included “prostate cancer,” “infection,” and the explicit names of the various infectious agents. Additional studies were identified using a reference search. A total of 74 papers were included in the review, which cover the following infectious agents: human papillomavirus, cytomegalovirus, herpes simplex virus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus, BK virus, JC virus, chlamydia, mycoplasma, ureaplasma, trichomonas, neisseria, treponema, Propionibacterium acnes, xenotropic murine leukemia virus-related virus and Candida albicans.

**Results:** Despite the variable study designs and methodological approaches that were used, most of the pathogens that were studied were unlikely to be directly involved in prostate carcinogenesis.

**Conclusions:** The role of infection in the etiology of CaP has yet to be determined despite 30 years of research efforts. A discovery of an infectious agent that is associated with CaP would be of great medical importance; however, such a link would have to be firmly established before impacting on patient care. © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Prostate cancer; Infection; Etiology; Sexually transmitted diseases; Serology

## 1. Introduction

Prostate cancer (CaP) is one of the most common malignancies in the Western world. In the USA, a total of 240,890 new cases were estimated to occur in 2011 (29% of all new cancer cases in men except for basal and squamous cell skin carcinomas) and 32,720 men were expected to die from CaP (11% of all cancer-related deaths) [1]. In 2008, the number of new cases in the 27 countries of the European Union was 338,730 (25% of all new cancers) and the number of deaths reached 70,820 (10% of deaths from cancer) [2].

Small foci of CaP are harbored by the prostates in 80% of men over 80 years old [3] and many die from other causes without knowing they suffer from CaP. Clinically significant CaP generally affects men in their sixties but is probably initiated years or decades earlier; therefore, it is difficult to establish the primary insult that triggers prostate carcinogenesis. Causative factors have been found in other genitourinary malignancies, which can be targeted (e.g., smoking in cases of bladder cancer or the human papillomavirus in cases of cervical cancer). However, the principal risk factors in CaP are not modifiable: being African-American or having CaP in the family history [4]. After the initiation of prostatic specific antigen (PSA) screening in the early 1990s, CaP incidence has drastically increased along with a shift to earlier stages among newly diagnosed cases

<sup>☆</sup> This work was funded by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, grant Number NS9984

\* Corresponding author. Tel.: +420267162609; fax: +420267172999.

E-mail address: heracekj@seznam.cz (J. Heracek).

[4]. Even if CaP is successfully managed, which is the usual outcome in localized disease, treatment may be accompanied by functional consequences (erectile dysfunction, incontinence, etc.) and impair the patient's quality of life. In addition, there are limited therapeutic options available for advanced CaP, and metastatic disease remains incurable. Finally, the management of CaP within a large population of elderly men imposes an economic burden on health care systems, particularly in the gradually aging Western populations. Finding a potentially modifiable (or preventable) risk factor in CaP, such as infection of the genitourinary tract, would be of great medical importance.

It has been suggested that CaP is associated with inflammation, the source of which may be prostatic infection and other mechanisms. Patients with a history of prostatitis were more likely to develop CaP according to a meta-analysis from 2002 [odds ratios (OR) 1.6; confidence interval (CI) 1.0–2.4] [5]. Nevertheless, a large population-based case-control study did not repeat this finding [6]. In summary, the roles inflammation and proliferative inflammatory atrophy have in the development of prostatic intra-epithelial neoplasia (PIN) and subsequent CaP is not yet clear. Further elaboration on this issue goes beyond the scope of this article but 2 excellent reviews are available [7,8].

We have conducted a systematic review of the literature from 1980 through December 2011 to summarize the current data of the potential relationship between CaP and genitourinary infections. This article discusses the potential link between several infections and CaP, and it presents the published evidence for each pathogen.

## 2. Materials and methods

To retrieve publications relevant for this review, we searched the Medline/PubMed database using a broad spectrum query "CaP AND infection" as of December 31, 2011. We limited the original number of 1,509 entries by including studies on humans written in English. We obtained 1,126 results, including 152 review articles. The selection was further reduced by excluding papers on CaP or infectious disease therapy, which resulted in 476 publications. Relevant studies were selected based on abstract review (Fig. 1). Study eligibility criteria were serologic case-control studies that evaluated antibodies and tissue-based studies that investigated the presence of various microorganisms in CaP tissue with or without a control group of healthy subjects or patients with benign disease. Case reports, case series, and studies based on self-reported medical histories were excluded to focus on evidence-based publications only. To ensure that no pertinent papers were omitted, we reran the search using the syntax "CaP AND xxx NOT therapy" where xxx was replaced with the following terms: HPV, human papillomavirus, CMV, cytomegalovirus, HSV, herpes simplex virus, EBV, Epstein-Barr virus, HHV-8, human herpesvirus, BKV, BK virus, JCV, JC virus, chlamydia, Myco-

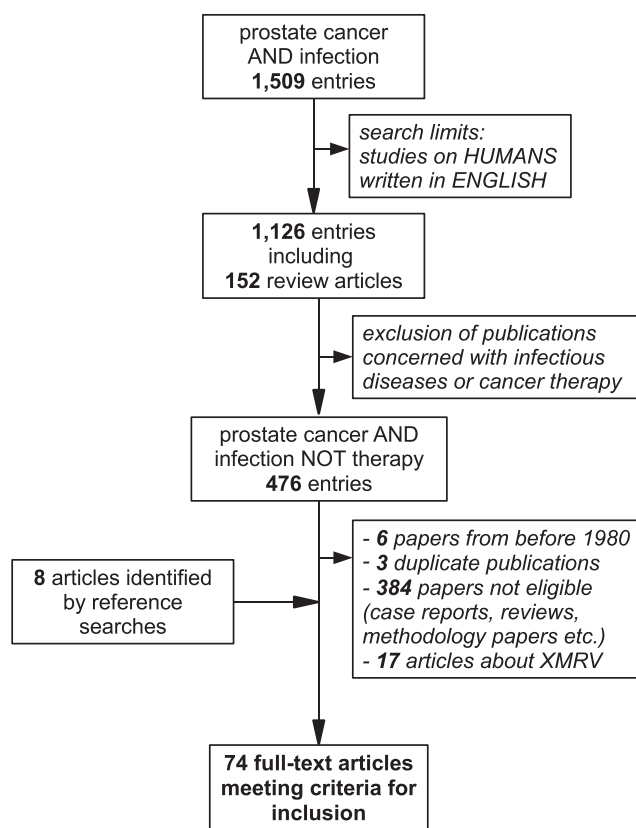


Fig. 1. Flow-diagram representing the selection of publications relevant for the review.

plasma, Ureaplasma, Trichomonas, trichomonosis, Neisseria, gonorrhea, Treponema, syphilis, P. acnes, Propionibacterium, XMRV, and xenotropic murine leukemia virus-related virus. When a relevant article was referenced, its content was verified and the article was included in the review if appropriate.

The following information was extracted from all the papers reviewed by author team members: author of the study; year of publication; scope of infectious agents investigated; number of cases (and controls if applicable) and the proportion of study subjects with a positive assay result; type of assay used and its characteristics; summary measures, such as odds ratios, 95% confidence intervals,  $\chi^2$  test results, etc.; and the details on tissue sample handling for tissue-based studies. When a statistical formulation of the results was missing, Fisher's exact test was used to compute the *P* value by one of the authors (J. Hr.) using statistical software Statistica, ver. 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK). When a controversy arose over a particular problem, the paper was studied and a consensus was reached collectively.

## 3. Results and discussion

The first person who suggested that CaP could be caused by an infectious agent was Ravich in the early 1950s [9].

Since then, a large number of studies have addressed the potential relationship between infection and CaP. These papers were mainly case-control studies with a retrospective design that was based on the self-reported history of sexually transmitted diseases (STDs) and the surrogates of prior risky sexual behavior and lifestyle practices. Before 1990, most studies suggested a link between STDs and CaP risk, but the marginal strength of association and other limitations made these studies inconclusive [10]. Indirect evidence that suggests an infectious cause of CaP has been reported, e.g., encounters with prostitutes or less frequent condom use. Self-reported histories of gonorrhea or syphilis were associated with a greater CaP risk [11]. According to a meta-analysis of the literature from 1966 to 2004 by Taylor et al., which comprised 6,022 unique CaP patients and 7,320 controls, a history of any STD was associated with a slightly increased CaP risk (OR 1.6; 95% CI 1.26–1.73) [12]. However, a recent large prospective study by Huang et al. did not find an association between CaP and a specific STD, but it found a borderline association with having had any STD vs. no STD [13]. The difficulties that are inherent to the self-reporting of medical history include poor recall; an unwillingness to report a stigmatized condition, such as an STD; a lack of awareness of subclinical infections and a lack of awareness of specific diagnoses, e.g., nongonococcal urethritis [14].

After the exclusion of 3 duplicate publications, a total of 74 selected full-text articles that were published between 1980 and 2011 on the potential role of infection in CaP carcinogenesis were systematically reviewed (Figs. 1 and 2). No studies from the pre-1980 period that used the data from self-reported questionnaires and patient interviews are listed. In addition, we omitted several laboratory-based studies from the 1970s that are summarized in Supplementary Data 1.

### 3.1. Human papillomavirus

HPV has been the most extensively investigated pathogen in studies to determine an infectious cause of CaP because it has been established as the main etiologic factor in cervical carcinoma and several other anogenital malignancies [15]. McNicol and Dodd were the first to detect HPV DNA in prostatic tissue using polymerase chain reaction (PCR) but they did not demonstrate a significant difference between CaP patients and a group of patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and healthy controls [16]. The promising yields of HPV detection and the ambivalent conclusion of the study encouraged other researchers to conduct more research. We have identified 28 tissue-based studies from 1980 to December 2011, 21 of which are case-control studies, whereas the remaining 7 papers only analyzed CaP samples.

The studies were not homogenous. The diversity of the respective study designs included the sample size (ranging from 17 subjects to over 300); definition of controls (BPH

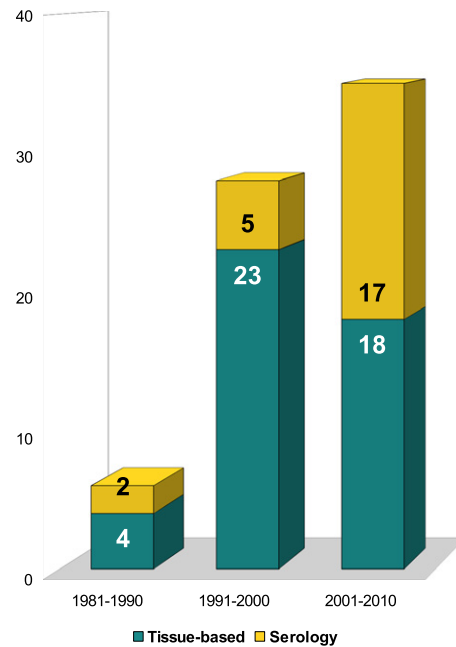


Fig. 2. Studies on prostate cancer and infection. The number of studies that investigated the potential link between prostate cancer and infection increased substantially over the past 2 decades. (Color version of figure is available online.)

or healthy subjects); scope of HPV types detected (usually 16 and 18, often many more); detection methods (mostly PCR); primers used (aiming at L1 or E6/E7 or other gene sequences); sample harvesting (open surgery vs. transurethral and transrectal approaches); and processing and storage conditions (formalin-fixed, paraffin-embedded [FFPE] vs. frozen samples). This makes every comparison or meta-analysis difficult. In a recent meta-analysis, higher detection of HPV 16 DNA was observed in CaP cases in a stratified analysis of HPV DNA-based studies only (OR 1.54; CI 1.07–2.20) after the exclusion of studies with zero detection of HPV in both cases and controls; no association between HPV infection and CaP was evident in the pooled OR for HPV 16 (OR 1.09; CI 0.97–1.23) and HPV 18 (OR 1.05; CI 0.89–1.24) [17].

Statistically significant differences between CaP patients and a control group have been demonstrated in 4 publications. In 1 of the early studies, HPV DNA of different HPV types was detected in the prostates of 28 out of 68 Japanese CaP patients, whereas all the BPH controls were HPV-free. The detection rate correlated with the disease stage and Gleason score [18]. A group in Germany used competitive quantitative PCR to detect HPV 16/E6 DNA sequences. One to 2 copies of viral DNA were detected in most of the benign and malignant frozen samples that were obtained via radical retropubic prostatectomy (RRP). Thus, some degree of positivity was observed in most of the samples. With a cut-off value of 300 copies, 21% of the CaP samples were HPV 16 positive ( $P = 0.02$ ) vs. 3% of the BPH controls [19]. A group in Argentina detected different HPV types in

42% of CaP transrectal biopsy samples, whereas all the BPH specimens were negative ( $P < 0.0001$ ) [20]. It is interesting to note that both studies employed surgical microdissection to maximize the number of tumor cells in the sample. In contrast, several other trials yielded null results using the microdissection technique [21–23]. CaP patients from Northwestern Mexico were 4 times more likely to harbor HPV DNA in their prostates than their BPH counterparts ( $P = 0.027$ ) [24]. Nevertheless, none of the remaining 24 studies from other countries demonstrated any differences in the presence of HPV DNA between CaP patients and noncancerous controls (Table 1).

The following potential limitations of laboratory studies that are based on the direct detection of pathogens in prostatic tissue have been formulated by Sutcliffe: (1) they are restricted to hypotheses that involve persistent prostatic infections; therefore, if a pathogen interacts with the tissue using a hit-and-run mechanism, it may not be detected at the time of analysis; (2) they are usually small in size; (3) they are prone to selection bias; (4) they do not allow for the assessment of temporal relationships between infection and cancer; (5) the results vary depending on the specific genetic sequences being investigated; (6) the results may vary depending on the amount and location of the tissue sampled, including the possibility of missing a focal infection; and (7) specimens may be contaminated during collection and processing [14]. For specific drawbacks of the PCR methodology in the detection of HPV, see Supplementary Data 2.

Thirteen studies have evaluated serum antibodies against different HPV types to determine whether there was a difference in the presence of specific antibodies between CaP patients and CaP-free controls. Anti-HPV 33 seropositivity was marginally associated with a higher CaP risk (OR 1.6; CI 1.0–2.7) in 1 study [25]. In another study, patients with CaP were more likely to harbor antibodies to HPV 18, which is associated with cervical adenocarcinoma (relative risk (RR) 2.6; CI 1.17–5.75) [26]. This finding was in contrast to a similarly sized study in which HPV 18 seropositivity was associated with a lower CaP risk (OR 0.23; CI 0.09–0.61) [27]. Although the study by Dillner et al. has a stronger nested design with subject matching, there were 11 seroepidemiologic studies that did not find any correlation between HPV infection and CaP risk (Table 2). A serologic study that investigated the possible impact of HPV infection on CaP biological behavior and prognosis failed to demonstrate any influence by the virus (and several other genitourinary pathogens) [28].

Serologic testing has the following limitations: (1) antibody cross-reactivity; (2) waning antibody levels over time and poorly documented “antibody lifetime” for certain pathogens; and (3) difficulties in establishing a temporal relationship between infection and cancer [14]. One specific drawback of large epidemiologic studies of CaP is (4) the definition of the control group. The latent existence of clinically unapparent lesions is an inherent characteristic of CaP. If controls are only defined as “cancer-free” or “CaP-

free,” men with subclinical undiagnosed lesions may be included in the control group, which would shift the statistics towards the null. Fortunately, recent large nested studies have minimized this possibility using regular digital rectal examination and prostate-specific antigen testing of the subjects [29].

### 3.2. Herpesviruses

#### 3.2.1. Cytomegalovirus

Among the known herpesviruses, several viruses have been investigated for potential involvement in CaP carcinogenesis. Human CMV is a sexually transmitted agent that persistently infects 60%–90% of the US population [30]. CMV has multiple oncogenic properties *in vitro*: it enhances mutagenesis, cell cycle progression, angiogenesis and cell invasion [31]. In contrast to other herpesviruses (Epstein-Barr virus [EBV], human herpesvirus 8 [HHV-8]), CMV has not been associated with any human malignancy. A total of 7 tissue-based and 2 serologic studies have focused on a possible link between CMV and CaP risk. Of the 7 papers, 4 studies allowed a comparison between CaP and nonmalignant tissue samples. None of the studies demonstrated a positive association between CMV and CaP risk, detecting 40% vs. 23% [32], 0% vs. 0% [33,34] and 0% vs. 8% [24] in CaP and control samples, respectively. Samanta investigated the presence of CMV in 20 CaP patients and 5 controls with PIN using immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization (ISH). CMV detection was 100% using either method or both [31]. Because PIN is a precursor lesion of CaP [7], patients with this condition cannot be considered true controls. In the remaining 2 studies, no control group was used and no CMV gene sequences were detected in CaP tissue specimens using PCR [35,36]. A large nested seroepidemiological study [13] and a smaller hospital-based case-control study [27] found no differences in the CMV seroprevalence rates between CaP patients and controls; however, men with BPH had slightly higher CMV serum antibody levels ( $P = 0.0004$ ) in the latter study. In conclusion, the use of different laboratory methods resulted in a low detection of CMV in CaP tissue (22 out of 478 individual patients) and the serologic findings do not support the potential involvement of CMV in CaP pathogenesis.

#### 3.2.2. Herpes simplex virus

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) causes orolabial infections and is usually acquired via nonsexual routes. HSV-2 is typically associated with anogenital infections and sexual transmission. Occasionally, both virus types can cause both kinds of infection. Two-thirds of the US population is infected with HSV-1, and 20% of individuals harbor antibodies against HSV-2 [37]. The interest of researchers in HSV peaked in the late 1970s and early 1980s when the virus was mistakenly associated with cervical cancer pathogenesis. In a small hospital-based study, Baker, et al found a signifi-

Table 1  
Tissue-based studies of the possible association between prostate cancer and infection from 1980 to 2011

Author	Year	Pathogen examined	No. of CaP cases	% positive	No. of controls	% positive	Statistics	Method: target sequence or PCR primer	Bp	Sample fixation	Source <sup>2</sup>
McNicol [76]	1991	HPV 16, 18	27	52% HPV16, 4% HPV18	56 BPH	63% HPV16, 5% HPV18	chi <sup>2</sup> NS	PCR: HPV16 E6	126	Frozen -70°C	TURP, open surgery
Masood [77]	1991	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35	20	0%	5 normal 20 BPH	20% HPV16 0%	NS	PCR: HPV18 E6 NR	160 -	FFPE	TURP, needle biopsy
Anwar [18]	1992	HPV 16, 18, 33	68	41% total: 16% HPV16, 25% HPV18, 7% HPV33	10 BPH and normal samples	0%	Fisher <sup>1</sup> p = 0.0115	NR	-	FFPE	TURP, autopsy
Effert [78]	1992	HPV 16, 18	30	0%	0	NA	NA	PCR: HPV16 E6 PCR: HPV18 E6	99 88	FFPE	Open surgery
Serfling [79]	1992	HPV 6, 11, 16, 18, 33	30 total CaP+benign	0%	0	NA	NA	PCR: HPV16 L1 PCR: HPV18 L1	451 454	Frozen -80°C	Surgery
Rotola [80]	1992	HPV 6/11, 16	8	75% HPV16, 50% HPV6/11	17 BPH	82% HPV16, 65% HPV6/11	Fisher test NS	PCR: HPV6/11 E6 PCR: HPV16 E6 ORF	120 323	Frozen -70°C	NR
Ibrahim [81]	1992	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45	17 23	18% HPV16 13% HPV16	12 BPH 17 normal	0% 12% HPV16	NS p = 0.343	PCR: L1	450	FFPE Frozen, gelatin embedded -70°C	Open surgery, TURP, biopsy
Dodd [82]	1993	HPV 16	7	43%	10 BPH	50%	Fisher test NS	PCR: HPV 16 E7 PCR: HPV 16 E6	321 204	Fresh	Open surgery
Sarkar [83]	1993	HPV 6b/11, 16, 18	23	13% HPV16	0	NA	NA	PCR: HPV 6b/11 E6-E7 PCR: HPV 16 E6-E7 PCR: HPV 18 E6-E7	157 98 80	FFPE	Open surgery
Tu [84]	1994	HPV 16, 18	43 prostates 17 lymph nodes	2% HPV16 5% HPV18	1 normal	0%	NA	PCR: L1	450	FFPE frozen -80°C	Open surgery
Moyret-Lalle [85]	1995	HPV 16, 18	17	53% HPV16	22 BPH	32% HPV16	NS	PCR: HPV16 E6 H16L1, H16R3 PCR: HPV18 E6 H18L1, H18R4	NR NR	Frozen	Open surgery
Suzuki [86]	1996	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52, 58	51 prostates 22 soft tissue metastases	16% HPV16 0%	51 non-cancerous tissues including prostate	0%	NA	PCR: L1 consensus primer	NR	Frozen -80°C	Open surgery, autopsy
Wideroff [87]	1996	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45	56	13%	42 BPH	10%	chi <sup>2</sup> NS; OR 1.66, CI 0.33-8.37	PCR: L1 PCR: E6	450 240-250	FFPE	Open surgery, biopsy (cancer); TURP (controls)
Anderson [88]	1997	HPV 16	14	0% HPV16, 71% E1	10 BPH	0% HPV16, 50% E1	NS	PCR: E1 general HPV primer PCR: HPV 16 E2 PCR: HPV16 E6	400 NR 353 bp	Frozen -70°C	TURP
Noda [89]	1998	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58	38	0%	71 BPH	4% HPV 16	chi <sup>2</sup> NS	PCR: E7	238	FFPE	Open surgery (cancer); TURP, open surgery (BPH)
Strickler [90]	1998	HPV 11, 16, 18, 51, 56	63	0%	61 BPH	0%	NS	PCR: MY09/MY11 PCR: GP5+/GP6+ PCR-WD66, 67, 154/WD 72, 76 of E6	450 150 240	Frozen -80°C	TURP, open surgery, biopsy
Saad [91]	1999	HPV 16, 18, 31	40	0%	0	NA	NA	PCR: MY09/MY11	450	Fresh	Open surgery
Serth [19]	1999	HPV 16	47	21%	37 BPH	3%	Fisher p = 0.02	PCR: HPV 16 E6	95	Frozen -80°C	Open surgery
Zambrano [23]	2002	HPV 16, 18, 33, 58	8	50% any HPV	11 noncancerous	36%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: MY09/MY11 PCR: GP5+/GP6+	450 150	Frozen -70°C	Open surgery
Leskinen [35]	2003	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58	20	0%	0	NA	NA	PCR: MY09/MY11	450	Frozen -70°C	Open surgery
Carozzi [92]	2004	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58	26	65%	25 BPH	48%	chi <sup>2</sup> NS	PCR: MY09/MY11 PCR: Pu 1M PCR: Pu 2R	450 450 233-268	10% formalin solution	Biopsy

Table 1  
Continued

Author	Year	Pathogen examined	No. of CaP cases	% positive	No. of controls	% positive	Statistics	Method: target sequence or PCR primer	Bp	Sample fixation	Source <sup>2</sup>
Leiros [20]	2005	HPV 6, 11, 16, 18	41	42%	30 BPH	0%	Fisher test p < 0.0001	PCR: type-specific L1 and E5 primers for HPV 6, 11, 16, 18	NR	FFPE	Biopsy
Bergh [34]	2006	HPV	171	0%	181 BPH	0%	NS	PCR: MY09/MY11	450	FFPE	TURP
Balis [93]	2007	HPV 11, 16, 18, 33	42	5%	0	NA	NA	PCR: GP5+/GP6+	150	FFPE and frozen	Surgery
Sfanos [36]	2007	HPV	200	0%	0	NA	NA	PCR: GP5+/GP6+	146	Frozen -80°C	Open surgery
Gazzaz [94]	2008	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59	6	0%	50 BPH	0%	NS	chemiluminiscent detection of viral DNA by Hybrid Capture 2	NR	Frozen -20°C	TURP, biopsy
Silvestre [95]	2009	HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 54, 55, 58, 59, 61, 62, 64, 66-73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP6108	65	3% HPV16, HPV84	6 BPH	0%	NS	PCR: PGMY09/11	450	NR	Open surgery (cancer); TURP (BPH)
Martinez-Fierro [24]	2010	HPV 16, 18, 33, 44, 45, 52, 58, 66, 68, 81, 83, CP6108	55	20% HPV different types	75 CaP-free tissue	5%	p = 0.027; OR 3.98, CI 1.17-13.56	PCR: MY09/MY11 PCR: GP5+/GP6+	450 150	NR	TURP, biopsy
Aghakhani [96]	2011	HPV 6, 11, 16, 18	104	13%	104 BPH	8%	NS	PCR: MY09/MY11 PCR: GP5+/GP6+	450 150	FFPE	Open surgery, TURP
Boldogh [32]	1983	CMV	10	40%	22 BPH and normal prostates	23%	Fisher <sup>1</sup> NS	ISH and IF: viral nucleic acids and proteins	-	Fresh and frozen	Surgery
Eizuru [33]	1983	CMV	5	0%	12 BPH and normal prostates	0%	NS	ISH: viral RNA	-	Frozen	NR
Leskinen [35]	2003	CMV	20	0%	0	-	NA	PCR: major immediate early gene	NR	frozen -70°C	Open surgery
Samanta [31]	2003	CMV	17	100%	5 PIN	100%	NS	IHC: mAb IE1, pp65; ISH: 21 bp CMV early gene RNA	-	FFPE	NR
Bergh [34]	2007	HSV	171	0%	181 BPH	0%	NS	nested PCR	NR	FFPE	TURP
Sfanos [36]	2007	CMV	200	0.5%	0	-	NA	PCR: pp65	188	Frozen -80°C	Open surgery
Martinez-Fierro [24]	2010	CMV	55	0%	75 BPH	8%	Fisher <sup>1</sup> p = 0.0386*	PCR: UL3 gene	420/188	NR	TURP, biopsy
Baker [97]	1981	HSV 2	50	8%	159 BPH	4%	Fisher <sup>1</sup> NS	Indirect IF	-	Fresh frozen -70°C	TURP
Boldogh [32]	1983	HSV 2	10	20%	22 BPH and ISH and normal prostates	5%	Fisher <sup>1</sup> NS	ISH and IF: viral nucleic acids and proteins	-	Fresh and frozen	Surgery
Eizuru [33]	1983	HSV	5	0%	12 BPH and normal prostates	0%	NS	ISH: viral RNA	-	Frozen	NR
Haid [98]	1984	HSV 2	27	26%	33 BPH	24%	chi <sup>2</sup> NS	IF	-	FFPE	Surgery, autopsy
Leskinen [35]	2003	HSV 1, 2	20	0%	0	-	NA	PCR: glycoprotein D gene	NR	Frozen -70°C	Open surgery
Bergh [34]	2007	HSV 1, 2	171	0%	181 BPH	0%	NS	nested PCR	NR	FFPE	TURP
Monini [41]	1996	HHV 8	8	25%	8 BPH	63%	Fisher <sup>1</sup> NS	Nested PCR: KS1, KS2	NR	NR	Biopsy
Tasaka [99]	1997	HHV 8	32	0%	20 BPH	0%	NS	nested PCR	160	FFPE and frozen	NR
Lebbé [100]	1997	HHV 8	6	0%	16 BPH + normal	0%	NS	nested PCR: ORF 26 gene	233	NR	NR
Rubin [42]	1998	HHV 8	45	0%	0	-	NA	PCR: thymidin kinase, and major capsid protein regions	NR	Frozen	Open surgery
Grinstein [48]	2002	EBV	19	37%	10 normal	0%	Fisher <sup>1</sup> NS	IHC: mAb 2B4 to EBNA-1	-	FFPE	NR
Bergh [34]	2007	EBV	159	9%	159 BPH	9%	NS	Nested PCR	NR	FFPE	TURP

Table 1  
Continued

Author	Year	Pathogen examined	No. of CaP cases	% positive	No. of controls	% positive	Statistics	Method: target sequence or PCR primer	Bp	Sample fixation	Source <sup>2</sup>
Sfanos [36]	2007	EBV	200	8%	0	–	NA	PCR: EBER	106	Frozen –80°C	Open surgery
Monini [51]	1995	BKV	7	57%	19 BPH	58%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: BKV TAG gene, primers BKRRLT1, BKRRLT4 + nested PCR: BKNCR2b, BKRRLT5]	181	NR	Surgery
Zambrano [23]	2002	BKV	8	25%	11 normal	9%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: BKV large-T antigen sequences	353	Frozen	Open surgery
Das [52]	2004	BKV	21	43–71%	0	–	NA	PCR: early region; PCR: BKRRLT1 and BKRRLT6; ISH: digoxigenin labeled probe BKV2; IHC: mAb PAb416 anti-TAG	577/452; 379	FFPE	Open surgery
Balis [93]	2007	BKV	42	19%	0	–	NA	PCR: VP1 gene; IF: mAb antiTAG	95	FFPE and fresh frozen	Surgery
Bergh [34]	2007	BKV	171	0%	181 BPH	0%	NS	nested PCR	192/114	FFPE	TURP
Lau [101]	2007	BKV	30	7%	30 normal	13%	Fisher <sup>1</sup> NS	ISH: mAb PAb416 to TAG; IHC: DIG-labeled 45 bp probe to early region	–	FFPE	Open surgery
Sfanos [36]	2007	BKV	200	0.5%	0	–	NA	PCR	577	Frozen –80°C	Open surgery
Das [53]	2008	BKV	14	79%	15 normal	27%	Fisher p = 0.007	ISH: DIG-labeled probe 45 bp	–	FFPE	Open surgery, autopsy
Russo [54]	2008	BKV	28 26	46% 77 % by IHC 85% by qPCR	29 normal 12 BPH	14% 0% by IHC 0% by qPCR	Fisher p = 0.008 Fisher <sup>1</sup> p = 0.0001	IHC: mAb PAb416 anti-TAG IHC: mAb PAb416 anti-TAG; qPCR: large TAG gene sequences	– NR	FFPE FFPE and fresh	Open surgery, autopsy Open surgery (CaP) controls NR
Martinez-Fierro [24]	2010	BKV	55	0%	75 BPH	0%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: BKV TAG	355	NR	TURP, biopsy
Akgül [103]	2011	BKV	85	1%	0	–	NA	quantitative PCR	NR	FFPE	Open surgery
Monini [102]	1996	JCV	7	0%	19 BPH	21%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: JCV TAG and regulatory region sequences	178	NR	Surgery
Zambrano [23]	2002	JCV	8	38%	11 normal	36%	NS	PCR: JCV large-T antigen sequences; ISH: TAG	189	Frozen	Open surgery
Balis [93]	2007	JCV	42	0%	0	–	NA	PCR: VP1 gene	95	FFPE and frozen	Surgery
Bergh [34]	2007	JCV	159	2%	159 BPH	4%	Fisher <sup>1</sup> NS	nested PCR	259/167	FFPE	TURP
Martinez-Fierro [24]	2010	JCV	55	0%	75 BPH	0%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: JCV TAG	189	NR	TURP, biopsy
Sfanos [36]	2007	C. trachomatis	200	0.5%	0	–	NA	PCR: MOMP	144	Frozen –80°C	Open surgery
Sfanos [36]	2007	T. vaginalis	200	0%	0	–	NA	PCR: BTUB9	112	Frozen –80°C	Open surgery
Barykova [64]	2011	M. hominis	58	25%	27 healthy prostates	0%	chi <sup>2</sup> p = 0.0073	PCR: 16S RNA; RNA qRT-PCR: 16S RNA	NR	Fresh and frozen	Biopsy
Alexeyev [66]	2006	P. acnes	159	8%	159 BPH	4%	Fisher <sup>1</sup> NS	PCR: 16S RNA	310	FFPE	TURP
Sfanos [36]	2007	P. acnes	200	4%	0	–	NA	PCR	587	Frozen –80°C	Open surgery
Fassi Fehri [68]	2011	P. acnes	59	78%	29 BPH and normal	10%	Fisher <sup>1</sup> p < 0.0001	ISIF	–	NR	Laparoscopic radical prostatectomy
Bergh [34]	2007	C. albicans	115	0%	115 BPH	2%	Fisher <sup>1</sup> NS	nested PCR	82	FFPE	TURP

HPV = human papillomavirus; CMV = cytomegalovirus; HSV = herpes simplex virus; HHV = human herpesvirus; EBV = Epstein-Barr virus, BKV = BK virus; JCV = JC virus; CaP = prostate cancer; BPH = benign prostatic hyperplasia; PCR = polymerase chain reaction; ISH = in situ hybridization; IHC = immunohistochemistry; mAb = monoclonal antibody; IF = immunofluorescence; ISIF = in situ immunofluorescence; FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded; Bp = base pairs (length of PCR product); TURP = transurethral resection of the prostate; NA = not applicable; NS = not significant; NR = not reported.

<sup>1</sup>Statistics (Fisher's exact test) were computed by J. Hr. using Statistica, ver. 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK).

<sup>2</sup>Biopsies were usually performed via the transrectal approach. Where "surgery" is left unspecified, it was not possible to imply from the text whether an open or endoscopic procedure had been used. "Open surgery" stands for either radical retropubic prostatectomy or open simple prostatectomy.

\* Inverse association.

Table 2  
Serologic studies of the possible association between prostate cancer and infection from 1980 to 2011

Author	Year	Pathogen studied	No. of subjects with CaP	% positive	No. of CaP-free controls	% positive	RR/OR/HR	95% CI	Evidence of association	Study type <sup>1</sup>	Method	
Dillner [26]	1998	HPV 16	165	4.0	290	2.0	RR 2.4	0.75–7.58	no	n, m, p	ELISA	
		HPV 18	165	10.0	290	4.0	RR 2.6	1.17–5.75	yes		ELISA	
		HPV 33	164	4.0	289	6.0	RR 0.7	0.26–1.66	no		ELISA	
Strickler [90]	1998	HPV 16	63	1.6	144	4.9	NR	NR	no	h, (m)	ELISA	
Hayes [11]	2000	HPV 16	276	6.9	295	5.1	OR 1.4	0.7–2.8	no	p	ELISA	
Hisada [104]	2000	HPV 16	48	42.0	63	30.0	OR 2.7	0.9–7.9	no	n, m, p	ELISA	
Adami [25]	2003	HPV 16	238	13.0	210	15.0	OR 0.7	0.4–1.3	no	p, m	ELISA	
		HPV 18	238	12.0	210	12.0	OR 0.9	0.5–1.9	no		ELISA	
		HPV 33	238	29.0	210	23.0	OR 1.6	1.0–2.7	yes		ELISA	
Rosenblatt [105]	2003	HPV 16	642	9.2	570	8.8	OR 1.06	0.71–1.57	no	p, m	ELISA	
		HPV 18	642	3.4	570	2.5	OR 1.36	0.69–2.69	no		ELISA	
		HPV 33	642	3.4	570	2.5	OR 1.06	0.71–1.57	no		ELISA	
Korodi [106]	2005	HPV 16	799	6.0	2596	6.0	OR 0.9	0.64–1.26	no	n, m, p	ELISA	
		HPV 18	799	3.0	2595	4.0	OR 0.79	0.49–1.26	no		ELISA	
		HPV 33	800	9.0	2596	7.0	OR 0.99	0.72–1.38	no		ELISA	
Sitas [107]	2007	HPV 16	205	68.0	673	58.0	OR 1.33	0.86–2.07	no	h, m	ELISA	
Sutcliffe [108]	2007	HPV 16	691	7.5	691	8.8	OR 0.83	0.57–1.23	no	n, m, p	ELISA	
		HPV 18	691	6.1	691	5.8	OR 1.04	0.66–1.64	no		ELISA	
		HPV 33	691	7.2	691	6.4	OR 1.14	0.76–1.72	no		ELISA	
Huang <sup>a</sup> [13]	2008	HPV 16	765	10.1	915	10.6	OR 0.9	0.7–1.3	no	n, m, p	ELISA	
		HPV 18	103	48.5	367	47.5	OR 1.0	0.7–1.6	no		ELISA	
		HPV 33	103	9.4	367	8.1	OR 1.2	0.8–1.7	no		n, m, p	ELISA
Dennis [39]	2009	HPV 16/18	267	18.7	267	16.9	OR 1.13	0.73–1.75	no	n, m	ELISA	
Sutcliffe [109]	2010	HPV 16	616	14.5	616	13.7	OR 1.07	0.77–1.48	no	n, m, p	ELISA	
		HPV 18	616	3.3	616	3.7	OR 0.87	0.47–1.63	no		ELISA	
		HPV 31	616	12.3	616	10.8	OR 1.15	0.8–1.64	no		ELISA	
Hrbacek [27]	2011	HPV 6	329	24.1	105	20.8	OR 1.21	0.71–2.12	no	h	ELISA	
		HPV 11	329	12.5	105	14.9	OR 0.82	0.44–1.60	no		ELISA	
		HPV 16	329	5.0	105	9.9	OR 0.48	0.21–1.13	no		ELISA	
		HPV 18	329	2.5	105	9.9	OR 0.23	0.09–0.61	yes*		ELISA	
		HPV 31	329	5.9	105	7.9	OR 0.73	0.32–1.83	no		ELISA	
		HPV 33	329	2.2	105	5.0	OR 0.43	0.13–1.48	no		ELISA	
Mandel <sup>b</sup> [110]	1987	CMV	250	NR	226	NR	OR 1.33	0.56–3.16	no	h, m	NR	
		CMV	240	NR	240	NR	OR 1.14	0.41–3.15	no		NR	
Huang <sup>a</sup> [13]	2008	CMV	765	70.3	915	68.4	OR 1.1	0.9–1.3	no	n, m, p	ELISA	
		CMV	103	87.4	367	89.4	OR 0.9	0.4–1.7	no		ELISA	
Hrbacek [27]	2011	CMV	329	80.2	105	86.7	OR 0.62	0.32–1.14	no	h	ELISA	
Baker [38]	1981	HSV 2	50	68.0	159	51.0	NR	NR	p<0.05	h	Indirect hemagglutination inhibition test	
Mandel <sup>b</sup> [110]	1987	HSV 2	250	NR	226	NR	OR 0.27	0.08–0.98	yes*	h, m	NR	
		HSV 2	240	NR	240	NR	OR 0.46	0.18–1.21	no		NR	
Korodi [106]	2005	HSV 2	163	7.2	288	7.5	OR 0.93	0.44–1.96	no	n, m, p	ELISA	
Huang <sup>a</sup> [13]	2008	HSV 2	765	9.2	915	9.7	OR 0.9	0.7–1.3	no	n, m, p	Enzymatic immunodot assay	
		HSV 2	103	53.4	367	49.1	OR 1.3	0.8–2.0	no		ELISA	
Dennis [39]	2009	HSV 2	267	28.5	267	20.6	OR 1.6	1.05–2.44	yes	n, m	ELISA	
Hrbacek [27]	2011	HSV 1	329	95.1	105	94.3	OR 1.19	0.42–2.97	no	h	ELISA	
		HSV 2	329	12.8	105	13.3	OR 0.95	0.51–1.88	no		ELISA	
		HSV 8	329	12.8	105	13.3	OR 0.95	0.51–1.88	no		ELISA	
Sitas [107]	1999	HHV 8	202	33.0	309	20.0	NR	NR	no	p	indirect IF	
Hoffman <sup>c</sup> [46]	2004	HHV 8	100	20.0	177	5.1	OR 4.67	1.91–11.65	yes	h	indirect IF + ELISA	
		HHV 8	138	39.9	140	22.9	OR 2.24	1.29–3.90	yes		p, m	Indirect IF + ELISA
		HHV 8	163	3.7	288	4.9	OR 0.74	0.23–2.12	no		n, m, p	ELISA
Korodi [106]	2005	HHV 8	10	20.0	34	23.5	OR 0.81	0.17–4.21	no	h	ELISA, IF	
		HHV 8	41	7.3	98	19.4	OR 0.33	0.10–1.11	no		h	
		HHV 8	199	2.5	155	3.9	OR 0.64	0.20–2.02	no		p	
Sutcliffe [108]	2007	HHV 8	691	13.5	691	18.0	OR 0.70	0.52–0.95	yes*	n, m, p	IF	
Huang <sup>a</sup> [13]	2008	HHV 8	765	13.5	915	11.3	OR 1.3	0.9–1.7	no	n, m, p	ELISA	
		HHV 8	103	1.9	367	6.0	OR 0.3	0.1–1.4	no		ELISA	
McDonald [112]	2011	HHV 8	96	17.7	415	11.1	HR 0.88	0.46–1.69	no	p	Indirect IF	
Mandel <sup>b</sup> [110]	1987	EBV	250	NR	226	NR	OR 0.50	0.13–2.00	no	h, m	NR	
		EBV	240	NR	240	NR	OR 0.86	0.29–2.55	no		NR	
González [49]	2006	HSV 1, HSV 2, VZV, EBV, CMV, HHV 6	66	NR	66	NR	NR	NR	no	h, m	ELISA	
Newton [55]	2005	BKV	31	94.0	45	91.0	OR 0.9	0.6–1.2	no	n, m, p	ELISA	
Dillner [26]	1998	C. trachomatis	165	10.9	290	10.7	RR 1.04	0.54–2.00	no	n, m, p	Microimmunofluorescence	
Antilla [57]	2005	C. trachomatis	738	7.5	2271	10.5	OR 0.69	0.51–0.94	yes*	p, m	Microimmunofluorescence	
Sutcliffe [108]	2007	C. trachomatis	691	4.0	691	3.5	OR 1.13	0.65–1.96	no	n, m, p	ELISA	
		C. trachomatis	765	11.2	915	9.7	OR 1.2	0.9–1.6	no		n, m	ELISA
Huang <sup>a</sup> [13]	2008	C. trachomatis	103	35.9	367	35.7	OR 1.1	0.7–1.7	no	n, m	ELISA	
		C. trachomatis	267	14.6	267	11.6	OR 1.35	0.79–2.31	no		n, m	Microimmunofluorescence
Dennis [39]	2009	C. trachomatis	267	14.6	267	11.6	OR 1.35	0.79–2.31	no	n, m	Microimmunofluorescence	
Hrbacek [27]	2011	C. trachomatis	329	5.5	105	11.4	OR 0.45	0.21–0.99	yes*	h	ELISA	
Sutcliffe [60]	2006	T. vaginalis	691	12.6	691	9.4	OR 1.43	1.00–2.03	no	n, m, p	ELISA	
Sutcliffe [29]	2009	T. vaginalis	616	21.5	616	24.8	OR 0.83	0.63–1.09	no	n, m, p	ELISA	
Stark [113]	2009	T. vaginalis	673	24.5	673	21.4	OR 1.23	0.94–1.61	no	n, m, p	ELISA	
Hrbacek [27]	2011	M. hominis	329	18.2	105	14.3	OR 1.34	0.74–2.55	no	h	Indirect IF	
Hrbacek [27]	2011	U. urealyticum	329	19.5	105	10.5	OR 2.06	1.08–4.28	yes	h	Indirect IF	
Barykova [64]	2011	M. hominis	37	44.8	52	19.0	NR	NR	p=0.03	h	ELISA	
Urbanek [63]	2011	M. hyorhinis	105	52.0	114	36.0	NR	NR	p=0.014	h, m	Indirect ELISA	
Hayes [11]	2000	T. pallidum	276	N/A	295	N/A	OR 1.8	1.0–3.5	yes	p	Microhemagglutination assay (MHA-TP)	

Table 2  
Continued

Author	Year	Pathogen studied	No. of subjects with CaP	% positive	No. of CaP-free controls	% positive	RR/OR	95% CI	Evidence of association	Study type <sup>1</sup>	Method
Hrbacek [27]	2011	T. pallidum	329	0.3	105	0.0	NA	NA	no	h	ELISA
Hrbacek [27]	2011	N. gonorrhoeae	329	6.1	105	5.7	OR 1.07	0.44–2.99	no	h	Complement fixation test
Severi [69]	2010	P. acnes	809	50.3	584	56.8	OR 0.73	0.58–0.91	yes*	n, m, p	ELISA

HPV = human papillomavirus; CMV = cytomegalovirus; HSV = herpes simplex virus; HHV = human herpesvirus; EBV = Epstein-Barr virus; VZV = varicella-zoster virus; BKV = BK virus; CaP = prostate cancer; BPH = benign prostatic hyperplasia; RR = relative risk; OR = odds ratio; HR = hazard ratio; CI = 95% confidence interval; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IF = immunofluorescence; NA = not applicable; NR = not reported.

\* Inverse association.

<sup>1</sup> Case-control study specification: p-population based, h-hospital based, n-nested, and m-matched.

<sup>a</sup> Black patients listed separately in the original paper.

<sup>b</sup> Two types of controls were used in the original study: hospital controls and neighborhood controls.

<sup>c</sup> Two patient cohorts were investigated: one from the USA and one from Tobago.

<sup>d</sup> Three differently assembled cohorts were assessed by 3 different laboratory assays (only the K8.1 ELISA results are shown here): no result reached statistical significance.

cantly higher HSV-2 seroprevalence (68% vs. 51%,  $P < 0.05$ ) in CaP patients than in men with BPH. However, the prevalence of HSV-2 in tissue as detected by indirect immunofluorescence was much lower: 8% and 4.4% in CaP cases and controls, respectively [38]. Two small-sized in situ hybridization studies from 1983 yielded contradictory results [32,33] and a recent study in Finland failed to detect any HSV-1 or -2 sequences using PCR on frozen CaP samples [35]. No HSV gene sequences were detected by Bergh in 352 CaP and BPH patient samples using nested PCR [34]. In a study conducted among USA military personnel, HSV-2 seropositivity was associated with a moderately increased CaP risk (OR 1.6; CI 1.05–2.44) [39]. Three other seroepidemiological studies failed to demonstrate any association between HSV infection and CaP [13,27,40].

### 3.2.3. Human herpes virus type 8

The long-established association between HHV-8 and Kaposi's sarcoma and the detection of HHV-8 in prostate tissue by Monini [41] prompted other groups to investigate the potential role of HHV-8 in prostate carcinogenesis. However, studies on healthy individuals failed to detect HHV-8 in both cancerous and benign prostate samples (Table 2); assay sensitivity could have caused the disparity [42]. Conversely, HHV-8 was detected in the noncancerous prostates of 5 men with Kaposi's sarcoma, all of whom were seropositive for HHV-8 [43]. This finding was not an isolated observation [44]. Infected infiltrating lymphocytes may have accounted for the PCR-positive signal in the prostate tissue [45]. A middle-sized serologic study suggested that HHV-8 seropositivity was associated with a higher CaP risk ( $P = 0.003$  for a Trinidad and Tobago cohort and  $P < 0.0001$  for a US cohort), but the results in the U.S. cohort lost statistical significance when patients with various cancers were used as controls instead of healthy blood donors, which is a highly selected group that does not represent the general population [46]. All the other research groups failed to detect a positive association. In a large study by Sutcliffe, subjects with CaP were even

less likely to have HHV-8 antibodies (OR 0.7; CI 0.52–0.95) [47].

### 3.2.4. Epstein-Barr virus

Grinstein was the first to detect EBV, the etiologic agent of Burkitt's lymphoma and lymphoepithelioma-like carcinomas, in CaP cells using IHC [48]. Significantly smaller detection rates were reported by Sfanos [36] and Bergh who did not find a difference between BPH patients and those who developed CaP in a retrospective study [34]. No significant differences in antibody levels to various herpesviruses, including EBV, were observed in a hospital-based case-control study of 66-CaP patients and matched controls with other cancers and cardiovascular diseases [49].

### 3.3. Polyomaviruses

The oncological potential of the human polyomaviruses BK (BKV) and JC (JCV) is still debatable. Most of the infected individuals acquire the virus in early childhood. Primary infection is usually unapparent. During viremia, the virus spreads into various organs, and the urinary tract is the principal site of latency. Reactivation may occur upon immunosuppression, which leads to hemorrhagic cystitis (BKV) or rare progressive multifocal leukoencephalopathy (JCV) [23]. In animal cell models, the viruses exhibit oncogenic properties via the large T antigen (TA<sub>g</sub>) which can bind and block the p53 and pRb tumor suppressor proteins [50]. Because of the long-term latency, genitourinary tropism and potential oncogenicity that are associated with these viruses, several papers have investigated their possible link to CaP. Monini et al. detected the presence of BKV in approximately 60% of cancerous and healthy prostates [51], whereas Das and Russo found similar detection rates in CaP cases but a significantly lower prevalence in controls [52–54]. Interestingly, BKV TA<sub>g</sub> expression was detected in PIA lesions but not in the normal epithelium [52,53]. The only serologic study of BKV in CaP patients that was published to date did not find a difference in BKV sero-

prevalence between CaP patients and their matched controls [55].

### 3.4. *Chlamydia trachomatis*

Genital *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) infections belong to the most common STDs. Up to 50% of infected men do not experience any symptoms; however, the bacteria is capable of eliciting and maintaining chronic inflammation and persistent infection [56]. Interestingly, serologic investigations failed to demonstrate an association between chlamydial seropositivity and CaP risk. In addition, 2 studies, including a large population-based study with more than 3,000 subjects, concluded that men with CaP were less likely to have circulating chlamydial antibodies (OR 0.69; CI 0.51–0.94) [57]. One tissue-oriented study detected the chlamydial major outer membrane protein (MOMP) gene sequence in 1 out of 200 subjects with CaP [36]. Corradi et al. assessed the presence of *C. trachomatis* in 64 BPH samples and reported a 14% prevalence rate [58]. No CaP subjects were included in the analysis; therefore, comparisons were not possible.

### 3.5. *Trichomonas vaginalis*

Another STD whose significance should not be underestimated is the protozoan infection caused by *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*). A total of 174 million new cases occur each year worldwide (compared with 92 million caused by *C. trachomatis*), such as urethritis, epididymitis, and prostatitis in men, which manifest as vaginal discharge in women [59]. Out of 4 studies that addressed trichomonosis and CaP, only 1 study demonstrated a greater CaP risk in seropositive men than in controls (OR 1.43; CI 1.00–2.03) [60]. No subsequent studies confirmed the finding and a 0% detection rate of *Trichomonas* was found in 200 frozen radical prostatectomy specimens using PCR [36].

### 3.6. *Mycoplasma and ureaplasma*

Although mycoplasma does not belong to the “classical” STDs, these bacteria have become an object of increased scientific interest over the last few years. The mycoplasma p37 protein has been demonstrated to increase the invasive potential of the CaP cell lines CaP-3 and DU-145 in a dose-dependent manner, whereas treatment with monoclonal antibodies against p37 neutralized the effect [61]. The BPH-1 benign prostate cell line underwent karyotypical changes that led to a malignant transformation upon infection by *M. hyorhinitis* and *M. genitalium* [62]. Inoculation of infected cells in male nude mice initiated tumor growth [62]. Only recently, 3 hospital-based serologic case-control studies have explored the relationship between mycoplasma and CaP risk. Antibodies against the *M. hyorhinitis* p37 protein and *Ureaplasma urealyticum* were found to be associated with a higher CaP risk [27,63]. Barykova et al.

detected mycoplasma 16S rRNA in 25% and 55% of CaP patients using PCR and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), respectively, whereas all the controls were devoid of mycoplasma according to both methods. The difference in the mycoplasma antibody seroprevalence between 37-CaP cases and 52 BPH controls was statistically significant ( $P = 0.03$ ). Moreover, the mycoplasma DNA concentration in the samples using qRT-PCR increased in the sequence BPH → high-grade PIN → CaP, and the correlation between serology and the PCR results was 75% [64]. Whether these findings were due to chance or reflect a real association between mycoplasma infections and (not necessarily malignant) prostate disease needs to be clarified, including the possible synergistic effect of low virulence viruses and mycoplasma that has been proposed by some authors [62].

### 3.7. Other bacterial microorganisms

The prostate has been reported to harbor a wide variety of microorganisms as evidenced by the presence of bacterial 16S rDNA (ribosomal) [23,65]. The failure to subsequently identify specific infectious agents or the presence of rare microorganisms can be explained by clinical or laboratory contamination of samples or by residual DNA from phagocytized bacteria in macrophages [36]. Alexeyev detected 16S rDNA sequences in 27% of prostatic tissue specimens using PCR, and most of the sequences belonged to *Propionibacterium acnes*. *P. acnes* prevalence was not significantly different in patients who developed CaP compared with BPH controls in this retrospective study (OR 2.17; CI 0.77–6.95) [66]. The intracellular location of the bacteria suggested infection rather than prostatic ducts colonization [67]. Sfanos reported a similar low *P. acnes* detection rate in CaP samples (4% in 200 individuals) [36]. A higher *P. acnes* detection rate was reported in CaP tissue samples than in normal and BPH specimens in a recent study in Germany [68]. The authors did not report the total number of patients, which makes the assessment of the clinical significance of the findings difficult. In an in vitro study, *P. acnes* infection of the RWPE1 benign prostate cell line led to the overexpression of genes that regulated cellular growth and proliferation, which included genes involved in cancer [68]. In the only serologic study to date on *P. acnes* infection and CaP risk, men without CaP were more likely to be *P. acnes*-seropositive than CaP patients. The authors speculated on a protective antitumor effect of the increased cell-mediated (Th-1) immunity that was induced by *P. acnes* infection [69].

### 3.8. *Xenotropic murine leukemia virus-related virus*

In 2006, a novel  $\gamma$ -retrovirus was described in CaP tissue samples mainly from patients that were homozygous for a reduced-activity variant (R462Q) of the ribonuclease L gene [70]. RNaseL is a nuclease involved in innate immunity that controls viral pathogens. Upon its activation via the 2-5 A

Table 3  
Studies on xenotropic murine leukemia virus-related virus

Author	Year	CaP cases	% positive	Controls	% positive	Method
Urisman [70]	2006	86	10.5	0	0	PCR
Sfanos [36]	2007	200	0	0	0	PCR
Fischer [114]	2008	105	1	70	1.4	PCR
Hohn [115]	2009	589	0	5	0	PCR/ELISA
Schlaberg [116]	2009	233	6.2	101	2	PCR
			23		4	IHC
Aloia [117]	2010	596	0	452	0	IHC
		161	0	0	0	PCR
Arnold [118]	2010	40	27.5	0	0	serology
Danielson [119]	2010	144	22	0	0	PCR
Martinez-Fierro [24]	2010	55	0	75	0	PCR
Akgül [103]	2011	85	0	0	0	PCR
Arredondo [120]	2011	69	1.4	246	0	serology
Furuta [121]	2011	67	3.0	500	1.5	immunoblot
Sakuma [122]	2011	110	4.5	40	2.5	IHC
		159	0	201	0	ELISA
Sabunciyan* [123]	2011	200	NR	200	NR	ELISA
Stieler [124]	2011	92	0	7	0	cultivation of blood cells + PCR
		100	0	50	2	tissue microarray
		20	0	0	0	IHC
Switzer [125]	2011	162	1.9	0	0	PCR
			0		0	serology
Verhaegh [126]	2011	74	4	0	0	PCR

CaP = prostate cancer, PCR = polymerase chain reaction, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, IHC = immunohistochemistry, NR = not reported.

\* Results were not statistically significant.

pathway, the enzyme cleaves viral RNA, which limits its propagation before the development of a full immune response [71]. Mapping of the hereditary CaP gene (*HPC*) to the RNaseL gene (*RNaseL*) led to the speculation that *RNaseL* mutations could be implicated in sporadic CaP, which was confirmed in some reports and disputed in others [72]. Further DNA hybridization microarray studies that included various conserved viral DNA sequences identified a novel retrovirus and linked its effects to the R462Q allele of RNaseL [70].

The virus was called the xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and subsequently detected by some researchers, whereas other groups failed to find the virus in CaP samples. According to the most recent publications, laboratory contamination [73] may be responsible for the controversial results of the studies that have been avidly published over the past 5 years. With the exception of HPV, no other pathogen that has been covered in this review gained such popularity (by number of publications over a period). Whether XMRV is a genuine human pathogen remains unresolved. Until the controversy settles [74], we prefer to briefly summarize the relevant studies in Table 3.

### 3.9. Limitations of the present review

Spurious relationships caused by confounding factors favor positive results in the research. Whether the authors of

the original papers listed in this review accounted for confounding factors is not significant because the conclusion of this review found generally no links between infection and CaP risk. Acquisition of infection at a younger age could have a different impact on CaP risk than at 50 years of age. Serology is usually not able to determine the time when a pathogen infected its host and the effect of infection on carcinogenesis could be different if a time-dependence existed.

In addition, several sources of bias [5] that may have distorted this review need to be considered. Recall bias (i.e., patients may have remembered more about previous exposures than controls) and interviewer bias (interviewers may have asked questions in a nonobjective way that affected the outcome of the interview) were avoided by the inclusion of publications that were only based on laboratory assays that documented previous exposure. Detection bias (i.e., men who were previously treated for an STD may have received more urologic care, which could have led to an overdiagnosis of CaP in this patient subpopulation) that may have been present in several studies could not be eliminated in the review. However, if such a bias existed, it would have strengthened the association between CaP and genitourinary infection. We have made every effort to find all the relevant publications. If publication bias existed (we cannot rule out the possibility of a study having a negative result that was not published or a study that was published in a minor or

non-English language journal), it would again favor a positive association between CaP and infection. In contrast, it seems unlikely that a well-designed and reasonably sized study that supported the association between CaP and infection would not have been published or was not indexed in a leading medical research public database, such as MEDLINE. Therefore, none of these biases should make the conclusions of this review questionable.

#### 4. Conclusions

The search to determine an infectious cause of CaP has lasted over 30 years. Both serologic and tissue-based studies have been done. After performing a critical appraisal of the published evidence, we conclude that the association between CaP and infections caused by most pathogens that have been studied to date is not supported.

HPV has been the most extensively investigated pathogen, and its direct involvement in CaP carcinogenesis was not observed. Research that has been conducted on other infectious agents discussed in this review, whether viral (herpesviruses, polyomaviruses) or bacterial in nature (*Ch. trachomatis*, *T. vaginalis*, mycoplasma, ureaplasma, and others), has produced mostly negative results. The case of xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV), which is the most recently investigated pathogen, illustrates that the scientific journey is a place for both surprise and disappointment.

Further research in the field of CaP and infections may bring new insights into the matter, especially if novel laboratory techniques are used. Nonetheless, regarding the promising results of many previous studies, caution and skepticism are warranted. A discovery of an infectious agent that is directly associated with CaP could have significant therapeutic implications; however, the disease may represent 80% of human malignancies that have a noninfectious etiology [75].

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at [doi:10.1016/j.urolonc.2012.01.013](https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.01.013).

#### References

- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011;61:212–36.
- [2] Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765–81.
- [3] Kirby RS, Patel MI. Fast facts: Prostate cancer. Oxford: Health Press Limited; 2009.

- [4] Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, et al. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 2007;121:1571–8.
- [5] Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 2002;60:78–83.
- [6] Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo AM, et al. Gonorrhea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2160–6.
- [7] Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: Emerging insights. *Carcinogenesis* 2004;26:1170–81.
- [8] De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:256–69.
- [9] Ravich A. Cancer of prostate; its relationship to circumcision. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1952;8:351–3.
- [10] Strickler HD, Goedert JJ. Sexual behavior and evidence for an infectious cause of prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:144–51.
- [11] Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, et al. Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;82:718–25.
- [12] Taylor ML, Mainous AG, Wells BJ. Prostate cancer and sexually transmitted diseases: A meta-analysis. *Fam Med* 2005;37:506–12.
- [13] Huang WY, Hayes R, Pfeiffer R, et al. Sexually transmissible infections and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2374–81.
- [14] Sutcliffe S, Platz EA. Inflammation in the etiology of prostate cancer: An epidemiologic perspective. *Urol Oncol* 2007;25:242–9.
- [15] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10):K17–28.
- [16] McNicol PJ, Dodd JG. Detection of human papillomavirus DNA in Prostate Gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. *J Clin Microbiol* 1990;28:409–12.
- [17] Lin Y, Mao Q, Zheng X, et al. Human papillomavirus 16 or 18 infection and prostate cancer risk: A meta-analysis. *Ir J Med Sci* 2011;180:497–503.
- [18] Anwar K, Nakakuki K, Shiraishi T, et al. Presence of ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas. *Cancer Res* 1992;52:5991–6.
- [19] Serth J, Panitz F, Paeslack U, et al. Increased levels of human papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res* 1999;59:823–5.
- [20] Leiros GJ, Galliano SR, Sember ME, et al. Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina. *BMC Urol* 2005;5:15.
- [21] Sarkar FH, Sakr WA, Li YW, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in human prostatic tissues by polymerase chain reaction (PCR). *Prostate* 1993;22:171–80.
- [22] Strickler HD, Burk R, Shah K, et al. A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma. *Cancer* 1998;82:1118–25.
- [23] Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, et al. Detection of Human Polyomaviruses and Papillomaviruses in prostatic Tissue Reveals the Prostate as a Habitat for Multiple Viral Infections. *Prostate* 2002;53:263–76.
- [24] Martinez-Fierro ML, Leach RJ, Gomez-Guerra LS, et al. Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer. *BMC Cancer* 2010;10:326.
- [25] Adami HO, Kuper H, Andersson SO, et al. Prostate cancer risk and Serologic evidence of human papilloma virus infection: A population-based Case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:872–5.
- [26] Dillner J, Knekt P, Boman J, et al. Sero-epidemiological association between human papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 1998;75:564–7.
- [27] Hrbacek J, Urban M, Hamsikova E, et al. Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: A case-control study. *BMC Cancer* 2011;11:53.

- [28] Hrbacek J, Urban M, Eis V, et al. Genitourinary tract infections in patient history do not correlate with prostate cancer biological behaviour and prognosis. *Ces Urol* 2011;15:172–80.
- [29] Sutcliffe S, Alderete JF, Till C, et al. Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the prostate cancer prevention trial. *Int J Cancer* 2009;124:2082–7.
- [30] Staras SA, Dollard SC, Radford KW, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988–1994. *Clin Infect Dis* 2006;43:1143–51.
- [31] Samanta M, Harkins L, Klemm K, et al. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 2003;170:998–1002.
- [32] Boldogh I, Baskar JF, Mar EC, et al. Human cytomegalovirus and herpes simplex type 2 virus in normal and adenocarcinomatous prostate glands. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:819–26.
- [33] Eizuru Y, Hyman RW, Nahhas WA, et al. Herpesvirus RNA in human urogenital tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;174:296–301.
- [34] Bergh J, Marklund I, Gustavsson C, et al. No link between viral findings in the prostate and subsequent cancer development. *Br J Cancer* 2007;96:137–9.
- [35] Leskinen MJ, Vainionp R, Syrjnen S, et al. Herpes simplex virus, cytomegalovirus, and papillomavirus DNA are not found in patients with chronic pelvic pain syndrome undergoing radical prostatectomy for localized prostate cancer. *Urology* 2003;61:397–401.
- [36] Sfanos KS, Sauvageot J, Fedor HL, et al. A molecular analysis of Prokaryotic and Viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms. *Prostate* 2008;68:306–20.
- [37] Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *J Infect Dis* 2002;185:1019–24.
- [38] Baker LH, Mebust WK, Chin TD, et al. The relationship of herpesvirus to carcinoma of the prostate. *J Urol* 1981;125:370–4.
- [39] Dennis LK, Coughlin JA, McKinnon BC, et al. Sexually transmitted infections and prostate cancer among men in the U.S. Military. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2665–71.
- [40] Korodi Z, Wang X, Tedeschi R, et al. No serological evidence of association between prostate cancer and infection with herpes simplex virus type 2 or human herpesvirus type 8: A nested case-control study. *J Infect Dis* 2005;191:2008–11.
- [41] Monini P, de Lellis L, Fabris M, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med* 1996;334:1168–72.
- [42] Rubin MA, Parry JP, Singh B. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus deoxyribonucleic acid sequences: Lack of detection in prostatic tissue of human immunodeficiency virus-negative immunocompetent adults. *J Urol* 1998;159:146–8.
- [43] Diamond C, Brodie SJ, Krieger JN, et al. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 1998;72:6223–7.
- [44] Corbellino M, Bestetti G, Galli M, et al. Absence of HHV-8 in prostate and semen. *N Engl J Med* 1996;335:1237.
- [45] Blackburn DJ, Levy JA. Human herpesvirus 8 in semen and prostate. *AIDS* 1997;11:249–50.
- [46] Hoffman LJ, Bunker CH, Pellett PE, et al. Elevated seroprevalence of human herpesvirus 8 among men with prostate cancer. *J Infect Dis* 2004;189:15–20.
- [47] Sutcliffe S, Giovannucci E, Gaydos CA, et al. Serum antibodies against Chlamydia trachomatis, human papillomavirus, and human herpesvirus type 8 in relation to prostate cancer: A prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1573–80.
- [48] Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, et al. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* 2002;62:4876–8.
- [49] González AB, Urban MI, Sitas F, et al. Antibodies against six human herpesviruses in relation to seven cancers in black South Africans: A case control study. *Infect Agents Cancer* 2006;1:2.
- [50] Tognon M, Corallini A, Martini F, et al. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* 2003;22:5192–200.
- [51] Monini P, Rotola A, Di Luca D, et al. DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology* 1995;214:273–9.
- [52] Das D, Shah RB, Imperiale MJ. Detection and expression of human BK virus sequences in neoplastic prostate tissues. *Oncogene* 2004;23:7031–46.
- [53] Das D, Wojno K, Imperiale MJ. BK virus as a cofactor in the etiology of prostate cancer in its early stages. *J Virol* 2008;82:2705–14.
- [54] Russo G, Anzivino E, Fioriti D, et al. p53 gene mutational rate, Gleason score, and BK virus infection in prostate adenocarcinoma: Is there a correlation? *J Med Virol* 2008;80:2100–7.
- [55] Newton R, Ribeiro T, Casabonne D, et al. Antibody levels against BK virus and prostate, kidney and bladder cancers in the EPIC-Oxford cohort. *Br J Cancer* 2005;93:1305–6.
- [56] Wagenlehner FME, Weidner W, Naber KG. Chlamydial infections in urology. *World J Urol* 2006;24:4–12.
- [57] Antilla T, Tenkanen L, Lumme S, et al. Chlamydial antibodies and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:385–9.
- [58] Corradi G, Bucsek M, Pánovics J, et al. Detection of Chlamydia trachomatis in the prostate by in-situ hybridization and by transmission electron microscopy. *Int J Androl* 1996;19:109–12.
- [59] Johnston VJ, Mabey DC. Global epidemiology and control of Trichomonas vaginalis. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:56–64.
- [60] Sutcliffe S, Giovannucci E, Alderete JF, et al. Plasma antibodies against Trichomonas vaginalis and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:939–45.
- [61] Ketcham CM, Anai S, Reutzel R, et al. p37 induces tumor invasiveness. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1031–8.
- [62] Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, et al. Persistent exposure to mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS ONE* 2009;4:e6872.
- [63] Urbanek C, Goodison S, Chang M, et al. Detection of antibodies directed at M. hyorhinis p37 in the serum of men with newly diagnosed prostate cancer. *BMC Cancer* 2011;11:233.
- [64] Barykova YA, Logunov DY, Shmarov MM, et al. Association of Mycoplasma hominis infection with prostate cancer. *Oncotarget* 2011;2:289–97.
- [65] Krieger JN, Riley DE, Vesella RL, et al. Bacterial dna sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer and chronic prostatitis. *J Urol* 2000;164:1221–8.
- [66] Alexeyev O, Bergh J, Marklund I, et al. Association between the presence of bacterial 16S RNA in prostate specimens taken during transurethral resection of prostate and subsequent risk of prostate cancer (Sweden). *Cancer Causes Control* 2006;17:1127–33.
- [67] Alexeyev OA, Marklund I, Shannon B, et al. Direct visualization of Propionibacterium acnes in prostate tissue by multicolor fluorescent in situ hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:3721–8.
- [68] Fassi Fehri L, Mak TN, Laube B, et al. Prevalence of Propionibacterium acnes in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 2011;301:69–78.
- [69] Severi G, Shannon BA, Hoang HN, et al. Plasma concentration of Propionibacterium acnes antibodies and prostate cancer risk: Results from an Australian population-based case-control study. *Br J Cancer* 2010;103:411–5.
- [70] Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, et al. Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNaseL variant. *PLoS Pathog* 2006;2:e25.

- [71] Bisbal C, Silverman RH. Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie* 2007;89:789–98.
- [72] Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:49–57.
- [73] Hué S, Gray ER, Gall A, et al. Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology* 2010;7:111.
- [74] Cohen J, Enserink M. Virology. False positive. *Science* 2011;333:1694–701.
- [75] Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol* 2009;8:67.
- [76] McNicol PJ, Dodd JG. High prevalence of human papillomavirus in prostate tissues. *J Urol* 1991;145:850–3.
- [77] Masood S, Rhatigan RM, Powell S, et al. Human papillomavirus in prostatic cancer: No evidence found by in situ hybridization. *South Med J* 1991;84:235–6.
- [78] Effert PJ, Frye RA, Neubauer A, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 are not involved in human prostate carcinogenesis: Analysis of archival human prostate cancer specimens by differential polymerase chain reaction. *J Urol* 1992;147:192–6.
- [79] Serfling U, Ciancio G, Zhu WY, et al. Human papillomavirus and herpes virus DNA are not detected in benign and malignant prostatic tissue using the polymerase chain reaction. *J Urol* 1992;148:192–4.
- [80] Rotola A, Monini P, DiLuca D, et al. Presence and physical state of HPV DNA in prostate and urinary tract tissues. *Int J Cancer* 1992;52:359–65.
- [81] Ibrahim GK, Gravitt PE, Dittrich KL, et al. Detection of human papillomavirus in the prostate by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Urol* 1992;148:1822–6.
- [82] Dodd JG, Paraskevas M, McNicol PJ. Detection of human papillomavirus 16 transcription in human prostate tissue. *J Urol* 1993;149:400–2.
- [83] Sarkar FH, Sakr WA, Li YW, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in human prostatic tissues by polymerase chain reaction (PCR). *Prostate* 1993;22:171–80.
- [84] Tu H, Jacobs SC, Mergner WJ, et al. Rare incidence of human papillomavirus types 16 and 18 in primary and metastatic human prostate cancer. *Urology* 1994;44:726–31.
- [85] Moyret-Lalle C, Marçais C, Jacquemier J, et al. p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int J Cancer* 1995;64:124–9.
- [86] Suzuki H, Komiya A, Aida S, et al. Detection of human papillomavirus DNA and p53 Gene mutations in human prostate cancer. *Prostate* 1996;28:318–24.
- [87] Wideroff L, Schottenfeld D, Carey TE, et al. Human papillomavirus DNA in malignant and hyperplastic prostate tissue of Black and White males. *Prostate* 1996;28:117–23.
- [88] Anderson M, Handley J, Hopwood L, et al. Analysis of prostate tissue DNA for the presence of human papillomavirus by polymerase chain reaction, cloning, and automated sequencing. *J Med Virol* 1997;52:8–13.
- [89] Noda T, Sasagawa T, Dong Y, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res* 1998;26:165–9.
- [90] Strickler HD, Burk R, Shah K, et al. A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma. *Cancer* 1998;82:1118–25.
- [91] Saad F, Gu K, Jean-Baptiste J, et al. Absence of human papillomavirus sequences in early stage prostate cancer. *Can J Urol* 1999;6:834–8.
- [92] Carozzi F, Lombardi FC, Zendron P, et al. Association of human papillomavirus with prostate cancer: Analysis of a consecutive series of prostate biopsies. *Int J Biol Markers* 2004;19:257–61.
- [93] Balis V, Sourvinos G, Soultizis N, et al. Prevalence of BK virus and human papillomavirus in human prostate cancer. *Int J Biol Markers* 2007;22:245–51.
- [94] Gazzaz FS, Hisham AM. Lack of detection of human papillomavirus infection by hybridization test in prostatic biopsies. *Saudi. J Med* 2009;30:633–7.
- [95] Silvestre RV, Leal MF, Demachki S, et al. Low frequency of human papillomavirus detection in prostate tissue from individuals from Northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:665–7.
- [96] Aghakhani A, Hamkar R, Parvin M, et al. The role of human papillomavirus infection in prostate carcinoma. *Scand J Infect Dis* 2011;43:64–9.
- [97] Baker LH, Mebust WK, Chin TD et al. The relationship of herpesvirus to carcinoma of the prostate. *J Urol* 1981;125:370–4.
- [98] Haid M, Sharon N. Immunofluorescent evidence of prior herpes simplex virus type-2 infection in prostate carcinoma. *Urology* 1984;24:623–5.
- [99] Tasaka T, Said JW, Morosetti R, et al. Is Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ubiquitous in urogenital and prostate tissues? *Blood* 1997;89:1686–9.
- [100] Lebbé C, Pellet C, Tatoud R, et al. Absence of human herpesvirus 8 sequence in prostate specimens. *AIDS* 1997;11:70.
- [101] Lau SK, Lacey SF, Chen YY, et al. Low frequency of BK virus in prostatic adenocarcinomas. *APMIS* 2007, 2007;115:743–9.
- [102] Monini P, Rotola A, de Lellis L, et al. Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer* 1996;66:717–22.
- [103] Akgül B, Pfister D, Knüchel R, et al. No evidence for a role of xenotropic murine leukaemia virus-related virus and BK virus in prostate cancer of German patients. *Med Microbiol Immunol* 2011; Sep 6. [Epub ahead of print].
- [104] Hisada M, Rabkin CS, Strickler HD, et al. Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000;3:340–1.
- [105] Rosenblatt KA, Carter JJ, Iwasaki LM, et al. Serologic evidence of human papillomavirus 16 and 18 infections and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:763–8.
- [106] Korodi Z, Dillner J, Jellum E, et al. Human papillomavirus 16, 18, and 33 infections and risk of prostate cancer: A Nordic nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2952–5.
- [107] Sitas F, Urban M, Stein L, et al. The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infect Agents Cancer* 2007;2:6.
- [108] Sutcliffe S, Giovannucci E, Gaydos CA, et al. Serum antibodies against Chlamydia trachomatis, human papillomavirus, and human herpesvirus type 8 in relation to prostate cancer: A prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1573–80.
- [109] Sutcliffe S, Viscidi RP, Till C, et al. Human papillomavirus types 16, 18, and 31 serostatus and prostate cancer risk in the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:614–8.
- [110] Mandel JS, Schuman LM. Sexual factors and prostatic cancer: Results from a case-control study. *J Gerontol* 1987;42:259–64.
- [111] Jenkins FJ, Hayes RB, Jackson A, et al. Human herpesvirus 8 seroprevalence among prostate cancer case patients and control subjects. *J Infect Dis* 2007;196:208–11.
- [112] McDonald AC, Jenkins FJ, Bunker CH, et al. A case-cohort study of human herpesvirus 8 seropositivity and incident prostate cancer in Tobago. *Infect Agents Cancer* 2011;6:25.
- [113] Stark JR, Judson G, Alderete JF, et al. Prospective study of Trichomonas vaginalis infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' health study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1406–11.
- [114] Fischer N, Hellwinkel O, Schulz C, et al. Prevalence of human gammaretrovirus XMRV in sporadic prostate cancer. *J Clin Virol* 2008;43:277–83.

- [115] Hohn O, Krause H, Barbarotto P, et al. Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus(XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology* 2009;6:92.
- [116] Schlaberg R, Choe DJ, Brown KR, et al. XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16351–6.
- [117] Aloia AL, Sfanos KS, Isaacs WB, et al. XMRV: A new virus in prostate cancer? *Cancer Res* 2010;70:10028–33.
- [118] Arnold RS, Makarova NV, Osunkoya AO, et al. XMRV infection in patients with prostate cancer: Novel serologic assay and correlation with PCR and FISH. *Urology* 2010;75:755–61.
- [119] Danielson BP, Ayala GE, Kimata JT. Detection of xenotropic murine leukemia virus-related virus in normal and tumor tissue of patients from the southern United States with prostate cancer is dependent on specific polymerase chain reaction conditions. *J Infect Dis* 2010;191:1470–7.
- [120] Arredondo M, Hackett J, de Bethencourt FR, et al. Prevalence of XMRV infection in different risk populations in Spain. *AIDS Res Hum Retrovir* 2011; Feb 21. [Epub ahead of print].
- [121] Furuta RA, Miyazawa T, Sugiyama T, et al. No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan. *Retrovirology* 2011;17:8:20.
- [122] Sakuma T, Hué S, Squillace KA, et al. No evidence of XMRV in prostate cancer cohorts in the midwestern United States. *Retrovirology* 2011;8:23.
- [123] Sabunciyan S, Mandelberg N, Rabkin CS, et al. No difference in antibody titers against xenotropic MLV related virus in prostate cancer cases and cancer-free controls. *Mol Cell Probes* 2011;25:134–6.
- [124] Stieler K, Schindler S, Schlomm T, et al. No detection of XMRV in blood samples and tissue sections from prostate cancer patients in Northern Europe. *PLoS ONE* 2011;6:e25592.
- [125] Switzer WM, Jia H, Zheng H, et al. No association of xenotropic murine leukemia virus-related viruses with prostate cancer. *PLoS ONE* 2011;6:e19065.
- [126] Verhaegh GW, de Jong AS, Smit FP, et al. Prevalence of human xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus (XMRV) in Dutch prostate cancer patients. *Prostate* 2011;71:415–20.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study

Jan Hrbacek<sup>1</sup>, Michael Urban<sup>1,5</sup>, Eva Hamsikova<sup>2</sup>, Ruth Tachezy<sup>2</sup>, Vaclav Eis<sup>3</sup>, Marek Brabec<sup>4</sup>, Jiri Heracek<sup>1,5\*</sup>

## Abstract

**Background:** Infection plays a role in the pathogenesis of many human malignancies. Whether prostate cancer (PCa) - an important health issue in the aging male population in the Western world - belongs to these conditions has been a matter of research since the 1970 s. Persistent serum antibodies are a proof of present or past infection. The aim of this study was to compare serum antibodies against genitourinary infectious agents between PCa patients and controls with benign prostate hyperplasia (BPH). We hypothesized that elevated serum antibody levels or higher seroprevalence in PCa patients would suggest an association of genitourinary infection in patient history and elevated PCa risk.

**Methods:** A total of 434 males who had undergone open prostate surgery in a single institution were included in the study: 329 PCa patients and 105 controls with BPH. The subjects' serum samples were analysed by means of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation test and indirect immunofluorescence for the presence of antibodies against common genitourinary infectious agents: human papillomavirus (HPV) 6, 11, 16, 18, 31 and 33, herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, human cytomegalovirus (CMV), Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae and Treponema pallidum. Antibody seroprevalence and mean serum antibody levels were compared between cases and controls. Tumour grade and stage were correlated with serological findings.

**Results:** PCa patients were more likely to harbour antibodies against Ureaplasma urealyticum (odds ratio (OR) 2.06; 95% confidence interval (CI) 1.08-4.28). Men with BPH were more often seropositive for HPV 18 and Chlamydia trachomatis (OR 0.23; 95% CI 0.09-0.61 and OR 0.45; 95% CI 0.21-0.99, respectively) and had higher mean serum CMV antibody levels than PCa patients ( $p = 0.0004$ ). Among PCa patients, antibodies against HPV 6 were associated with a higher Gleason score ( $p = 0.0305$ ).

**Conclusions:** Antibody seropositivity against the analyzed pathogens with the exception of Ureaplasma does not seem to be a risk factor for PCa pathogenesis. The presence or higher levels of serum antibodies against the genitourinary pathogens studied were not consistently associated with PCa. Serostatus was not a predictor of disease stage in the studied population.

## Background

Prostate cancer (PCa) is one of the most important health issues in the aging male population, especially in the industrialized Western world. In the EU in 2006, it accounted for approximately 20% of all noncutaneous cancers [1]. In the United States, 217.730 new cases

were estimated to occur in 2010 (28% of all new cancer cases in men except for basal and squamous cell skin carcinomas) and 32.050 men were expected to die from PCa (11% of all cancer-related deaths) [2].

Research on the etiology of human cancer has found evidence for 15-20% of them being caused by an infectious agent. Whether PCa or at least a subgroup of PCa cases are associated with infection has been a matter of debate since the 1970 s. With the widespread use of sophisticated serological assays and molecular biology

\* Correspondence: heracekj@seznam.cz

<sup>1</sup>Charles University in Prague, 3rd Faculty of Medicine, Department of Urology, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

methods for the detection of infectious agents in tissue, several studies have been published in the past two decades giving a better insight into the matter. Many of them have focused on a single pathogen only [3-9].

We have conducted an epidemiological study of several most common genitourinary pathogens among PCa and benign prostate hyperplasia (BPH) patients. The aim of the study was to elucidate whether the prevalence of antibody seropositivity and/or antibody levels differ between these two groups of patients. We hypothesized that elevated serum antibody levels or higher seroprevalence in PCa patients would suggest an association of genitourinary infection in patient history and elevated PCa risk.

**Methods**

**Study population**

This is a hospital-based case-control study. The study population consisted of a total of 434 Caucasian males who had been treated with open prostate surgery in the Department of Urology of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague in the period 2004-2010. The institution is a public hospital with a non-selective admission policy based on a defined catchment area. Patients underwent open radical retropubic prostatectomy (RRP) modified by Reiner and Walsh [10,11] for clinically localized PCa or simple transvesical prostatectomy (SP) as described by Fuller and Culp [12,13] for BPH. No transurethral resection of the prostate (TURP) or needle-biopsy specimens were used in the study as both methods only deliver so little tissue that small foci of PCa can be missed. In 5 cases, percutaneous cystolithotripsy was performed along with SP. All patients were free of urinary tract infection symptoms and had a negative urine culture at the time of surgery. Those with untreatable bacteriuria (eg. for bladder stones and/or an indwelling catheter) were treated with antibiotics in the perioperative period.

Study population characteristics are summarized in Table 1. See patient flow diagram (Figure 1) for recruitment and pre-enrolment phase details.

A written informed consent, approved by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and by the Ethical Committee of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague (an IRB-like body which also approved the study), was obtained from all patients.

**Tissue sample handling**

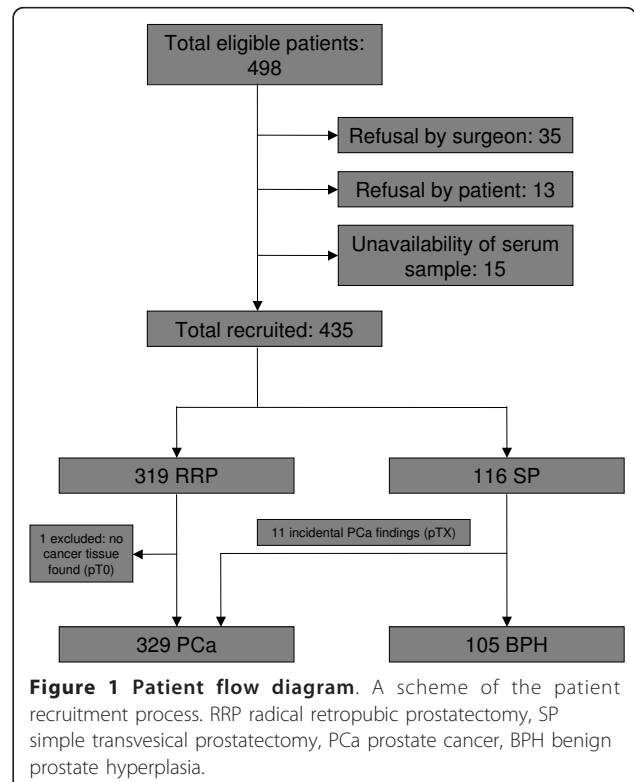
Immediately after removal from the anatomical location, the specimens were referred to the Department of Pathology for examination: radical prostatectomy specimens were processed according to the scheme described by Montironi [14]: the external surface of the prostate

**Table 1 The study population characteristics**

	Patient group	
	PCa	BPH
<b>Total number of patients</b>	<b>329 patients</b>	<b>105 patients</b>
Mean age (years)	64 (39-81)	72 (54-87)
<60	76 (23.1%)	7 (6.7%)
60-69	191 (58.1%)	33 (31.4%)
70-79	61 (18.5%)	43 (41.0%)
>79	1 (0.3%)	22 (21.0%)
Mean PSA (ng/mL)	9.0 (0.8-35.4)	7.5 (0.9-39.0)
0-4.0	37 (11.5%)	25 (33.8%)
4.1-10.0	176 (54.8%)	35 (47.3%)
10.1-20.0	94 (29.3%)	9 (12.2%)
>20.0	14 (4.4%)	5 (6.7%)

Overall demographic and clinical characteristics of the studied population. PCa prostate cancer, BPH benign prostate hyperplasia, PSA prostate specific antigen.

was painted with ink to indicate surgical margins, seminal vesicles were amputated and embedded. Then the apical and bladder neck margins were removed and sectioned parallel to the urethra and submitted for the examination of margins. The rest of the prostate was sliced at 5 mm intervals perpendicularly to the urethra and examined. Tissue specimens obtained from transvesical prostatectomy were sectioned in 5 mm slices and representative sections from each lobe (a minimum of



**Figure 1 Patient flow diagram.** A scheme of the patient recruitment process. RRP radical retropubic prostatectomy, SP simple transvesical prostatectomy, PCa prostate cancer, BPH benign prostate hyperplasia.

three sections from each lobe, or one section per 10 g of tissue) were examined [15]. Tissue specimens were routinely fixed with 4% buffered formalin and embedded in paraffin. Microscopic slides were stained with hematoxylin and eosin and evaluated by optical microscopy. A single pathologist experienced in urogenital pathology performed microscopic evaluation of the slides. The morphological parameters were recorded as follows: histological type of cancer, if present (based on WHO classification [16]); Gleason score (GS) with primary, secondary and tertiary, if appropriate, grades (according to 2005 ISUP Consensus Conference [17]); pathological stage [18]; evaluation of tumour extension, local invasion into periprostatic tissue or seminal vesicles, perineural spread, venous and/or lymphatic vessel invasion and surgical margin status [19]. PCa was present in 329 surgical specimens, 105 were classified as BPH without any malignant structures. Table 2 summarizes GS and staging information for the PCa group. Fasting peripheral venous blood samples were drawn between 6 and 8 a.m. on the day of surgery and centrifuged at 2000 rpm for 20 minutes. The aliquots were kept frozen at -80°C until analysis.

#### Laboratory analyses

The presence of antibodies to *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, human cytomegalovirus (CMV), *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Treponema pallidum* (*T. pallidum*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) and *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) were detected by means of enzyme-linked immunoanalysis (ELISA), complement fixation test (CFT) or indirect immunofluorescence (IF) using commercially available, CE marked kits according to the manufacturers' recommendations. Table 3 gives a detailed description of the kits. Specific antibodies to HPV were detected by means of an in-house method

using virus-like particles (prepared in a recombinant baculovirus/insect cells system) as antigens [20]. Laboratory personnel were blinded to case/control status of the samples.

#### Preparation of virus-like particles (VLPs)

Insect cells Sf9 were grown in suspension cultures in TNM-FH insect medium (Sigma). About  $4 \times 10^9$  of cells were infected by recombinant baculovirus at MOI 10 PFU per cell. Various recombinant baculoviruses carried the genetic information for L1 capsid protein of specific HPV types. Seventy-two hours after infection, the cells were harvested, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -20°C. Cell pellets were resuspended in 40 ml of extraction buffer (10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 150 mmol/l NaCl, 0.01% Triton X-100, 20 mmol/l HEPES, pH 7.4) and sonicated 3x30 minutes on ice, the suspension was pelleted, the pellet was resuspended in 40 ml of extraction buffer and sonication was repeated. Cesium chloride was added to combined supernatants to the final concentration of 30% and ultra-centrifuged for 22 hours at 45,000 rpm at 18°C. The upper band was then separated by ultra centrifugation on CsCl step gradient (36%-30.5%-16%) for 4 hours at 35,000 rev/min. at 18°C. The band was removed and subjected to SDS PAGE to determine protein concentration and Western blotting, and ELISA with corresponding VLP-specific monoclonal antibodies to prove the presence of the respective antigen.

#### Detection of HPV-specific antibodies

The presence of antibodies to the antigens derived from HPV-specific proteins was tested using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). VLPs mimicking HPV types 6, 11, 16, 18, 31 and 33 were used as antigens. Briefly, wells of microtiter plates (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Denmark) were coated with 50 µl of purified VLP (2 µg/ml) in PBS at 37°C for 2 hours and at +4°C overnight. All subsequent incubations were performed at +37°C for 1 hour. Unbound antigen was removed, nonspecific binding sites were blocked by incubation with 1% bovine-serum albumin (BSA) in PBS, and the wells were incubated in duplicate with 100 µl of human sera diluted 1:25 in washing buffer (PBS, 0.21 mol/l NaCl, 0.1% Triton X-100) with 1% of BSA. Following incubation, the antibodies bound were detected with donkey anti-human IgG (H and L chain), covalently linked to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA), in the same buffer (1:7,500) and the reaction was visualized by adding 100 µl of a substrate buffer (50 mmol/l phosphate-citrate buffer, pH 5.0) containing 0.04% o-phenylenediamine and 0.006% hydrogen peroxide. The color reaction was stopped by 100 µl of

**Table 2 Gleason score and tumour stage in prostate cancer cases**

Tumour grading	
Median Gleason score	6
2-6	169 (51.4%)
7	124 (37.7%)
8-10	36 (10.9%)
Tumour pathological stage	
≤pT2a	18 (5.5%)
pT2b	5 (1.5%)
pT2c	134 (40.7%)
pT3a	98 (29.8%)
≥pT3b	63 (19.1%)
pTX	11 (3.4%)

**Table 3 Commercially available kits used for the detection of antibodies**

Pathogen	Method	Kit	Manufacturer
Cytomegalovirus	ELISA	ETI-CYTOK-G	DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy
Herpes simplex virus type 1	ELISA	Captia™HSV 1 IgG	Trinity Biotech plc, Bray, Ireland
Herpes simplex virus type 2	ELISA	HerpeSelect(R) 2 ELISA IgG	FOCUS Diagnostics, Cypress, CA, USA
Chlamydia trachomatis	ELISA	Chlamydia Trachomatis IgG - ELISA	NovaTec Immunodiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany
Mycoplasma hominis	Indirect immunofluorescence test	Anti-Mycoplasma Hominis IIFT (IgG)	Eurolmmun, Lübeck, Germany
Ureaplasma urealyticum	Indirect immunofluorescence test	Anti-Ureaplasma Urealyticum IIFT (IgG)	Eurolmmun, Lübeck, Germany
Neisseria gonorrhoeae	Complement fixation test	Complement fixation test Neisseria gonorrhoeae	Serion Immunodiagnostica GmbH, Würzburg, Germany
Treponema pallidum	ELISA	Syphilis EIA II (TAJ)	Newmarket Laboratories Ltd, Kentford, UK

2 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and optical densities at 492 and 630 nm were read with an Infinite 200 microplate reader (TECAN, Austria). Background reactivity was determined in wells without antigen. Their absorbances were subtracted from the corresponding values obtained in the presence of antigen. Control sera known to be positive or negative were tested on each plate. The cut-off (CO) level, above which the optical density values were considered positive, was represented by a mean absorbance plus 2 standard deviations (SD) after eliminating the outliers - samples with absorbances higher than the calculated cut-off value - and the calculation was repeated until the absorbances of all remaining samples were lower. The means and SDs were calculated for each antigen/plate separately. All ELISA results are represented as a ratio between the absorbance obtained with the tested sample and the appropriate cut-off value (OD index), which expresses the strength of antibody response (antibody levels). To confirm the results, all samples within 10% above the CO value as well as about one quarter of all serum samples were retested. Samples with OD index values ≤ 1.0 were considered not reactive.

#### Statistical analyses

Descriptive statistics was employed to assess demographic and clinical variables in all subjects. Local stage and tumour aggressiveness by GS were calculated in PCa patients.

We established seropositivity rates for each individual pathogen in cases and in controls. Percentages of seropositive individuals were compared using Fisher's exact test.

The mean serum antibody levels represented by OD indexes were calculated and compared between the two groups for HPV, HSV, CMV and *C. trachomatis* where ELISA allows for quantitative assessment using Wilcoxon's (nonparametric) test.

We were looking for a possible association between seropositivity and PSA level, seropositivity and tumour GS, and seropositivity and localized vs. locally advanced disease using appropriate logistic regression models. Throughout the paper, 5% significance level is meant whenever we mention statistical significance. All statistical analyses were computed using statistical software "R" <http://www.r-project.org/>.

This paper's contents were developed with regard to current recommendations on reporting of observational studies [21].

#### Results

In a total of 434 study subjects, there were 329 PCa patients (mean age 64 years) and 105 controls with BPH (mean age 72 years). PCa had been present in 11 patients out of 116 who underwent SP. These incidental carcinomas were included in the PCa group for case vs. control comparisons but were excluded from analyses where exact local staging was required (see Figure 1). The mean PSA levels were 9.0 and 7.5 ng/mL among subjects and controls, respectively (Table 1). Among PCa patients, 47.7% were diagnosed with localized disease and 52.3% had locally advanced cancer. One half of the tumours (51.4%) were low-grade lesions GS 2-6, while one tenth (10.9%) were high-grade lesions GS 8-10 (Table 2).

The seropositivity rates and mean serum antibody levels are summarized in Table 4. *U. urealyticum* antibodies were significantly more common in PCa cases than in controls (OR 2.06; 95% CI 1.08-4.28). Conversely, the seropositivity rates for HPV 18 and *C. trachomatis* were significantly higher in BPH patients than in the PCa group using Fisher's exact test (OR 0.23; 95% CI 0.09-0.61 and OR 0.45; 95% CI 0.21-0.99, respectively). The mean serum antibody levels for CMV were higher in the BPH than in the PCa group using

**Table 4 Antibody seropositivity rates and mean serum antibody levels**

	Seroprevalence rate				Mean serum levels OD/CO		
	PCa	BPH	OR	95% CI	PCa	BPH	p
HPV 6	77 (24.1%)	21 (20.8%)	1.21	0.71-2.12	2.608	3.162	0.0964
HPV 11	40 (12.5%)	15 (14.9%)	0.82	0.44-1.60	2.554	2.259	0.9698
HPV 16	16 (5.0%)	10 (9.9%)	0.48	0.21-1.13	3.470	3.251	0.8743
HPV 18	8 (2.5%)	10 (9.9%)	0.23	0.09-0.61	1.496	1.365	0.9290
HPV 31	19 (5.9%)	8 (7.9%)	0.73	0.32-1.83	2.616	3.640	0.1053
HPV 33	7 (2.2%)	5 (5.0%)	0.43	0.13-1.48	2.156	3.620	0.3434
CMV	264 (80.2%)	91 (86.7%)	0.62	0.32-1.14	3.839	4.407	0.0004
HSV 1	313 (95.1%)	99 (94.3%)	1.19	0.42-2.97	3.760	3.832	0.9649
HSV 2	42 (12.8%)	14 (13.3%)	0.95	0.51-1.88	5.362	4.859	0.8056
<i>Chlamydia trachomatis</i>	18 (5.5%)	12 (11.4%)	0.45	0.21-0.99	1.281	1.210	0.6560
<i>Mycoplasma hominis</i>	60 (18.2%)	15 (14.3%)	1.34	0.74-2.55	NA	NA	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	64 (19.5%)	11 (10.5%)	2.06	1.08-4.28	NA	NA	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20 (6.1%)	6 (5.7%)	1.07	0.44-2.99	NA	NA	-
<i>Treponema pallidum</i>	1 (0.3%)	0 (0%)	NA	NA	NA	NA	-

Antibody seropositivity rates for different genitourinary pathogens in cases and controls. Only reactive serum samples (OD/CO > 1.0) were considered for the calculation of mean serum antibody levels. PCa prostate cancer, BPH benign prostate hyperplasia, OR odds ratio, CI confidence interval, OD/CO optical density/cut-off, HPV human papillomavirus, CMV human cytomegalovirus, HSV herpes simplex virus, NA not applicable.

Wilcoxon's test (4.407 vs. 3.839;  $p = 0.0004$ ; see Table 4). For other pathogens, the differences in the seroprevalence and mean serum antibody levels were not statistically significant (Figure 2).

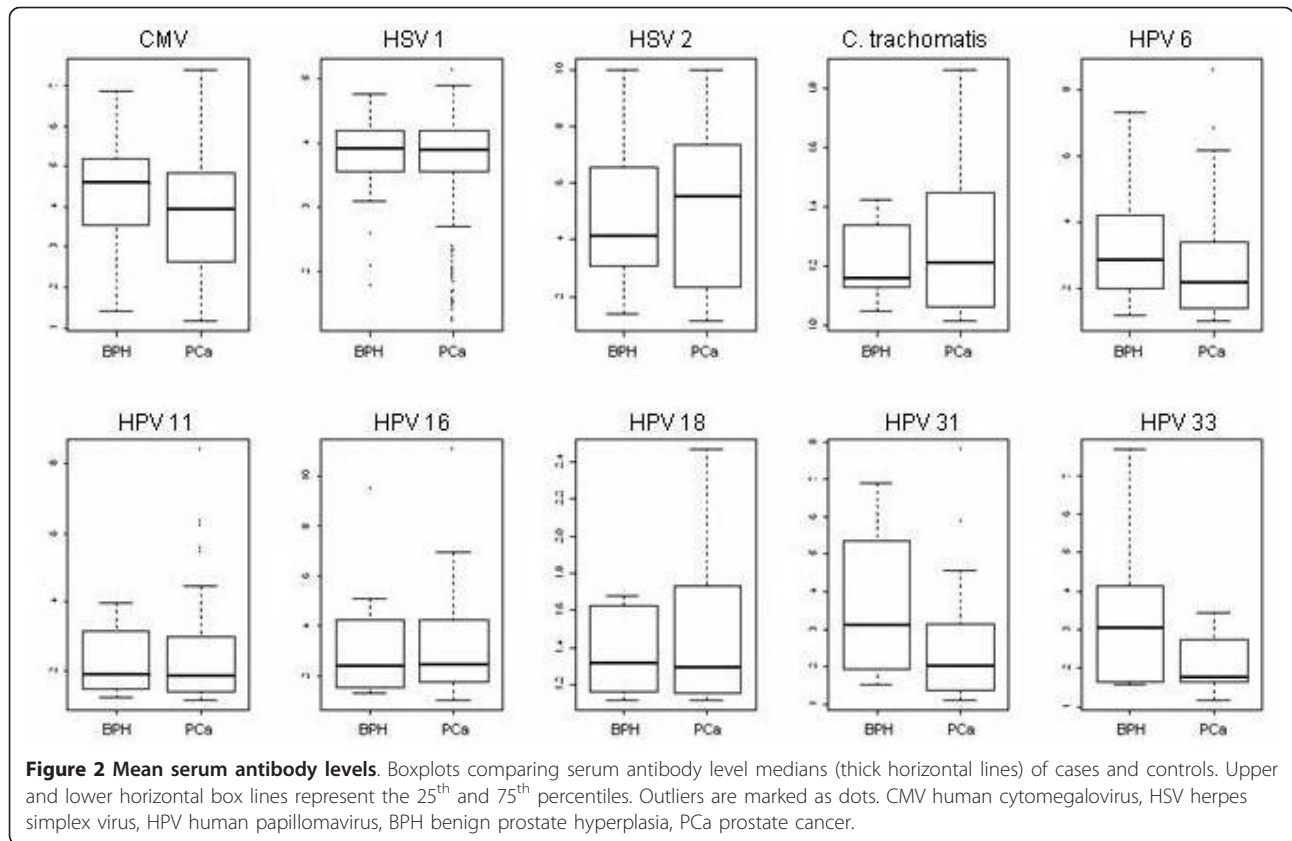
We then analyzed the PCa cases alone with regard to serostatus and disease characteristics. Patients seropositive for HPV 6 were more likely to have higher GS than men without antibodies to HPV 6 (mean GS 6.45 vs. 6.75;  $p = 0.0305$ ); other differences in GS were not demonstrated. No statistically significant difference was noted in the mean PSA level between the seropositive and seronegative (for each pathogen) individuals. The mean serum antibody levels did not differ significantly between the patients with localised disease ( $\leq pT2c$ ) and locally advanced PCa ( $\geq pT3a$ ). These observations did not change when age was taken as an additional variable and linear/logistic regression models were employed (data not shown).

## Discussion

Clinically insignificant foci of PCa are harboured by prostates of 80% of men over 80 years old [22]. The only way to examine the prostate in its entirety and to divide the subjects into the case and control groups is the use of open surgery derived specimens. This approach has not been used so far. No needle biopsy or TURP which can only deliver a small portion of prostatic tissue allows the clinician to rule out the possibility of cancer being present in the rest of the prostate gland. Approximately 1/10 of allegedly benign prostates scheduled by a surgeon for SP turned out as cancerous

in our study, which is in line with the 4-20% incidental prostate cancer rate cited in the literature [23]. Most of the previous studies identified cases in cancer registries while controls were defined either by absence of PCa diagnosis [7,24-27] or as "cancer free" at the time of analysis [6,8,28]. This approach can be misleading, because it is the nature of the disease to evolve as sub-clinical lesions for years or even decades and inclusion of these patients into the control group may have biased the results towards the null. Only few authors assessed the controls more deeply, i.e. by histopathologic examination of prostate tissue [3-5,29,30] obtained by open surgery, TURP or prostate biopsy. Inherently, a needle biopsy or TURP can only confirm but by no means exclude the diagnosis of cancer. Some researchers gathered details of tumour characteristics such as GS and staging by TNM classification [5,8,26,28-32], but in most cases they do not report these data.

The exclusive use of radical prostatectomy-derived specimens allowed for the assessment of seropositivity with regard to exact local staging of the disease. This is the first study to our knowledge to look at the issue so closely. Had there been an association between local disease stage and serostatus, it would have been demonstrated. However, no statistically significant differences were noted. Similarly, no differences were found in the mean PSA levels and mean GS between the seropositive and seronegative PCa patients (with the exception of HPV 6, as mentioned above and discussed later on in this section). The picture remained the same when age was taken as an additional variable.



Since the 1950s when Ravich and Ravich [33] hypothesized that PCa could be caused by an infectious agent, research studies have been conducted in order to confirm or rule out this possibility. Taylor et al. reviewed the literature related to sexually transmitted diseases (STDs) and PCa from 1966 to 2004 identifying 6022 unique PCa cases and 7320 controls and concluded that having had any STD was associated with an elevated PCa risk: odds ratio (OR) of 1.48, 95% confidence interval (CI) 1.26-1.73 [34]. A large recent prospective study by Huang et al., however, did not find an association of PCa with a specific STD and a borderline association with any vs. none [26]. Whereas *C. trachomatis*, HPV 16 and 18, HSV 2, CMV and human herpesvirus 8 were ascertained by serology in this study, a history of syphilis and gonorrhoea was only self-reported.

HPV is a sexually transmitted pathogen which has been the most extensively investigated one because of its association with cervical and a part of other anogenital neoplasms [32]. We have identified 12 epidemiological studies related to HPV and PCa, a vast majority of them being case-control studies putting together over 4,700 PCa cases and 7,300 controls. No more than two of them [24,29] found an association between PCa and HPV 18 and 33, respectively, whereas the others did not

(see Table 5 for details). In our study population, HPV 18 antibodies were more common in men with BPH than in PCa patients. Such an inverse association has not been reported so far.

The seropositivity rates reported in our study were 5.0% and 2.5% in PCa patients for HPV 16 and 18, respectively, and 9.9% for both antigens in the BPH group (Table 4). This coincides well with the estimated 10.2% HPV 16 seroprevalence in the US male population aged 50-59 years [35].

HPV 6 is associated with benign skin lesions of the genitourinary tract. This genotype was demonstrated in up to 90% of genital warts [36]. To our knowledge, no previous study investigated the association of HPV 6/11 and PCa nor suggested the virus' potential to induce a more malignant phenotype of PCa cells. However, these two serotypes have been associated with malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis [37]. Our finding of a higher mean GS, i.e. increased aggressiveness of the prostate tumour in the presence of HPV 6 antibodies, would require further validation.

Infection with certain herpesviruses has been associated with several human cancers. A link has been found between HSV 1 and oral cancer, while HSV 2 seems to be a cofactor to HPV in the etiology of invasive cervical

**Table 5 Overview of previously published case-control serologic studies of genitourinary pathogens with regard to prostate cancer risk**

Author	Year	Pathogen studied	No. of subjects with PCa	% sero-positive	No. of controls without PCa	% sero-positive	RR/OR	95% CI	Evidence of association	Method
Sutcliffe [30]	2010	HPV 16	616	14.5	616	13.7	OR 1.07	0.77-1.48	no	ELISA
		HPV 18	616	3.3	616	3.7	OR 0.87	0.47-1.63	no	
		HPV 31	616	12.3	616	10.8	OR 1.15	0.8-1.64	no	
Dennis [27]	2009	HPV 16/18	267	18.7	267	16.9	OR 1.13	0.73-1.75	no	ELISA
Huang [26]	2008	HPV 16	765	10.1	915	10.6	OR 0.9	0.7-1.3	no	ELISA
		HPV 18	765	9.4	915	8.1	OR 1.2	0.8-1.7	no	
Sitas [9]	2007	HPV 16	205	68.0	673	58.0	OR 1.33	0.86-2.07	no	ELISA
Sutcliffe [28]	2007	HPV 16	691	7.5	691	8.8	OR 0.83	0.57-1.23	no	ELISA
		HPV 18	691	6.1	691	5.8	OR 1.04	0.66-1.64	no	
		HPV 33	691	7.2	691	6.4	OR 1.14	0.76-1.72	no	
Korodi [8]	2005	HPV 16	799	6.0	2596	6.0	OR 0.9	0.64-1.26	no	ELISA
		HPV 18	799	3.0	2595	4.0	OR 0.79	0.49-1.26	no	
		HPV 33	800	9.0	2596	7.0	OR 0.99	0.72-1.38	no	
Adami [29]	2003	HPV 16	238	13.0	210	15.0	OR 0.7	0.4-1.3	no	ELISA
		HPV 18	238	12.0	210	12.0	OR 0.9	0.5-1.9	no	
		HPV 33	238	29.0	210	23.0	OR 1.6	1.0-2.7	yes	
Rosenblatt [32]	2003	HPV 16	642	9.2	570	8.8	OR 1.06	0.71-1.57	no	ELISA
		HPV 18	642	3.4	570	2.5	OR 1.36	0.69-2.69	no	
Hayes [31]	2000	HPV 16	276	6.9	295	5.1	OR 1.4	0.7-2.8	no	ELISA
Hisada [6]	2000	HPV 16	48	42.0	63	30.0	OR 2.7	0.9-7.9	no	ELISA
Dillner [23]	1998	HPV 16	165	4.0	290	2.0	RR 2.4	0.75-7.58	no	ELISA
		HPV 18	165	10.0	290	4.0	RR 2.6	1.17-5.75	yes	
		HPV 33	164	4.0	289	6.0	RR 0.7	0.26-1.66	no	
Strickler [5]	1998	HPV 16	63	1.6	144	4.9	NS	NS	no	ELISA
Dennis [26]	2009	Ch. trachomatis	267	14.6	267	11.6	OR 1.35	0.79-2.31	no	Microimmuno-fluorescence
Huang [25]	2008	Ch. trachomatis	765	11.2	915	9.7	OR 1.2	0.9-1.6	no	ELISA
Sutcliffe [27]	2007	Ch. trachomatis	691	4.0	691	3.5	OR 1.13	0.65-1.96	no	ELISA

**Table 5 Overview of previously published case-control serologic studies of genitourinary pathogens with regard to prostate cancer risk (Continued)**

Antilla [7]	2005	Ch. trachomatis	738	7.5	2271	10.5	OR 0.69	0.51-0.94	yes*	Microimmuno-fluorescence
Dillner [24]	1998	Ch. trachomatis	165	10.9	290	10.7	RR 1.04	0.54-2.00	no	Microimmuno-fluorescence
Hayes [31]	2000	T. pallidum	271	10.7	286	6.3	OR 1.8	1.0-3.5	yes	Microhemagglutination assay (MHA-TP)
Dennis [27]	2009	HSV 2	267	28.5	267	20.6	OR 1.6	1.05-2.44	yes	ELISA
Huang [26]	2008	HSV 2	765	9.2	915	9.7	OR 0.9	0.7-1.3	no	enzymatic immunodot assay
Korodi [25]	2005	HSV 2	163	7.2	288	7.5	OR 0.93	0.44-1.96	no	ELISA
Baker [4]	1981	HSV 2	50	68.0	159	51.0	NS	NS	yes	indirect hemagglutination inhibition test
Herbert [3]	1976	HSV 2	28	71.4	29	65.5	NS	NS	no	microcomplement fixation test
Huang [26]	2008	CMV	765	70.3	915	68.4	OR 1.1	0.9-1.3	no	ELISA

OR odds ratio, RR relative risk, CI confidence interval, HPV human papillomavirus, HSV herpes simplex virus, CMV human cytomegalovirus, ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay, NS not specified, \* inverse association.

cancer [38]. Sexual transmission of HSV 1 and 2 leading to infection of the genitourinary tract is a commonplace. HSV 2 is seldom completely cleared from the body. Antibody levels may fluctuate over time, especially after clinical relapses, but the exact dynamics is not known [27]. In the U.S., 51.0% of persons over 12 years were seropositive for HSV 1, 5.3% for HSV 2 and in 16.6%, antibodies specific to both virus types were present [39]. The HSV 2 prevalence is highest in some African countries, reaching 80% in persons  $\geq 35$  years [40].

Sexual contact is a major route of CMV transmission in adults. Increased CMV rates are associated with increased history of sexually transmitted diseases. Recent data indicate that CMV has multiple oncogenic properties: it promotes mutagenesis, angiogenesis and cell invasion [41]. The CMV seroprevalence increases with age, reaching approximately 91% among persons older than 80 years [42]. Little is known about the relationship between CMV and PCa risk. The only relevant study we have identified did not show evidence of an association of CMV seropositivity and PCa incidence [26]. Our data suggest that PC cases have lower antibody levels against CMV than BPH patients.

*C. trachomatis* is one of the most common bacterial STDs worldwide. It causes urethritis, epididymitis and prostatitis in males. In up to 50% of infected men and 70-80% of infected women, the infection is clinically inapparent [43]. In four recent epidemiological studies of several hundred cases and controls each [24,26-28], no association between chlamydial antibodies and PCa was found. One large study [7], however, shows a

significant inverse association (OR 0.69, 95% CI 0.51-0.94) between chlamydial antibodies and PCa and so do our data. The seroprevalence we have established is concordant with the data reported previously [44].

The increased antibody prevalence and higher serum antibody levels we are reporting do not suggest the role of infection in PCa pathogenesis. They do indirectly support a concept of BPH being product of immune inflammatory processes, an idea based on a growing amount of evidence [45]. The trigger point for an increased and possibly self-repeating, pathological immune response would be infection of the genitourinary tract by these pathogens [46].

A study of Takeyama suggested that *M. hominis* can trigger inflammation in the prostate by inducing interleukin-8 secretion [47]. Chronic infection by *M. genitalium* and *M. hyorhina* of human prostate cells resulted in alteration of karyotypes (notably increased polysomy) and malignant transformation in vitro. Inoculated in nude mice, these cell lines initiated tumour growth [48]. We have not identified any study concerned with the clinical association between PCa and *Mycoplasma* and/or *Ureaplasma*. To our knowledge, we are the first to report an increased seroprevalence of *U. urealyticum* antibodies in PCa patients compared to men with BPH.

Gonorrhoea and syphilis are historically most notorious STD's. In a large prospective cohort study of Sutcliffe et al., gonorrhoea and syphilis were self-reported in 3% and 0.2%, respectively, and no relationship with PCa was observed [49]. Self-report of gonorrhoea and/or syphilis was associated with PCa (OR 1.6, 95% CI 1.2-2.1) in a

study of Hayes et al. Of note, however, serologic evidence of *T. pallidum* infection was found in 9.9% vs. 2% reported (in the black population) and 3.2% vs. 0.1% reported (in whites) [31]. This fact illustrates how unreliable questionnaire and interview-based studies can be whether for recall bias, unwillingness to report a socially embarrassing disease such as STD or just by ignorance, i. e. failing to classify a condition as STD.

Our seroprevalence data for *T. pallidum* and *N. gonorrhoeae* are comparable for PCa and BPH patients. However, the statistical power is low due to the small number of patients to draw any reasonable conclusions.

Every research paper has its limitations and so does ours. Because blood samples were drawn after the diagnosis of PCa, we cannot state whether contact with the pathogen preceded or followed the evolution of cancer. Taking BPH patients as controls brings the risk of not coming to a meaningful conclusion if both conditions had the same (shared) etiology. On the other hand, virtually no healthy prostates exist in the age group our patients belong to.

## Conclusions

This is the first study to our knowledge to demonstrate a higher *U. urealyticum* seroprevalence rate in PCa patients when compared to BPH controls. HPV 18 and *C. trachomatis* seropositivity was more common and the mean CMV antibody levels were higher in the control (BPH) group than among PCa cases. Unlike other research groups, we used open surgery-derived specimens exclusively for all analyses. This allowed us 1) to minimise the likelihood of misclassifying a tissue sample as benign if cancer was present and 2) to look for a correlation of PCa and infection in subgroups of patients depending on local disease stage. This novel type of analysis did not demonstrate any differences.

Disregarding inconsistencies of results of the previous studies, this one adds to the growing body of evidence that the presence or higher levels of serum antibodies to most of the genitourinary pathogens studied are not associated with an elevated PCa risk and/or a more malignant tumour behavior. Antibody seropositivity to these infectious agents does not emerge as a risk factor in screening or treatment decision making. Tissue analyses focused on viral or bacterial DNA presence could be a track to run to cast light onto possible association between PCa and infectious agents.

## Acknowledgements

The study was funded by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, grant no. NS9984.

## Author details

<sup>1</sup>Charles University in Prague, 3rd Faculty of Medicine, Department of Urology, Prague, Czech Republic. <sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>Charles University in Prague, 3rd Faculty of Medicine, Department of Pathology, Prague, Czech Republic. <sup>4</sup>Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Department of Nonlinear Modelling, Prague, Czech Republic. <sup>5</sup>Androgeos, Prague, Czech Republic.

## Authors' contributions

JHr participated in the study design, recruited the patients, reviewed the literature and drafted the manuscript. JHe and MU conceived the study design, recruited the patients and reviewed the whole manuscript. MU performed most of the surgeries. EH and RT carried out the immunoassays and wrote the appropriate part of the Methods section. VE carried out the histopathological examinations. MB performed the statistical analyses and covered that part in the text. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Authors' information

JHr is a PhD student of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague; this work represents a part of his thesis. JHe is a research fellow at the same institution. EH is the head of the Laboratory for Prevention of Viral Infections, Institute of Hematology and Blood Transfusion. MU is the head of the Department of Urology of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 October 2010 Accepted: 3 February 2011

Published: 3 February 2011

## References

1. Marberger M: Prostate cancer 2008: Challenges in diagnosis and management. *Eur Urol Suppl* 2009, **3**:89-96.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010, **60**:277-300.
3. Herbert JT, Birkhoff JD, Feorino PM, Caldwell GG: Herpes simplex virus type 2 and cancer of the prostate. *J Urol* 1976, **116**:611-612.
4. Baker LH, Mebust WK, Chin TDY, Chapman AL, Hinthorn D, Towle D: The relationship of herpesvirus to carcinoma of the prostate. *J Urol* 1981, **125**:370-374.
5. Strickler HD, Burk R, Shah K, Viscidi R, Jackson A, Pizzi G, Bertoni F, Schiller JT, Manns A, Metcalf R, Qu W, Goedert JJ: A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma. *Cancer* 1998, **82**(6):1118-1125.
6. Hisada M, Rabkin CS, Strickler HD, Wright WE, Christianson RE, van den Berg BJ: Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000, **3**:340-341.
7. Anttila T, Tenkanen L, Lumme S, Leinonen M, Gislefoss RE, Hallmans G, Thoresen S, Hakulinen T, Luostarinen T, Stattin P, Saikku P, Dillner J, Lehtinen M, Hakama M: Chlamydial antibodies and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(2):385-389.
8. Korodi Z, Dillner J, Jellum E, Lumme S, Hallmans G, Thoresen S, Hakulinen T, Stattin P, Luostarinen T, Lehtinen M, Hakama M: Human papillomavirus 16, 18, and 33 infections and risk of prostate cancer: a Nordic nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(12):2952-2955.
9. Sitas F, Urban M, Stein L, Beral V, Ruff P, Hale M, Patel M, O'Connell D, Yu XQ, Verzijden A, Marais D, Williamson AL: The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infectious Agents and Cancer* 2007, **2**:6.
10. Reiner WG, Walsh PC: An anatomical approach to the surgical management of the dorsal vein and Santorini's plexus during radical retropubic surgery. *J Urol* 1979, **121**:198-200.
11. Walsh PC: Anatomic radical prostatectomy. Evolution of the surgical technique. *J Urol* 1998, **160**:2418-2424.
12. Fuller E: Six successful and successive cases of prostatectomy. *J Cutan Genitourin Dis* 1895, **13**:229-239.

13. Culp DA: **Benign prostatic hyperplasia: early recognition and management.** *Urol Clin North Am* 1975, **2**:29-48.
14. Montironi R, van der Kwast T, Boccon-Gibod L, Bono AV, Boccon-Gibod L: **Handling and pathology reporting of radical prostatectomy specimens.** *Eur Urol* 2003, **44**:626-636.
15. Rosai J: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* Edinburgh: Mosby; 2004.
16. Eble JN, Kauter G, Epstein JI, Sesterhenn I: **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs (IARC/World Health Organization Classification of Tumours).** Lyon, France: IARC Press; 2003.
17. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL: **ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 2005, **29**(9):1228-1242.
18. Sobin LH, Wittekind CH: *TNM Classification of Malignant Tumours.* 6 edition. Wiley; 2002.
19. Srigley JR, Amin MB, Epstein JI, Grignon DJ, Humphrey PH, Renshaw AA, Wheeler TM: **Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the prostate gland.** *Arch Pathol Lab Med* 2006, **130**(7):936-946.
20. Hamsikova E, Smahel M, Sapp M, Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Vonka V: **Correlation between the presence of anti HPV33 VLP antibodies and HPV DNA in cervical neoplasia patients.** *Arch Virol* 1997, **142**(2):413-416.
21. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP: **The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies.** *J Clin Epi* 2008, **61**:344-349.
22. Kirby RS, Patel MI: *Fast facts: Prostate cancer* Oxford: Health Press Limited; 2009.
23. Amo FH, Cordero JMD, Tartajo FV, Hernandez FL, Carrillo AB, Burgos JG, Rios DS: **Cáncer incidental de próstata.** *Actas Urol Esp* 1999, **23**(10):848-852.
24. Dillner J, Knekt P, Boman J, Lehtinen M, Geijerstam VA, Sapp M, Schiller J, Maatela J, Aromaa A: **Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer.** *Int J Cancer* 1998, **75**:564-567.
25. Korodi Z, Wang X, Tedeschi R, Knekt P, Dillner J: **No serological evidence of association between prostate cancer and infection with herpes simplex virus type 2 or human herpesvirus type 8: a nested case-control study.** *J Inf Dis* 2005, **191**:2008-2011.
26. Huang WY, Hayes R, Pfeiffer R, Viscidi RP, Lee FK, Wang YF, Reding D, Whitby D, Papp JR, Rabkin CS: **Sexually Transmissible Infections and Prostate Cancer Risk.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, **17**(9):2374-2381.
27. Dennis KL, Coughlin JA, McKinnon BC, Wells TS, Gaydos CA, Hamsikova E, Gray GC: **Sexually transmitted infections and prostate cancer among men in the U.S. Military.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(10):2665-2671.
28. Sutcliffe S, Giovannucci E, Gaydos CA, Viscidi RP, Jenkins FJ, Zenilman JN, Jacobson LP, De Marzo AM, Willett WC, Platz EA: **Serum antibodies against Chlamydia trachomatis, human papillomavirus, and human herpesvirus type 8 in relation to prostate cancer: a prospective study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**(8):1573-1580.
29. Adami HO, Kuper H, Andersson SO, Bergström R, Dillner J: **Prostate Cancer Risk and Serologic Evidence of Human Papilloma Virus Infection: A Population-based Case-Control Study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12**:872-875.
30. Sutcliffe S, Viscidi RP, Till C, Goodman PJ, Hoque AM, Hsing AW, Thompson IM, Zenilman JM, De Marzo AM, Platz EA: **Human papillomavirus types 16, 18 and 31 serostatus and prostate cancer risk in the prostate cancer prevention trial.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**(2):614-618.
31. Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, Rabkin C, Pope V, Swanson GM, Greenberg RS, Schönberg JB, Liff J, Schwartz AG, Hoover RN, Fraumeni JF Jr: **Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer.** *Br J Cancer* 2000, **82**(3):718-725.
32. Rosenblatt KA, Carter JJ, Iwasaki LM, Galloway DA, Stanford JL: **Serologic evidence of human papillomavirus 16 and 18 infections and risk of prostate cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12**:763-768.
33. Ravich A, Ravich RA: **Prophylaxis of cancer of the prostate, penis, and cervix by circumcision.** *NY State J Med* 1950, **50**:1519-1520.
34. Taylor ML, Mainous AG, Wells BJ: **Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis.** *Fam Med* 2005, **37**(7):506-512.
35. Stone KM, Karem KL, Sternberg MR, Mc Quillan GM, Poon AD, Unger ER, Reeves WC: **Seroprevalence of Human Papillomavirus Type 16 Infection in the United States.** *J Infect Dis* 2002, **186**:1396-1402.
36. Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kjaer SK, Munoz N, Schiffman M, Bosch FX: **Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions.** *Vaccine* 2008, **26**(Suppl 10):K17-K28.
37. Jeong WJ, Park SW, Shin M, Lee YJ, Jeon YK, Jung YH, Hah JH, Kwon TK, Song YS, Kim KH, Sung MW: **Presence of HPV type 6 in dysplasia and carcinoma arising from recurrent respiratory papillomatosis.** *Head Neck* 2009, **31**(8):1095-1101.
38. González AB, Urban MI, Sitas F, Blackburn N, Hale M, Patel M, Ruff P, Sur R, Newton R, Beral V: **Antibodies against six human herpesviruses in relation to seven cancers in black South Africans: A case control study.** *Infectious Agents and Cancer* 2006, **1**:2 [http://www.infectagentscancer.com/content/1/1/2].
39. Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, Johnson RE, Lee FK, Nahmias AJ, Markowitz LE: **Seroprevalence and Coinfection with Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in the United States, 1988- 1994.** *J Infect Dis* 2002, **185**:1019-1024.
40. Smith JS, Robinson NJ: **Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review.** *J Infect Dis* 2002, **186**(Suppl 1):S3-28.
41. Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS: **High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma.** *J Urol* 2003, **170**:998-1002.
42. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ: **Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988- 1994.** *Clin Inf Dis* 2006, **43**:1143-1151.
43. Wagenlehner FME, Weidner W, Naber KG: **Chlamydial infections in urology.** *World J Urol* 2006, **24**:4-12.
44. Stamm WE: **Chlamydia trachomatis Infections: Progress and Problems.** *J Inf Dis* 1999, **179**(Suppl 2):S380-383.
45. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M: **Is Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) an Immune Inflammatory Disease?** *Eur Urol* 2007, **51**:1202-1216.
46. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG: **Prostate carcinogenesis and inflammation: Emerging insights.** *Carcinogenesis* 2004, **26**:1170-1181.
47. Takeyama K, Mitsuzawa H, Shimizu T, Konishi M, Nishitani C, Sano H, Kunishima Y, Matsukawa M, Takahashi S, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y: **Prostate cell lines secrete IL-8 in response to Mycoplasma hominis through toll-like receptor 2-mediated mechanism.** *Prostate* 2006, **66**:386-391.
48. Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, Allan RW, Iczkowski KA, Urbanek C, Reyes L, Sakamoto N, Rosser CJ: **Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells.** *PLoS ONE* 2009, **4**(9):e6872.
49. Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo AM, Leitzmann MF, Willett WC, Platz EA: **Gonorrhea, Syphilis, Clinical Prostatitis, and the Risk of Prostate Cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, **15**(11):2160-2166.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/53/prepub>

doi:10.1186/1471-2407-11-53

**Cite this article as:** Hrbacek et al.: Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer* 2011 **11**:53.

---

# HPV Persistence and Its Oncogenic Role in Prostate Tumors

---

Ruth Tachezy,<sup>1\*</sup> Jan Hrbacek,<sup>2</sup> Jiri Heracek,<sup>3</sup> Martina Salakova,<sup>1</sup> Jana Smahelova,<sup>1</sup> Viera Ludvikova,<sup>1</sup> Alexandr Svec,<sup>4</sup> Michael Urban,<sup>3</sup> and Eva Hamsikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Virology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Second Faculty of Medicine, Department of Urology, Motol University Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Third Faculty of Medicine, Department of Urology, Kralovske Vinohrady University Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Cellular Pathology, James Cook Hospital, Middlesbrough, UK

---

HPV has carcinogenic effects at several anatomical sites in women and men. Whether the presence of HPV in the genitourinary tract of men is associated with a higher prostate cancer risk has been a matter of research for a long-time and the results are still not fully conclusive. Similarly, the question of the reservoir of HPV infection in men is not clearly resolved. HPV DNA presence and types were evaluated by means of polymerase chain reaction in the tissue of 146 patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. HPV-specific antibodies were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay in the sera of all patients and 172 controls. In addition, 256 biopsies taken from non-tumorous tissues were analyzed. No statistically significant differences were observed in HPV DNA prevalence between patients with benign prostate hyperplasia (2%) and patients with prostatic cancer (2%;  $P = 1.000$ ). The seropositivity rates did not differ significantly between groups of subjects except for antibodies against HPV 6 VLPs which were found more often in prostate cancer patients (adjusted  $P = 0.018$ ). Similarly, no difference in the seroprevalence rates for HPV 16 E6 and/or E7 oncoproteins between groups of patients and healthy controls was detected. The overall HPV prevalence in 256 healthy tissue samples was 4%. The results indicate that HPV infection is not associated with prostate oncogenesis in men. However, they imply that multiple tissues of the male genitourinary tract may be important reservoirs for the transmission of some HPV types. **J. Med. Virol.** 84: 1636–1645, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** DNA; antibodies; PCR; prostate cancer; men; reservoir

---

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer of men with more than 900,000 new cases and about 250,000 deaths every year worldwide. In the industrialized countries where the majority of cases are reported, prostate cancer is one of the most important health issues in the aging male population [Ferlay et al., 2010].

Human papillomaviruses (HPVs) have been established as etiological agents of invasive cervical cancer

---

Grant sponsor: Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic; Grant numbers: NS10656-3, NS9984.

Competing interests: The authors have read the journal's policy and R.T. has the following conflicts: membership in the Czech GSK advisory board for the prevention of cervical carcinoma. J.Hr., J.He., M.S., J.S., V.L., A.S., M.U., and E.H. have declared that no competing interests exist.

Authors' contributions: Conceived and designed the experiments: R.T., M.U., and A.S. Performed the experiments: M.S., J.S., and V.L. Analyzed the data: R.T., J.Hr., J.He., A.S., and E.H. Contributed reagents/materials/analysis tools: R.T., J.Hr., J.He., M.U., and E.H. Wrote the paper: R.T., J.Hr., J.He., A.S., and E.H.

\*Correspondence to: Ruth Tachezy, PhD, Department of Experimental Virology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic. E-mail: rutach@uhkt.cz

Accepted 18 June 2012

DOI 10.1002/jmv.23367

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

[zur Hausen, 1996; Walboomers et al., 1999] and currently they are the most common viral sexually transmitted infection worldwide. Besides cancer of cervix uteri, HPV has carcinogenic effect at several other anatomical sites in women and men [Gillison and Shah, 2003]. The highest HPV prevalence in healthy women is seen at the age of <25 and rapidly decreases with age [Bruni et al., 2010]. The HPV prevalence studies in men are scarce and vary widely in the anatomic sites sampled, population studied and analytical methods used for HPV detection. A recently published large-scale study on healthy men revealed a 50% HPV prevalence independent of age [Giuliano et al., 2011]. HPV is detected most frequently on the penile shaft, followed by the glans penis/coronal sulcus and scrotum while in the urethra and urine, its prevalence is lower [Giuliano et al., 2007]. On the basis of HPV DNA PCR findings, it was suggested that the genitourinary tract of men, including sperm cells, might act as reservoir for HPV persistence and infection [Rotola et al., 1992; Lai et al., 1996; Rintala et al., 2002; Svec et al., 2003] but its exact localization has not been conclusively established yet [Veldhuijzen et al., 2010]. Persistent infection with high-risk (HR) HPVs is necessary for the development of premalignant lesions and/or progression of the disease [Ho et al., 1995]. Whether the presence of HPV in the genitourinary tract is associated with a higher prostate cancer risk has been a matter of research for the past 20 years. Both serological and tissue-based studies were undertaken in order to elucidate possible differences between cancer patients and controls in the presence of HPV antibodies or HPV DNA. Concerning seroepidemiological studies, investigating the possible relationship of prostate cancer and the presence of antibodies to different types of HPV, except for isolated findings of Dillner et al. [1998] and Adami et al. [2003] who revealed correlation of seropositivity with increased prostate cancer risk, no causal link has been demonstrated. The results of studies on the presence of HPV DNA in prostate tissue detected by PCR and hybridization methods were inconclusive, but only few of them claimed a statistically significant difference in HPV detection between patients with prostatic cancer and controls [Anwar et al., 1992; Serth et al., 1999; Leiros et al., 2005; Martinez-Fierro et al., 2010]. In prostate cancer-related studies, HPV 16 and HPV 18 were the most commonly detected HPV types, which might be due to the fact that these are looked for in the first place. However, enlarging the pool of HPV types to search for usually did not increase HPV detection yields [Noda et al., 1998; Leskinen et al., 2003; Gazzaz and Mosli, 2009; Silvestre et al., 2009; Martinez-Fierro et al., 2010].

The objective of this study was to look for an association between HPV infection (the presence of antibodies against various HPV-derived antigens and/or the presence of HPV DNA in tissue sections) and prostate cancer risk. Furthermore, a common reservoir of HPV was sought within the genitourinary tract using

biopsies from different locations of the genitourinary system obtained from study subjects during open surgical procedures.

## METHODS

### Patients

The subjects enrolled in study were recruited among patients treated in the Department of Urology, Kralovske Vinohrady University Hospital, Prague between 2000 and 2010. A total of 146 patients who signed an informed consent approved by the Ethical Committee of the 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague were included in the study. In the benign prostate hyperplasia (BPH) group (mean age 70 years, range 51–84), 11 patients underwent open simple prostatectomy and 84 patients were treated by endoscopic transurethral resection of prostate. Seventy percent of the patients had a prostate-specific antigen (PSA) level below 4.0 ng/ml (mean PSA value 3.85 ng/ml). All of 51 patients with prostatic cancer (mean age 63 years, range 50–73) underwent open radical retropubic prostatectomy. The mean PSA level was 10.4 ng/ml and, in contrast to the group with benign prostate hyperplasia, only one-tenth of patients had a PSA level below 4.0 ng/ml. Two-thirds of the lesions were organ confined while one-third of the patients had a locally advanced disease. Eighty percent of the tumors were low-grade lesions (Gleason score (GS) of 7 or less) and 20% were poorly differentiated tumors with a more aggressive biological behavior. In addition, biopsies from several other sites of the genitourinary tract of 74 patients were taken during open surgery to search for the HPV reservoir.

A pathologist experienced in urogenital pathology performed histopathological examinations. All results were assessed according to the 7th revision of the TNM classification, 2010 [In Edge et al., 2010a,b].

Data regarding demographics, risk factors for genitourinary tumors, and risks related to HPV exposure were assessed by a patient questionnaire. A medical report was completed for each patient at enrolment. Out of 146 subjects, 8 (6%) refused to fill in the questionnaire.

### Urethral Smears

The urethral smears were taken at the day of surgery with sterile Cytobrush inserted into a sterile tube with 2 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8.0; 1% Tween 20), stored at +4°C for up to 5 days before transport to the laboratory where samples were kept at -20°C until further processed. DNA extraction was performed with the QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The extracted DNA was concentrated to 20 µl. HPV DNA presence was evaluated in urethral smears of 95 patients with benign prostate hyperplasia and 51 patients with prostatic cancer. In 10% (14/146) of urethral swabs, the amplification was unsuccessful.

## Tissue Specimens

Resection specimens removed in accordance with usual surgical practice for the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma and excisional biopsies of healthy tissue were submitted for histological assessment. The specimens were fixed in 10% buffered formalin and cut up after 24-hr fixation following a standard protocol. Tissue samples from the anatomical sites specified below were routinely processed and embedded in paraffin blocks. The first and the fourth histological sections were microscopically reviewed to confirm the diagnosis and verify an arbitrary 10% minimum of neoplastic tissue per section or the absence of pathological changes in healthy tissue. Only the samples meeting these criteria were included in the study. The second and the third 20  $\mu$ m sections were placed in a sterile microtube and referred for HPV DNA detection by PCR. Control paraffin blocks (blocks without tissue or with HPV-free tissue) were inserted after every fifth studied block to monitor for possible carryover contamination. The microtome knife, other tools, and the working area were cleaned with ethanol prior to cutting each paraffin block. DNA extraction from paraffin blocks was carried out as specified elsewhere [Greer et al., 1991]. Briefly, paraffin sections were extracted with xylene, the tissue was washed with absolute ethanol, and the cells were lysed by incubation in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8.0; 1% Tween 20 and 200 mg/ml proteinase K (Sigma, St Louis, MO)) at 55°C for 2 hr. Proteinase K was inactivated at 95°C for 10 min. Samples were stored at -20°C. After every ninth sample, one microtube that contained only lysis buffer was inserted and processed simultaneously with other samples to monitor for possible carryover contamination. Altogether, HPV DNA presence was evaluated in 210 samples of tissue from 95 patients with benign prostate hyperplasia and 90 samples of 51 patients with prostatic cancer. In addition, 256 biopsies taken from non-tumorous tissues of 74 patients were analyzed: 27 foreskin samples, 80 prostate samples, 29 urinary bladder samples, 77 seminal vesicle samples, 3 urethra samples, and 40 ductus deferens samples.

## Blood

Five milliliters of blood were drawn from each subject on the day of surgery. Serum was separated by centrifugation aliquoted, and stored at -20°C.

The presence of HPV-specific antibodies was evaluated in sera from 51 patients with prostatic cancer and 95 patients with benign prostate hyperplasia. As a control group, sera of 172 healthy male blood donors (mean age 59 years, range 43-88 years) were included.

## HPV DNA Detection and Typing

One microliter of DNA extracted from tumor tissue and/or urethral swabs of each sample was amplified

in a thermocycler (MJ Research, Waltham, MA). After amplification, 10  $\mu$ l of the PCR product was analyzed on a horizontal 3% agarose gel (NuSieve GTG 3:1 agarose, FMC BioProducts, Rockland, ME).

At first, the amplification of a control gene was performed. A 110-base pair (bp) fragment of the human beta-globin gene was amplified with primers PC 03 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3') and PC 04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'). Thirty microliters of the reaction mixture contained 1 $\times$  concentrated reaction buffer (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 4.0 mM magnesium chloride, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs; Fermentas), 10 nM of each primer (PC 03, PC 04; Invitrogen, Groningen, Netherlands), and 1.5 U Taq-polymerase (Fermentas). After initial denaturation at 95°C for 5 min, each of the 40 cycles consisted of denaturation at 95°C for 1 min, primer annealing at 55°C for 2 min, and chain elongation at 72°C for 2 min. At the end, incubation at 72°C for 3 min was performed. Positive beta-globin amplification proved that the sample contained a sufficient amount of DNA and that no PCR inhibitors were present.

HPV DNA presence and genotyping in urethral swabs were determined using reverse line blot hybridization (RLB) [van den Brule et al., 2002]. This method permits the detection and genotyping of 37 HPV types in a single assay. HPV amplification was performed in a PTC 200 PCR thermocycler (MJ Research, Inc.) with GP5+ and 5'-end biotin-labeled GP6+ primers, which amplify a 150 bp fragment of the L1 gene. PCR was performed for 40 cycles. The biotinylated PCR product was hybridized with HPV type-specific oligonucleotide probes labeled with an amino-group at the 5'-end and covalently linked to an activated negatively charged Biotin C membrane. After washing, the membrane was incubated at 42°C for 60 min with peroxidase-labeled streptavidin conjugate. For chemiluminescent detection of hybridizing DNA, the membrane was incubated in ECL detection liquid (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and exposed to LumiFilm (Roche, Indianapolis, IN) for 5 min. Detection of HPV DNA extracted from paraffin embedded tissue was performed by means of nested PCR with degenerate primers MY 09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') and MY 11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') [Manos et al., 1989], which amplify a 450-bp fragment in the L1 gene (CP-PCR L1), and nested general primers GP5+ (5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3') and GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAATCATATTC-3') [de Roda Husman et al., 1995], which amplify a 150-bp fragment. Fifty microliters of the reaction mixture contained 1 $\times$  concentrated reaction buffer (Fermentas), 4 mM magnesium chloride, 0.2 mM dNTPs (Fermentas), 100 nM of each of the primers (MY 09 and MY 11; Invitrogen), and 1.25 U Taq-polymerase (Fermentas). After initial denaturation at 95°C for 5 min, each of the 30 cycles consisted of denaturation at 95°C for 1 min, primer annealing at 55°C for 2 min, and chain

elongation at 72°C for 2 min. The last cycle was followed by incubation at 72°C for 3 min. Three microliters of the PCR product of the first reaction was taken for the PCR with nested GP5+/6+ primers. Fifty microliters of the reaction mixture contained 1× concentrated reaction buffer (Fermentas), 3 mM magnesium chloride, 0.2 mM dNTPs (Fermentas), 1 mM of each of the primers (GP5+/GP6+; Invitrogen), and 1.25 U Taq-polymerase (Fermentas). Initial denaturation at 94°C for 4 min was followed by 40 cycles. Each of the cycles consisted of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 40°C for 2 min, and chain elongation at 72°C for 1.5 min. One cycle of chain elongation at 72°C for 4 min was performed at the end. Ten microliters of the PCR product was run on a 3% agarose gel (NuSieve 3:1 BMA, Rockland, ME), stained with ethidium bromide (Sigma), and visualized on the transilluminator (Ultraviolet Products, Inc, San Gabriel, Calif). As a positive PCR control, DNA isolated from SiHa cells was used and as a negative control, PCR mix without DNA was analyzed. As a negative control for possible carryover contamination, PCR on DNA extracted from the paraffin blocks with no tissue was performed.

Samples positive by nested (MY09/11, GP 5+/6+) PCR, as well as those which did not hybridize on RLB but revealed a clear band on an agarose gel, were subjected to DNA nucleotide sequencing to determine the exact HPV genotype. Forty microliters of the PCR product were extracted from a 2% agarose gel (NuSieve GTG agarose, BMA) with the use of the Lego kit (Top-Bio, Prague, Czech Republic) and sequenced with the ABI PRISM BigDye Terminator Primer Cycle Sequencing kit (PerkinElmer, Inc., Wellesley, MA). The analysis was performed on the automatic ABI PRISM 310 sequencing system (PerkinElmer).

### Serological Assays

The presence of IgG antibodies to antigens derived from HPV-specific proteins was tested using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The virus-specific antigens were L1 or L1/L2- assembled capsids (VLPs) prepared in recombinant baculovirus/insect cells system expressing capsid proteins of HPV types 6, 11, 16, 18, 31, and 33 and HPV16 E6 and E7 oncoproteins overexpressed in bacteria as fusion proteins containing glutathione-S-transferase (GST) at their N-terminus and C-terminal undecapeptide of the SV40 large T-antigen at their C-terminus as described [Parker et al., 2006].

Control sera known to be positive and negative were tested on each plate. The cut-off value was represented as the mean plus 2 standard deviations (SDs; VLP ELISA) or 3 SDs (E6/E7 ELISA) after eliminating outliers; the mean and SD values were calculated for each antigen separately. Before the calculation, the absorbance of control wells without antigen (anti-VLP) or GST alone (anti-E6/E7) was

subtracted. All samples that were 10% above the cut-off value were tested twice more; those positive in all three runs were considered positive. About 20% of specimens selected at random were retested to confirm the results. The optical density (OD) of each well was converted to the OD ratio by dividing it by the corresponding cut-off value. An OD ratio above 1 was defined as positive.

### Statistical Analysis

The chi-square test and Fisher's exact test were used to compare categorical variables and the *t*-test was used to compare mean values of continuous variables between groups. Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) and *P* values were calculated to estimate the magnitude of association between categorical variables. For testing OR, the multiple comparison tests were used. Multiple logistic regression was used to estimate the ORs of prostate cancer after adjusting for age as continuous variables. ORs and CIs for variables with zero cells were generated using the logit estimator where 0.5 is added as a correction to the zero cells. Backward conditional stepwise and ordinary logistic regression was used to determine the variables that had the strongest association with case control status. All tests were two-sided with a significance level of  $\alpha = 0.05$ . Statistics were generated using the GraphPad InStat 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) and SPSS statistics v.19 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

### Demographic Characteristics and Risk Factor Assessment

A total of 146 male subjects were enrolled in the study: 95 with benign prostate hyperplasia, and 51 with prostatic cancer (mean age 70 and 63, respectively). Potential risk factors for malignancy and for HPV infection were compared between men with benign prostate hyperplasia and patients with prostatic cancer. None of the risk factors assessed in patient-completed questionnaires: smoking, age at first intercourse, cryptorchidism, phimosis, a history of inflammatory disease of the urogenital tract, previous treatment with cytostatics and malignancy of the urogenital tract in family history, achieved statistical significance (Table I).

### Prevalence of HPV DNA in Tissue Samples

HPV DNA was evaluated in 210 samples from 95 patients with benign prostate hyperplasia, and 90 samples from 51 patients with prostatic cancer. Two of 95 (2%), and 1/51 (2%) of these patients, respectively, were HPV DNA positive (Table I). The type-specific presence of HPV in the tissue was compared with the type of HPV present in the penile smear (see Materials and Methods Section). In the tissue of one patient with prostatic cancer, HPV 42 was detected, while

TABLE I. Demographic Characteristics and Risk Factors for Prostate Cancer

Study subjects	Men with benign prostate cancer (controls)		Prostate cancer patients versus men with benign prostate cancer	<i>P</i> -value
	N = 95	N = 51	OR (95% CI)	
Characteristics and risk factors				
Tobacco				
No	34 (39%)	27 (53%)	1.0	0.155
Yes	53 (61%)	24 (47%)	0.6 (0.3–1.1)	
Age at first sexual intercourse				
<17 years	10 (13%)	5 (11%)	1.0	1.000
≥17 years	69 (87%)	41 (89%)	0.8 (0.3–2.6)	
Cryptorchidism				
No	79 (99%)	50 (100%)	1.0	1.000
Yes	1 (1%)	0	0.5 (0.02–13.1)	
Phimosis				
No	75 (94%)	48 (94%)	1.0	1.000
Yes	5 (6%)	3 (6%)	0.9 (0.2–4.1)	
A history of inflammatory diseases <sup>a</sup>				
No	82 (98%)	47 (92%)	1.0	0.199
Yes	2 (2%)	4 (8%)	3.5 (0.6–19.8)	
Malignancy in family history <sup>a</sup>				
No	74 (93%)	46 (90%)	1.0	0.750
Yes	6 (8%)	5 (10%)	1.3 (0.4–4.6)	
Previous treatment with cytostatics				
No	81 (99%)	49 (98%)	1.0	1.000
Yes	1 (1%)	1 (2%)	1.7 (0.1–27.1)	
HPV DNA in urethral smear				
Negative	59 (64%)	33 (83%)	1.0	0.040
Positive	33 (36%)	7 (18%)	0.5 (0.2–1.0)	
HPV DNA in tissue sample				
Negative	93 (98%)	47 (98%)	1.0	1.000
Positive	2 (2%)	1 (2%)	1.0 (0.1–11.2)	
HPV 16 E6 and/or E7 antibodies				
Negative	84 (88%)	50 (98%)	1.0	0.057
Positive	11 (12%)	1 (2%)	0.2 (0.02–1.2)	
HPV 6/11 VLP				
Negative	66 (70%)	40 (78%)	1.0	0.331
Positive	29 (31%)	11 (22%)	0.6 (0.3–1.4)	
HPV 16 VLP				
Negative	82 (86%)	47 (92%)	1.0	0.419
Positive	13 (14%)	4 (8%)	0.5 (0.2–1.7)	
Any HR HPV VLP				
Negative	67 (71%)	37 (73%)	1.0	0.850
Positive	28 (30%)	14 (28%)	0.9 (0.4–1.9)	

VLP, virus-like particles; OR, odds ratio; CI, confidence interval; *P*, probability.

<sup>a</sup>Of the urogenital tract.

HPV 39 was found in his penile smear; HPV 16 and one unknown HPV type were present in the tissue of two patients with benign prostatic hyperplasia, with penile smears of these patients remaining HPV negative.

#### Prevalence of HPV DNA in Urethral Smears

The amplification was unsuccessful in 10% (14/146) of penile smears. The HPV prevalence rates were 36%

(33/92) in patients with benign prostate hyperplasia and 18% (7/40) in patients with prostatic cancer (Table I). Altogether 17 different HPV types were detected in penile smears. The most prevalent was HPV 16 present in 53% (21/40) of samples, followed by HPV 56 in 13% (5/40), and HPV 18 and 35 in 8% (3/40) of samples. In 23% (9/40) of HPV-positive samples, multiple infections were detected. The difference in HPV DNA prevalence in urethral smears between controls with benign prostate hyperplasia and

TABLE II. Serological Markers of HPV Infection in Healthy Controls and Patients with Benign Prostate Hyperplasia and Prostatic Cancer

Study subjects	Controls		Men with benign prostate hyperplasia		Prostate cancer patients	
	N (%)	N (%)	Adjusted OR <sup>a</sup> (95% CI)	N (%)	Adjusted OR <sup>a</sup> (95% CI)	
HPV 6 VLP						
Negative	120 (70%)	73 (77%)	1.0	44 (86%)	1.0	
Positive	52 (30%)	22 (23%)	0.63 (0.31–1.27) <i>P</i> = 0.198	7 (14%)	0.35 (0.14–0.84) <i>P</i> = 0.018	
HPV 11 VLP						
Negative	143 (83%)	79 (83%)	1.0	43 (84%)	1.0	
Positive	29 (17%)	16 (17%)	1.23 (0.55–2.71) <i>P</i> = 0.620	8 (16%)	0.93 (0.39–2.21) <i>P</i> = 0.871	
Any LR HPV VLP						
Negative	113 (66%)	66 (70%)	1.0	40 (78%)	1.0	
Positive	59 (34%)	29 (31%)	0.84 (0.44–1.63) <i>P</i> = 0.661	11 (22%)	0.52 (0.24–1.09) <i>P</i> = 0.083	
HPV 16 VLP						
Negative	156 (91%)	82 (86%)	1.0	47 (92%)	1.0	
Positive	16 (9%)	13 (14%)	1.38 (0.49–3.85) <i>P</i> = 0.537	4 (8%)	0.89 (0.28–2.84) <i>P</i> = 0.842	
HPV 18 VLP						
Negative	159 (92%)	91 (96%)	1.0	48 (94%)	1.0	
Positive	13 (8%)	4 (4%)	0.92 (0.25–3.34) <i>P</i> = 0.893	3 (6%)	0.86 (0.23–3.17) <i>P</i> = 0.816	
HPV 31 VLP						
Negative	152 (88%)	85 (90%)	1.0	47 (92%)	1.0	
Positive	20 (12%)	10 (11%)	1.20 (0.47–3.06) <i>P</i> = 0.707	4 (8%)	0.68 (0.22–2.11) <i>P</i> = 0.681	
HPV 33 VLP						
Negative	160 (93%)	85 (89%)	1.0	45 (88%)	1.0	
Positive	12 (7%)	10 (11%)	2.27 (0.76–6.77) <i>P</i> = 0.144	6 (12%)	1.89 (0.66–5.40) <i>P</i> = 0.238	
Any HR HPV VLP						
Negative	135 (78%)	67 (71%)	1.0	37 (73%)	1.0	
Positive	37 (22%)	28 (30%)	1.96 (0.97–3.96) <i>P</i> = 0.058	14 (28%)	1.44 (0.69–2.97) <i>P</i> = 0.329	
Any HPV VLP						
Negative	91 (53%)	49 (52%)	1.0	30 (59%)	1.0	
Positive	81 (47%)	46 (48%)	1.19 (0.65–2.20) <i>P</i> = 0.570	21 (41%)	0.79 (0.41–1.50) <i>P</i> = 0.463	
HPV 16 E6						
Negative	164 (95%)	88 (93%)	1.0	50 (98%)	1.0	
Positive	8 (5%)	7 (7%)	0.88 (0.25–3.03) <i>P</i> = 0.833	1 (2%)	0.21 (0.02–2.01) <i>P</i> = 0.177	
HPV 16 E7						
Negative	164 (95%)	90 (95%)	1.0	51 (100%)	1.0	
Positive	8 (5%)	5 (5%)	0.78 (0.20–3.34) <i>P</i> = 0.779	0 (0%)	0.19 (0.01–3.31) <i>P</i> = 0.999	
HPV 16 E6 or E7						
Negative	160 (93%)	84 (88%)	1.0	50 (98%)	1.0	
Positive	12 (7%)	11 (12%)	0.90 (0.32–2.53) <i>P</i> = 0.895	1 (2%)	0.16 (0.02–1.39) <i>P</i> = 0.096	

VLP, virus-like particles; OR, odds ratio; CI, confidence interval; *P*, probability.

<sup>a</sup>Adjusted for age.

patients with prostatic cancer was statistically significant (*P* = 0.0403; Table I).

### Prevalence of HPV-Specific Antibodies

The prevalences of HPV-specific antibodies to six various HPV-specific VLPs (HPV 6, 11, 16, 18, 31, and 33) were determined in normal healthy blood donors, patients with benign prostate hyperplasia, and patients with prostatic cancer (Table II). The seropositivity rates did not differ significantly between

healthy controls and patients with benign prostate hyperplasia. Neither were any consistent differences observed between healthy controls and patients with prostatic cancer, except for HPV 6 where prevalence of antibodies was significantly lower in cases with prostatic cancer (*P* = 0.018, adjusted OR = 0.35; 95% CI = 0.14–0.84 (Table II). No differences in prevalence of antibodies to HPV 16 E6 and/or E7 antibodies were found when patients with benign prostate hyperplasia (12%) or patients with prostatic cancer (2%) were compared to healthy controls (Table II). The

TABLE III. Prevalence of HPV in Healthy Tissue of Male Urogenital Tract

	No. of patients	No. of samples	No. of HPV positive samples (%)
Foreskin	27	27	4 (14.8) <sup>a</sup>
Prostate	51	80	2 (2.5) <sup>b</sup>
Urinary bladder	15	29	0
Seminal vesicles	54	77	2 (2.6) <sup>c</sup>
Ductus deferens	27	40	2 (5.0) <sup>d</sup>
Ureter	3	3	0
Total	74	256	10 (3.9)

<sup>a</sup>HPV 16 in three samples, one sample positive for unknown type.

<sup>b</sup>Two samples positive for unknown type.

<sup>c</sup>HPV 52, one sample positive for unknown type.

<sup>d</sup>HPV 16, one sample positive for unknown type.

difference in the observed prevalence of these antibodies between patients with benign prostate hyperplasia and prostatic cancer was statistically marginally significant ( $P = 0.057$ ; Table I).

#### HPV DNA Prevalence in Healthy Tissue of the Male Genitourinary Tract

We screened different tissue samples obtained during surgery for HPV DNA, looking for a possible reservoir of HPV DNA in the male genitourinary tract. The results are summarized in Table III. Altogether 256 tissue samples were analyzed. The overall HPV prevalence was 4% (10/256). The highest HPV prevalence rate, 15% (4/27), was detected in the foreskin, followed by the ductus deferens with 5% (2/40), prostate with 3% (2/80) and seminal vesicles with 3% (2/77). No HPV was detected in the healthy urinary bladder and urethral tissue. In four samples, HPV 16 was detected. One sample was positive for HPV 52 and in five samples, an unknown HPV type was present (see notes in Table III).

#### DISCUSSION

The present study adds to the accumulated amount of evidence arguing against a direct involvement of HPV in prostate cancer aetiology. No significant difference was found in the prevalence of HPV between the tumor and healthy tissues from the prostate ( $P = 1.000$ ). Furthermore, a comparable HPV DNA detection rate was also recorded in the tissue from benign hyperplasia of the prostate ( $P = 1.000$ ). In addition, no difference was observed in the prevalence of HPV-specific antibodies between the patients with tumors and healthy controls. The increased prevalence of HPV-specific antibodies to HPV 16 E6/E7 proteins regularly reported in patients with HPV-associated invasive carcinomas [Tachezy et al., 1999; Reuschenbach et al., 2008; Tachezy et al., 2009; Smith et al., 2010] was not detected in the study patients with prostate cancer.

This study was aimed at evaluation of HPV aetiology in prostate cancer. Many studies have been published to date but most of them did not take a multidisciplinary approach to proving the causal

relationship between HPV and tumors in this location. Epidemiological, molecular biological, and immunological methods were used to gain a more comprehensive insight into the aetiology of HPV in prostate carcinoma. HPV DNA in tissue and urethral smears and HPV-specific antibodies were analyzed. Demographic and clinical data were collected from subjects with benign and malignant diseases. In addition, the prevalence of HPV-specific antibodies was also correlated with that of healthy controls.

Among the patient characteristics, none of the investigated factors including prostatic inflammation was associated with prostate cancer. The role of inflammation in prostate carcinogenesis remains unresolved. In a meta-analysis of Dennis et al. [2002], patients with a history of prostatitis were more likely to develop prostate cancer (OR 1.6; CI 1.0–2.4). Nevertheless, a large prospective cohort study with 16.1% of men reporting a history of prostatitis has not reproduced this finding [Sutcliffe et al., 2006] and neither have two large clinical trials where intraprostatic inflammation was only associated with patient age and prostate volume [Robert et al., 2009].

In the present study, meticulous care was taken to avoid the limitations of the previous ones. To detect a wide variety of HPV types in the tissue with a very high sensitivity, the nested PCR was employed with a set of degenerate and general primers which can detect one HPV genome copy/cell [Evander et al., 1992; de Roda Husman et al., 1995]. To prevent any possible carryover contamination, each step of sample processing and amplification was monitored. All samples were obtained by open surgery (open radical prostatectomy or cystoprostatectomy) excluding the possibility of contamination during the transurethral approach. Urethral smears were taken to be analyzed for HPV presence and type specificity and the HPV types present in the tissue and urethra were compared. Last but not least, all tumor sections were reviewed by a pathologist and only those where tumor cells had been revealed were analyzed for HPV DNA presence.

HPV DNA was detected in 2% of patients with prostatic cancer and patients with benign prostate hyperplasia alike. Tissue-based studies investigating

possible association between HPV and prostate cancer risk gave inconsistent results. In a recent meta-analysis, higher HPV 16 DNA detection in patients with prostatic cancer has been observed (OR 1.54; CI 1.07–2.20) after exclusion of the studies which did not detect HPV either in cases or in controls [Lin et al., 2011]. Nevertheless, the heterogeneity of study designs including size, detection methods, tissue handling, and other parameters make the meta-analysis validity debatable.

The HPV prevalence rates in urethral smears were very high (36% in patients with benign prostate hyperplasia and 18% in patients with prostatic cancer) despite the high mean age of study subjects (70 and 63 years, respectively). In a study by Giuliano et al. [2007], the prevalence of HPV in urethral smears has been lower (10%). The difference might be explained by the modification of the protocol for DNA extraction in the present study which includes the concentration of the extracted DNA. Another possible explanation might be the geographical differences in HPV prevalence.

In the present study, no differences were observed in the prevalence of antibodies specific for VLPs derived from different HPV types except for HPV 6 and patients with prostatic cancer were less likely to be seropositive than control subjects. Likewise in case of HPV DNA, studies investigating association between HPV infection based on VLP serology and prostate cancer risk gave no consistent results. In two studies, the prevalence of antibodies to HPV 18 or HPV 33 has been associated with a higher prostate cancer risk [Dillner et al., 1998; Adami et al., 2003]. Conversely, men with prostatic cancer have been less likely to harbor antibodies to HPV 18 in a recent study [Hrbacek et al., 2011]. For an overview of the papers published on the association of HPV with prostate cancer, see Hrbacek et al. [2012].

Seropositivity to low-risk HPV types 6 and 11 in the only study published to date has not been associated with a higher or lower prostate cancer risk [Hrbacek et al., 2011]. Therefore, our statistically significant finding of a lower HPV 6 seroprevalence among patients with prostatic cancer in this study is likely to be due to chance rather than to reflect a true relationship.

Antibodies to HR HPV oncoproteins E6 and E7 are rarely present in healthy individuals but are very often detected in cancer cases etiologically linked to HPV. In such cases, these antibodies are markers of invasive tumor growth [Tachezy et al., 1999; Dennis et al., 2002; Reuschenbach et al., 2008; Tachezy et al., 2009; Smith et al., 2010]. In this study, no significant difference was observed in the prevalence of HPV 16 E6/E7 antibodies between patients with prostatic cancer and controls with benign prostate hyperplasia (2% vs. 12%). These results are comparable with recent findings in a different larger group of patients with prostatic cancer (329 subjects) and patients with benign prostate hyperplasia (105 subjects; 9% vs. 13%)

(unpublished data). Taken together, the serological data are consistent with the negative PCR results and suggest that HPV plays no role in the development of prostate cancer.

In recent years, the research aimed at understanding the burden of HPV infection in men, mode of HPV transmission to women, and anatomic site within the male genitourinary tract which might serve as a reservoir of HPV has been accelerated. HPV DNA has been frequently detected on the penile shaft, glans penis/coronal sulcus, and scrotum. Some studies have shown that male circumcision decreases the risk of both penile cancer in men and cervical cancer in their sexual partners [Backes et al., 2011; Morris et al., 2011]. HPV DNA has been found in a variable proportion of urine samples [Hernandez et al., 2008; O'Leary et al., 2011]. Multiple studies have addressed the detection of HPV in the sperm and sperm cells. Some suggest that HPV infection is located in the sperm cells rather than in the plasma, but, in our opinion, neither of these studies used methods for the separation of the cells and plasma to ascertain the absence of infected desquamated epithelial cells from the urethra [Lai et al., 1996; Hernandez et al., 2008]. In a previous study, HPV has been found in the epididymis of 27% of patients with nontuberculous epididymitis [Svec et al., 1999; Svec et al., 2003]. In the latter study [Svec et al., 2003] as well as in that of Rintala et al. [2002], HPV has also been detected in the ductus deferens. Rotola et al. [1992] has reported HPV infection in both neoplastic and non-neoplastic tissues from different locations: bladder, kidney, urethra, and prostate. However, the authors have not specified the procedures used for obtaining the tissue and for controlling carryover contamination during DNA extraction [Rotola et al., 1992]. The prevalence of HPV DNA has been determined in healthy prostatic tissue and in tissue of benign prostate hyperplasia as controls for the patients with prostatic tumors. The prevalence rates vary between the studies mostly with the primers used for DNA amplification. Generally, the primers which target the E6 region of HPV yield higher prevalence rates than the general primers which target the L1 ORF both for tumors and controls. Only four of 29 studies evaluating HPV presence in the prostate cancer and healthy prostate tissue have shown a statistically significant difference in HPV prevalence. In studies where HPV prevalence in prostate cancer was higher also the prevalence rates in non-tumorous prostatic tissues were higher and therefore likely to result from false positivity [for review, see Hrbacek et al., 2012].

## CONCLUSIONS

In conclusion, the results of this study indicate that HPV infection is not associated with prostate oncogenesis in men. However, they imply that multiple

tissues of the male genitourinary tract may be important reservoirs for the transmission of some HPV types. No statistically significant differences were observed in the prevalence of HPV DNA between the tissues of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, and healthy prostate. Neither were found any differences in the seroprevalence rates for viral oncoproteins E6/E7 in patients and healthy controls. However, in 4% of healthy tissue samples from the male genitourinary tract, DNA of known and unknown HPV types was detected.

### ACKNOWLEDGMENTS

We authors thank Bohumir Prochazka for statistical analyses and Iva Mikyskova for expert technical assistance.

### REFERENCES

- Adami HO, Kuper H, Andersson SO, Bergstrom R, Dillner J. 2003. Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: A population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:872-875.
- Anwar K, Nakakuki K, Shiraishi T, Naiki H, Yatani R, Inuzuka M. 1992. Presence of Ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas. *Cancer Res* 52:5991-5996.
- Backes DM, Bleeker MC, Meijer CJ, Hudgens MG, Agot K, Bailey RC, Ndinya-Achola JO, Hayombe J, Hogewoning CJ, Moses S, Snijders PJ, Smith JS. 2011. Male circumcision is associated with a lower prevalence of human papillomavirus-associated penile lesions among Kenyan men. *Int J Cancer* 130:1888-1897.
- Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. 2010. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 202:1789-1799.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. 1995. The use of general primers gp5 and gp6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by pcr. *J Gen Virol* 76:1057-1062.
- Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. 2002. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 60:78-83.
- Dillner J, Knekt P, Boman J, Lehtinen M, af Geijerstam V, Sapp M, Schiller J, Maatela J, Aromaa A. 1998. Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 75:564-567.
- Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. 1992. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 30:987-992.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917.
- Gazzaz FS, Mosli HA. 2009. Lack of detection of human papillomavirus infection by hybridization test in prostatic biopsies. *Saudi Med J* 30:633-637.
- Gillison ML, Shah KV. 2003. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31:57-65.
- Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Markowitz LE, Smith D, Harris RB. 2007. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: The HPV detection in men study. *J Infect Dis* 196:1146-1152.
- Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Salmeron J, Anic GM, Rollison DE, Smith D. 2011. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): A cohort study. *Lancet* 377:932-940.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 95:117-124.
- Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, McDuffie K, Thompson P, Shvetsov YB, Ning L, Goodman MT. 2008. Circumcision and human papillomavirus infection in men: A site-specific comparison. *J Infect Dis* 197:787-794.
- Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S. 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 87:1365-1371.
- Hrbacek J, Urban M, Hamsikova E, Tachezy R, Eis V, Brabec M, Heracek J. 2011. Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: A case-control study. *BMC Cancer* 11:53-63.
- Hrbacek J, Urban M, Hamsikova E, Tachezy R, Heracek J. 2012. Thirty years of research on infection and prostate cancer: No conclusive evidence for a link. A systematic review. *Urol Oncol Semin Invest*.
- Edge S, Byrd D. 2010a. editors. *Compton ceale. Urinary Badder* 7th ed. 497-505.
- Edge S, Byrd D. 2010b. editors. *Compton ceale. Prostate* 7th ed. 457-468.
- Lai YM, Yang FP, Pao CC. 1996. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril* 65:1026-1030.
- Leiros GJ, Galliano SR, Sember ME, Kahn T, Schwarz E, Eiguchi K. 2005. Detection of human papillomavirus DNA and P53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina. *BMC Urol* 5:15-22.
- Leskinen MJ, Vainionp R, Syrjinen S, Leppilahti M, Marttila T, Kylml T, Tammela TL. 2003. Herpes simplex virus, cytomegalovirus, and papillomavirus DNA are not found in patients with chronic pelvic pain syndrome undergoing radical prostatectomy for localized prostate cancer. *Urology* 61:397-401.
- Lin Y, Mao Q, Zheng X, Yang K, Chen H, Zhou C, Xie L. 2011. Human papillomavirus 16 or 18 infection and prostate cancer risk: A meta-analysis. *Ir J Med Sci* 180:497-503.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell/Mol Diagn Hum Cancer* 7:209-214.
- Martinez-Fierro ML, Leach RJ, Gomez-Guerra LS, Garza-Guajardo R, Johnson-Pais T, Beuten J, Morales-Rodriguez IB, Hernandez-Ordenez MA, Calderon-Cardenas G, Ortiz-Lopez R, Rivas-Estilla AM, Ancer-Rodriguez J, Rojas-Martinez A. 2010. Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer. *BMC Cancer* 10:326-333.
- Morris BJ, Gray RH, Castellsague X, Bosch FX, Halperin DT, Waskett JH, Hankins CA. 2011. The strong protective effect of circumcision against cancer of the penis. *Adv Urol* 2011: 812368.
- Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M. 1998. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res* 26:165-169.
- O'Leary MC, Sinka K, Robertson C, Cuschieri K, Lyman R, Lacey M, Potts A, Cubie HA, Donaghy M. 2011. HPV type-specific prevalence using a urine assay in unvaccinated male and female 11- to 18-year olds in Scotland. *Br J Cancer* 104:1221-1226.
- Parker TM, Smith EM, Ritchie JM, Haugen TH, Vonka V, Turek LP, Hamsikova E. 2006. Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. *Oral Oncol* 42:288-296.
- Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin KL, Einkenkel J, Dillner J, Hamsikova E, Eschenbach D, Zimmer H, Heilig B, Kopitz J, Pawlita M, Doeberitz MK, Wentzensen N. 2008. Characterization of humoral immune responses against P16, P53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *Int J Cancer* 123:2626-2631.
- Rintala MA, Pollanen PP, Nikkanen VP, Grenman SE, Syrjanen SM. 2002. Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens. *J Infect Dis* 185:1664-1667.
- Robert G, Descazeaud A, Allory Y, Vacherot F, de la Taille A. 2009. Should we investigate prostatic inflammation for the management of benign prostatic hyperplasia? *Eur Urol Suppl* 8:879-886.

- Rotola A, Monini P, Di Luca D, Savioli A, Simone R, Secchiero P, Reggiani A, Cassai E. 1992. Presence and physical state of HPV DNA in prostate and urinary-tract tissues. *Int J Cancer* 52:359–365.
- Serth J, Panitz F, Paeslack U, Kuczyk MA, Jonas U. 1999. Increased levels of human papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res* 59:823–825.
- Silvestre RV, Leal MF, Demachki S, Nahum MC, Bernardes JG, Rabenhorst SH, Smith MA, Mello WA, Guimaraes AC, Burbano RR. 2009. Low frequency of human papillomavirus detection in prostate tissue from individuals from Northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:665–667.
- Smith EM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. 2010. Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer. *Int J Cancer* 127:111–117.
- Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo AM, Leitzmann MF, Willett WC, Platz EA. 2006. Gonorrhea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:2160–2166.
- Svec A, Urban M, Mikyskova I, Tachezy R. 1999. Human papillomavirus in squamous metaplastic epithelium with dysplasia of the epididymis detected by PCR method. *Am J Surg Pathol* 23:1437–1438.
- Svec A, Mikyskova I, Hes O, Tachezy R. 2003. Human papillomavirus infection of the epididymis and ductus deferens: An evaluation by nested polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 127:1471–1474.
- Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, Mikyskova I, Smahel M, Van Ranst M, Kanka J, Havrankova A, Rob L, Guttner V, Slavik V, Anton M, Kratochvil B, Kotrsova L, Vonka V. 1999. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: Correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol* 58:378–386.
- Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, Smith E, Salakova M, Smahe-lova J, Ludvikova V, Rotnaglova E, Kodet R, Hamsikova E. 2009. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* 81:878–887.
- van den Brule AJ, Pol R, Franssen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 40:779–787.
- Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijgert JH. 2010. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis* 10:862–874.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19.
- zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections—A major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288:F55–F78.

původní práce

# INFEKČNÍ ONEMOCNĚNÍ UROGENITÁLNÍHO TRAKTU V ANAMNÉZE NEMAJÍ VLIV NA BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ A PROGNÓZU KARCINOMU PROSTATY

GENITOURINARY TRACT INFECTIONS IN PATIENT HISTORY  
DO NOT CORRELATE WITH PROSTATE CANCER BIOLOGICAL  
BEHAVIOUR AND PROGNOSIS

Jan Hrbáček<sup>1</sup>, Michael Urban<sup>1,5</sup>, Václav Eis<sup>2</sup>,  
Eva Hamšíková<sup>3</sup>, Ruth Tachezy<sup>3</sup>, Marek  
Brabec<sup>4</sup>, Jiří Heráček<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Urologická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha

<sup>2</sup>Ústav patologie 3. LF UK a FNKV, Praha

<sup>3</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>4</sup>Ústav informatiky Akademie věd ČR, oddě-  
lení nelineárního modelování, Praha

<sup>5</sup>Androgeos, Praha

Došlo: 14. 4. 2011.

Přijato: 17. 5. 2011.

## Kontaktní adresa

doc. MUDr. Jiří Heráček, Ph.D.

Urologická klinika 3. LF UK a FNKV

Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

e-mail: heracek@fnkv.cz

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS9984.

## Souhrn

Hrbáček J, Urban M, Eis V, Hamšíková E,  
Tachezy R, Brabec M, Heráček J. Infekční

onemocnění urogenitálního traktu v ana-  
mnéze nemají vliv na biologické chování  
a prognózu karcinomu prostaty

## Cíl:

Souvislost mezi infekčním onemocněním uro-  
genitálního traktu a karcinomem prostaty se  
ani po 20 letech výzkumů na tomto poli nepo-  
dařilo prokázat. Zatím se však nikdo nezabý-  
val otázkou, zda infekce nemůže ovlivnit vlast-  
nosti a průběh tohoto maligního onemocnění.

## Materiál a metoda:

Možnou spojitost mezi přítomností sérových  
protilátek (znakem prodělané infekce) pro-  
ti rozličným pohlavně přenosným infekčním  
činitelům a biologickým chováním karcinomu  
prostaty jsme hledali na souboru 317 pacien-  
tů, kteří podstoupili radikální prostatektomii  
pro klinicky lokalizovaný karcinom prostaty.  
Do naší studie případů a kontrol jsme zahr-  
nuli tyto sexuálně přenosné uropatogeny: lid-  
ský cytomegalovirus, herpes simplex virus  
1 a 2, lidský papillomavirus 6, 11, 16, 18, 31  
a 33, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma  
pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisserii  
gonorrhoeae* a *Treponemu pallidum*.

**Výsledky:**

Přítomnost a titry specifických protilátek jsme vyhodnotili ve vztahu k histopatologickým charakteristikám tumoru: k lokálnímu rozsahu, Gleasonovu skóre a hladině prostatického specifického antigenu. Žádné klinicky významné rozdíly jsme nenalezli.

**Závěr:**

Neprokázali jsme vztah mezi biologickým chováním karcinomu prostaty (tedy jeho prognózou) a prodělaným infekčním onemocněním urogenitálního traktu.

**Klíčová slova:**

infekce, karcinom prostaty, pohlavně přenosné nemoci, staging nádoru.

**Summary**

**Hrbáček J, Urban M, Eis V, Hamšíková E, Tachezy R, Brabec M, Heráček J. Genitourinary tract infections in patient history do not correlate with prostate cancer biological behaviour and prognosis**

**Aim:**

An association between genitourinary infection and prostate cancer has not been clearly demonstrated despite the past 20 years research efforts. No research group has investigated, however, the possible role infection could play in prostate cancer behaviour and the disease course.

**Material and methods:**

In our case-control study, we have evaluated 317 patients who had undergone radical retro-pubic prostatectomy for a clinically localized prostate cancer; we were looking for a possible correlation between the presence of antibodies (surrogate marker of past infection) to various genitourinary pathogens and the tumour biological behaviour. These sexually transmitted agents were included in the study: human cytomegalovirus, herpes simplex virus 1 and 2, human papillomavirus 6, 11, 16, 18, 31 and 33, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*.

**Results:**

We have correlated antibody presence and serum antibody levels with the tumour clinical and pathological characteristics: local staging, Gleason score and prostatic specific antigen level. No clinically significant differences were found.

**Conclusion:**

No association has been found between prostate cancer biological behaviour – i.e. its prognosis – and genitourinary infectious diseases in patient history.

**Key words:**

infection, prostatic neoplasms, sexually transmitted diseases, cancer staging.

## ÚVOD

Incidence karcinomu prostaty (KP) v České republice vykazuje v posledních 20 letech setrvalý vzestup. V roce 2007 činila 102,1/100 tisíc mužů, což odpovídá počtu 50,0 nových případů na 100 000 obyvatel obou pohlaví (1). V Evropské unii představoval v roce 2006 KP 20 % všech zhoubných nádorů s výjimkou kožních malignit (2) a ve Spojených státech amerických v roce 2010 dokonce 28 %. To znamená 217 730 nových případů a 32 050 úmrtí,

neboli 11 % ze všech úmrtí na zhoubné nádory v USA (3).

Výborné výsledky léčby lokalizovaného onemocnění dnes kontrastují s neuspokojivou prognózou pacientů, u nichž nádor přesáhl hranice orgánu. Určení rizikových faktorů pro agresivnější chování KP, jeho rychlejší lokální šíření a posléze i metastazování by umožnilo rozdělit pacienty z hlediska prognózy a případně upravit strategii léčby.

Za posledních 20 let vzniklo přes 50 studií, jež se metodami sérologie a tkáňové detekce nukleových kyselin snažily prokázat případnou spojitost mezi infekcí urogenitálními patogeny šířenými především pohlavní cestou a vznikem KP. Mezi nejčastěji studovaná agens patřili jednak klasičtí původci sexuálně přenosných chorob *Neisseria gonorrhoeae* a *Treponema pallidum*, jednak běžné urogenitální patogeny dnešní doby: *Chlamydia trachomatis*, lidský papillomavirus (HPV), herpes simplex virus (HSV) a další. Přes různorodou metodologii výběru pacientů definici kontrolní skupiny i použitých laboratorních metod neprokázaly publikované práce žádnou konzistentní spojitost mezi urogenitální infekcí a rizikem vzniku KP (4).

Pokud je nám známo, nezabývala se zatím žádná studie otázkou, zda infekce urogenitálními infekčními agens nepřispívá k agresivnějšímu chování nádoru. Tato hypotéza je ospravedlnitelná vzhledem k tomu, že některá agens jsou prokazatelně onkogenní a u jiných se o této vlastnosti spekuluje. Její ověření pochopitelně vyžaduje exaktní histopatologický rozbor chirurgem odstraněné tkáně, nejlépe z radikální prostatektomie.

V naší studii jsme sérologickými metodami zjišťovali přítomnost protilátek proti nejběžnějším urogenitálním infekčním činitelům. Výsledky jsme vyhodnotili ve vztahu k lokální pokročilosti nádoru dle stadií klasifikace TNM, k jeho agresivitě vyjádřené Gleasonovým skóre (GS) a k předoperační hodnotě plazmatické koncentrace prostatického specifického antigenu (PSA).

## METODA

Do studie jsme zařadili 317 pacientů, kteří v letech 2004–2010 podstoupili na Urologické klinice 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady otevřenou radikální retropubickou prostatektomií (RRP) pro klinicky lokalizovaný KP (5, 6). Demografické charakteristiky souboru shrnuje tabulka 1. Schéma náboru pacientů přehledně osvětluje obrázek 1. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí 3. LF UK a Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR.

**Tab. 1.** Demografické a klinicko-patologické charakteristiky studovaného souboru

**Table 1.** Demographic, clinical and pathological characteristics of the study population

Počet pacientů	317
Průměrný věk (let)	63 (39–81)
< 60	75 (23,7 %)
60–69	188 (59,3 %)
70–79	53 (16,7 %)
> 80	1 (0,3 %)
<b>Průměrná koncentrace PSA (ng/ml)</b>	<b>9,1 (0,8–35,4)</b>
0–4,0	33 (10,4 %)
4,1–10,0	171 (53,9 %)
10,1–20,0	93 (29,3 %)
> 20,0	14 (4,4 %)
<b>Staging</b>	
pT2a	18 (5,7 %)
pT2b	5 (1,5 %)
pT2c	134 (42,3 %)
pT3a	98 (30,9 %)
pT3b	56 (17,7 %)
pT4	6 (1,9 %)
<b>Medián Gleasonova skóre</b>	<b>7</b>
2–6	158 (49,9 %)
7	124 (39,1 %)
8–10	35 (11,0 %)

## Zpracování tkáňových vzorků

Bezprostředně po odběru tkáně jsme resekáty dopravili do Ústavu patologie k dalšímu zpracování. Vzorky z radikální prostatektomie jsme kompletně zpracovali podle schématu popsaného Montironim (7). Preparát jsme změřili, povrch označili tuší, semenné vázky amputovali a zpracovali zvlášť. Odřízli jsme apex a bázi prostaty v šířce 10 mm – tyto dvě části se krájely kolmo k povrchu paralelně s průběhem uretry. Zbylou tkáň prostaty jsme krájeli v tenkých lamelách (3–4 mm) kolmo k průběhu uretry a vše zalili do bločků.

Vzorky tkáně jsme fixovali v 10% pufrovaném formalínu a zalili do parafínu. Mikroskopické řezy šířky 5 µm jsme barvili hematoxylinem a eosinem a hodnotili pomocí světelné mikroskopie. Definitivní popis zahrnoval histologický typ nádoru dle klasifikace WHO (8), GS s primárním, sekundárním a případně terciárním stupněm (9), staging nádoru (10),

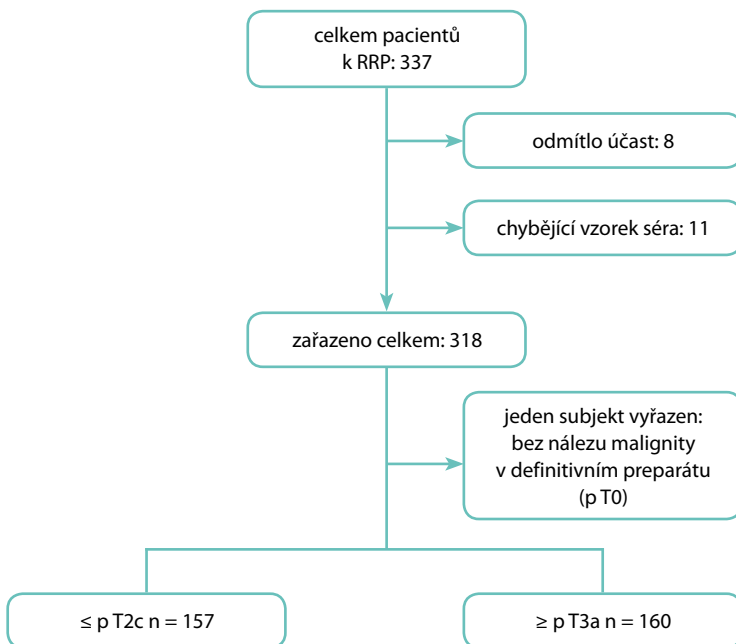
**Obr. 1.**

Schéma náběru pacientů do studie

**Fig. 1.**

Patient flow diagram

procentuální zhodnocení rozsahu nádoru, rozsah lokální invaze do periprostatických měkkých tkání či do semenných váčků, posouzení perineurálního šíření, vyjádření k angioinvazi a posouzení chirurgického okraje resektátu (11). Jako pozitivní chirurgický okraj byla hodnocena přítomnost nádorových buněk přímo v okraji resektátu označeném tuší.

### Sérologická vyšetření

Každému pacientovi jsme v den operačního výkonu mezi 6. a 8. hodinou ranní odebrali vzorek periferní žilní krve. Po 20minutové centrifugaci rychlostí 2000 otáček/min. jsme odebrali alikvoty séra a zmrazili je při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do dalšího zpracování.

### Detekce protilátek

Přítomnost protilátek proti *Ch. trachomatis*, HSV 1 a 2, lidskému cytomegaloviru (CMV), *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *M. hominis* a *U. urealyticum* jsme prokazovali metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), testem vazby komplementu a testem nepří-

mé imunofluorescence s využitím komerčně dostupných diagnostických souprav. Všechny testy jsme prováděli dle pokynů výrobců. Protilátky proti HPV jsme detekovali přímým testem ELISA, jako antigeny jsme použili tzv. virům podobné částice (virus-like particles, VLP).

### Detekce specifických protilátek proti HPV

#### Příprava viru podobných částic

Hmyzí buňky Sf9 jsme namnožili v suspenzi v TNM-FH hmyzím médiu (SIGMA), s 10% fetálního telecího séra. Přibližně  $4 \times 10^6$  buněk při multiplicitě infekce 10 PFU/buňku jsme infikovali rekombinantním bakulovirem, nesoucím gen pro kapsidový protein HPV L1. Sedmdesát dvě hodiny po infekci byly buňky sklizeny, propláchnuty pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) a zmrazeny při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Buněčný pelet jsme resuspendovali ve 40 ml extrakčního pufru (10 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 50 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 150 mmol/l NaCl, 0,01% Triton X-100, 20 mmol/l HEPES, pH 7,4) a buňky rozbíjeli ultrazvukem  $3 \times 30$  sekund při

0 °C. Sedimentovaný pelet jsme znovu resuspendovali ve 40 ml extrakčního pufru a celou proceduru zopakovali. Spojené supernatanty jsme nasatili chloridem cesným do 30% koncentrace a centrifugovali 22 hodin při 45 000 otáčkách/min. a 18 °C. Horní proužek jsme rozdělili na „step“ gradientu chloridu cesného (36,0–30,5–16,0%) 4 hodiny při 35 000 otáčkách/min. a 18 °C. Přítomnost kapsid v odpovídajícím proužku jsme zjišťovali SDS-polyakrylamidovou elektroforézou (koncentrace proteinů), Western blottingovou analýzou a testem ELISA se specifickými monoklonálními protilátkami.

#### Detekce protilátek

Pro zjištění přítomnosti specifických protilátek v sérech jsme použili metodu ELISA, antigeny byly VLP odpovídající HPV nízké rizikových typů 6 a 11 a vysoce rizikových typů 16, 18, 31 a 33. Na povrch jamek mikrotitračních destiček (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Dánsko) jsme navázali VLP v 50 µl PBS v koncentraci 2 µg/ml dvě hodiny při teplotě 37 °C a přes noc při 4 °C. U všech dalších jednohodinových inkubací při 37 °C vždy následovalo pětinasobné promytí jamek promývacím roztokem A (PBS, 0,21 mol/l NaCl, 0,1% Triton X-100). Potenciálně volná vazebná místa jamek se vysytila 1% roztokem BSA v PBS a poté jsme k jamkám přidávali v paralelách séra ředěná 1 : 25 v roztoku A s 1% BSA. Navázané protilátky jsme označili oslím imunoglobulinem proti lidskému IgG (H a L řetězec), konjugovaným s křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA), ředěným 1 : 7500 v roztoku A s 1% BSA a barevná reakce byla vyvolána 0,04% roztokem o-fenylendiaminu v substrátovém pufru (50 mmol/l fosfátový-citrátový pufr, pH 5,0) s 0,006% peroxidu vodíku. Reakci jsme zastavili přidáním 2 mol/l roztokem kyseliny sírové a vyhodnotili spektrofotometricky jako optickou denzitu (OD) s referenční vlnovou délkou 492 a 630 nm (Infinite 200 microplate reader, TECAN, Rakousko). Pro zjištění reaktivity pozadí jsme stejná séra vyšetřovali na mikrotitrační destičce bez antigenu (pouze BSA). Na každou destičku se vždy zařazovala standardní pozitivní a negativní kontrola proti danému antigenu. Od hodnoty OD séra, získané na mikrotitrační destičce s VLP, byla odečtena hodnota OD stejného séra na destičce kontrolní. Pro každý antigen a destičku jsme

vypočítali hraniční hodnotu (cut-off, CO) jako aritmetický průměr rozdílů OD plus dvě směrodatné odchylky; séra s rozdílem OD vyšším než hodnota vypočtená jsme vyloučili a proceduru opakovali tak dlouho, dokud hodnota rozdílu OD žádného ze zbývajících sér nebyla vyšší. Všechny výsledky testů ELISA jsme vyjádřili jako tzv. OD index (podíl mezi rozdílem OD daného séra a hodnotou CO), který do určité míry ukazuje sílu protilátkové odpovědi. Testovaná séra s OD indexem vyšším než 1 jsme označili jako pozitivní. Pro konfirmaci výsledků jsme všechny vzorky s OD indexem do 10 % nad hodnotou CO znovu dvakrát testovali a jako pozitivní označili ty, které byly pozitivní opakovaně. Pro kontrolu jsme opakovaně testovali také čtvrtinu vzorků z celého souboru (12).

#### Statistický rozbor

Metodami popisné statistiky jsme vyhodnotili demografická a klinická data pacientů včetně zastoupení jednotlivých stadií lokálního šíření nádoru a jeho agresivity dle GS (tab. 1). U všech subjektů jsme kvalitativně a případně i kvantitativně vyšetřili vzorky sér na přítomnost protilátek proti zkoumaným infekčním činitelům.

Pomocí Wilcoxonova neparametrického testu jsme hledali možnou spojitost mezi séropozitivitou a výší plazmatické hladiny PSA, mezi séropozitivitou a výškou kombinovaného GS a konečně mezi výškou titrů sérových protilátek a lokální pokročilostí nádoru. Všechny testy byly vyhodnoceny na 5% hladině významnosti za použití statistického software „R“ (<http://www.r-project.org>). Při zpracování článku jsme se řídili současnými mezinárodními doporučeními pro publikaci výsledků observačních studií (13).

## VÝSLEDKY

Do studie jsme zařadili celkem 317 pacientů průměrného věku 63 (39–81) let, s průměrnou sérovou koncentrací PSA 9,1 ng/ml. Více než polovina operovaných měla PSA v „šedé zóně“ 4,1–10,0 ng/ml. V definitivních histopatologických nálezech byly stejnou měrou zastoupeny lokalizované (49,5%) a lokálně pokročilé (50,5%) formy onemocnění. Polovina pacientů (49,8%) měla GS ≤ 6; 11% nádorů spadalo mezi agresivní typy s GS 8–10.

**Tab. 2.** Srovnání průměrných hladin prostatického specifického antigenu (ng/ml) u séronegativních a séropozitivních pacientů**Table 2.** Mean prostate specific antigen levels (ng/ml) in seronegative and seropositive subjects

Patogen	Séronegativní	Séropozitivní	p-hodnota Wilcoxonův test
HPV6	9,11	8,81	0,5878
HPV11	9,03	9,12	0,9710
HPV16	9,11	7,11	0,1090
HPV18	9,03	9,36	0,5646
HPV31	9,07	8,51	0,6794
HPV33	9,08	7,01	0,3266
CMV	9,98	8,78	0,1493
HSV1	9,47	9,00	0,5250
HSV2	9,09	8,54	0,8662
<i>Chlamydia trachomatis</i>	9,04	8,59	0,7020
<i>Mycoplasma hominis</i>	8,94	9,36	0,2623
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	9,09	8,72	0,7482
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	9,02	9,06	0,3625
<i>Treponema pallidum</i>	–	–	–

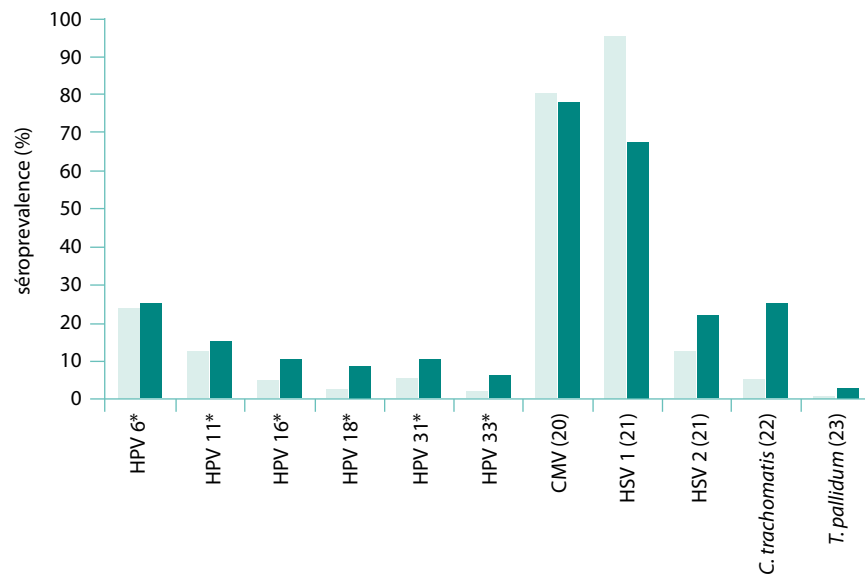
V průměrné výšce hladiny PSA (tab. 2) jsme nezaznamenali žádný statisticky významný rozdíl mezi pacienty s protilátkami proti jednotlivým infekčním činitelům a séronegativními jedinci. Porovnáním průměrů GS mezi těmito skupinami (tab. 3) jsme zjistili jediný statisticky signifikantní rozdíl v případě protilátek proti HPV 6. Séropozitivní pacienti měli vyšší průměrnou hodnotu GS než muži bez průkazu protilátek

v séru (6,75 vs. 6,45,  $p = 0,0305$ ). Ve výšce titrů sérových protilátek jsme nenalezli žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou s lokalizovaným a lokálně pokročilým onemocněním (tab. 4).

Prevalenci protilátek specifických pro jednotlivá infekční agens v našem studovaném souboru jsme porovnali s daty o prevalenci protilátek v obecné populaci získanými z literatury (obr. 2).

**Tab. 3.** Průměrné hodnoty Gleasonova skóre u séronegativních a séropozitivních pacientů**Table 3.** Mean Gleason score in seronegative and seropositive patients

Patogen	Séronegativní	Séropozitivní	p-hodnota Wilcoxonův test
HPV6	6,45	6,75	<b>0,0305</b>
HPV11	6,49	6,75	0,2134
HPV16	6,51	6,88	0,3433
HPV18	6,52	6,88	0,1719
HPV31	6,51	6,84	0,5207
HPV33	6,53	6,14	0,1841
CMV	6,57	6,51	0,4093
HSV1	6,44	6,52	0,7572
HSV2	6,50	6,67	0,5592
<i>Chlamydia trachomatis</i>	6,55	6,06	0,0881
<i>Mycoplasma hominis</i>	6,53	6,48	0,6508
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	6,51	6,56	0,7487
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,51	6,65	0,7540
<i>Treponema pallidum</i>	–	–	0,4582



**Obr. 2.**

Graf srovnávající séroprevalenci proti specifickým protilátkám ve studovaném souboru s údaji z literatury. Svislá osa: séroprevalence v procentech; světlé sloupce: údaje z našeho souboru; tmavé sloupce: údaje z literatury; \*(osobní sdělení, Eva Hamšíková, Praha 2011)

**Fig. 2.**

This figure compares our study population's seroprevalence rates with those found in the literature. Vertical axis: percentages of seroprevalence; fair columns: our data; dark columns: data published elsewhere \*(personal communication, Eva Hamšíková, Prague 2011)

## DISKUSE

Navzdory velikosti zkoumaného souboru a zahrnutí řady uropatogenních mikroorganismů do statistických rozborů se nám nepodařilo prokázat, že by prodělaná urogenitální infekce ovlivňovala biologické chování karcinomu prostaty. Jediným statisticky signifikantním zjištěním byl rozdíl v průměrné výšce GS mezi pacienty s protilátkami proti HPV 6 a jejich séronegativními protějšky. Ačkoliv statisticky významná, z klinického pohledu se tato odlišnost průměrné hodnoty GS 6,45 v séronegativní a 6,75 v séropozitivní skupině nejvíce jako podstatná. Jednak představuje rozdíl 0,3 na škále GS od 2 do 10 přibližně 4% body, jednak – a to je podstatné – se stále pohybujeme v pásmu GS 2–7, pro něž (při splnění dalších kritérií) aktuální guidelines Evropské urologické společnosti doporučují jako hlavní modalitu léčby RRP (14).

V patologii lidského urogenitálního traktu jsou sérotypy HPV 6 a 11 spojovány s benigními slizničními a kožními lézemi – jejich DNA nalézáme v 90% špičatých kondylomat (15). V souvislosti s HPV je zajímavé zmínit postižení jiného orgánového systému. Je jím nezhoubné onemocnění dýchacího traktu –

recidivující respirační papilomatóza, u které dochází asi v 1% případů k malignímu zvratu. Dle publikovaných prací byly v buňkách malignizovaných forem této vzácné choroby detekovány nukleové kyseliny HPV 11, v menším počtu případů i typu HPV 6 (16). V některých případech byla zjištěna integrace HPV do genomu hostitelské buňky či změny v genomu virů, které mohly být příčinou jejich zvýšeného onkogenního potenciálu (17).

V minulosti si řada studií kladla otázku, zda prodělaná infekční onemocnění urogenitálního traktu zvyšují riziko pozdějšího vzniku KP. Většinou se jednalo o rozsáhlé epidemiologické výzkumy, kde k zařazení do skupiny pacientů postačoval pozitivní výsledek punkční biopsie prostaty nebo diagnóza incidentálního karcinomu při transuretrální resekci prostaty či otevřené prostatektomii indikované pro benigní hyperplazii. Bližší údaje charakterizující vlastnosti nádoru se zaznamenávaly jen zřídka a prakticky nikdy nebyvaly publikovány.

Pokud je nám známo, nikdo – a to ani ve světové literatuře – se dosud nezabýval problematikou infekce a karcinomu prostaty z takového úhlu pohledu jako naše studie. Důvodem je nejspíše to, že k provedeným analýzám (sta-

**Tab. 4.** Podmíněně průměrné (tj. vypočítané pouze z reaktivních sér) hladiny titrů sérových protilátek proti jednotlivým patogenům v OD/CO (optická denzita/hodnota cut-off) u pacientů s lokalizovaným a pokročilým onemocněním

**Table 4.** Serum antibody levels for different genitourinary pathogens in patients with localized and locally advanced disease. Only reactive serum samples (OD/CO > 1.0) were considered for the calculation of mean values

Patogen	≤ pT2c	≥ pT3a	p-hodnota Wilcoxonův test
HPV6	2,417	2,776	0,6124
HPV11	3,008	2,268	0,3570
HPV16	4,403	2,910	0,5622
HPV18	1,520	1,482	0,7857
HPV31	2,845	2,409	0,8702
HPV33	–	–	–
CMV	3,695	3,933	0,2062
HSV1	3,765	3,749	0,6058
HSV2	5,853	4,857	0,3427
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,201	1,358	0,3356
<i>Mycoplasma hominis</i>	–	–	–
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	–	–	–
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	–	–	–
<i>Treponema pallidum</i>	–	–	–

novení rozsahu nádoru a definitivního GS) je třeba vyšetřit celou prostatu – tedy preparát z RRP, což je technicky a organizačně náročné a pro tisícové soubory popisované epidemiologi nevhodné. Naše výsledky nenaznačují, že by existoval klinicky významný rozdíl v prevalenci protilátek proti studovaným patogenům v závislosti na gradingu a stadiu KP.

Dosud se také žádná studie nezabývala klinickým vztahem infekce mykoplazmaty a ureaplazmaty a KP. Běžně tyto patogeny působí negonokokové uretritidy, epididymitidy a dle některých prací také chronickou prostatitidou (18). Poslední zmíněná kategorie je zajímavá zejména ve světle recentní studie z USA,

ve které benigní prostatické buňky infikované mykoplazmaty *in vitro* kumulovaly mutace genomu. Po inokulaci těchto buněk laboratorním myším došlo *in vivo* ke vzniku invazivních nádorů (19). Ani v případě ureaplazmat a mykoplazmat jsme na našem souboru nezjistili významné odlišnosti mezi skupinou s prokázanými sérovými protilátkami a séro-negativními kontrolami.

Na závěr naší studie jsme porovnali prevalence protilátek proti studovaným patogenům u pacientů s KP zjištěné v naší studii s údaji uváděnými pro obecnou populaci (viz obr. 1). Zjištěné hodnoty séroprevalence jsou v zásadě srovnatelné, drobné odchylky připisujeme odlišným charakteristikám referenčních populací včetně geografických rozdílů v proměnlivosti jednotlivými patogeny.

Za hlavní možná úskalí naší studie považujeme ne zcela prozkoumanou dynamiku výše sérových protilátek proti některým ze studovaných patogenů a také relativně malou velikost souboru. První zmíněný problém je způsoben nedostatkem publikovaných prací, které by se touto otázkou zabývaly, druhý je dán technickými a finančními omezeními.

## ZÁVĚR

Četnými sérologickými studii ani molekulárně biologickými analýzami nádorové tkáně se dosud nikomu nepodařilo prokázat vliv infekce urogenitálního traktu na etiopatogenezi KP. Naše výsledky potvrzují tato pozorování a dále je rozšiřují o studium vztahu s dalšími, dříve nezkoumanými patogeny. Přítomnost sérových protilátek proti studovaným infekčním agens není spojena s agresivnějším chováním, a tedy horší prognózou karcinomu prostaty. Prodělaná infekce močopohlavního ústrojí zkoumanými patogeny není rizikovým faktorem pro klinicky závažnější průběh tohoto častého nádorového onemocnění. To platí i přesto, že někteří infekční činitelé přenášeni pohlavní cestou jsou prokazatelně onkogenní a u dalších se o této vlastnosti spekuluje.

## LITERATURA

1. **Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice (online). Masarykova univerzita 2005 (cit. 2011–5–14). Dostupný z: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C61&type=pdf>. Verze 7.0 (2007).
2. **Marberger M.** Prostate cancer 2008: Challenges in diagnosis and management. *Eur Urol Suppl* 2009; 3: 89–96.
3. **Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E.** Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277–300.
4. **Hrbáček J, Urban M, Hamsikova E, et al.** Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer* 2011; 11: 53.
5. **Reiner WG, Walsh PC.** An anatomical approach to the surgical management of the dorsal vein and Santorini's plexus during radical retropubic surgery. *J Urol* 1979; 121: 198–200.
6. **Walsh PC.** Anatomic radical prostatectomy. Evolution of the surgical technique. *J Urol* 1998; 160: 2418–2424.
7. **Montironi R, van der Kwast T, Boccon-Gibod L, Bono AV, Boccon-Gibod L.** Handling and pathology reporting of radical prostatectomy specimens. *Eur Urol* 2003; 44: 626–636.
8. **Eble JN, Kauter G, Epstein JI, Sesterhenn I.** Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs (IARC/World Health Organization Classification of Tumours). Lyon, France: IARC Press 2003.
9. **Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL.** ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(9): 1228–1242.
10. **Sobin LH, Wittekind CH.** TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Edition. New York Wiley 2002.
11. **Srigley JR, Amin MB, Epstein JI, et al.** Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(7): 936–946.
12. **Hamsikova E, Smahel M, Sapp M, et al.** Correlation between the presence of anti HPV33 VLP antibodies and HPV DNA in cervical neoplasia patients. *Arch Virol* 1997; 142(2): 413–416.
13. **von Elm E, Altman DG, Egger M, et al.** The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epi* 2008; 61: 344–349.
14. **Heidenreich A, Bolla M, Joniau S, et al.** Guidelines on Prostate Cancer. EAU 2010. s. 55. <http://www.uroweb.org/gls/pdf/Prostate%20Cancer%202010%20June%2017th.pdf>
15. **Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al.** Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers otherthan Cervical and Benign Conditions. *Vaccine* 2008; 26(Suppl 10): K17–K28.
16. **Jeong WJ, Park SW, Shin M, et al.** Presence of HPV type 6 in dysplasia and carcinoma arising from recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck* 2009; 31(8): 1095–1101.
17. **Reidy PM, Dedo HH, Rabah R, et al.** Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *Laryngoscope* 2004; 114: 1906–1909.
18. **Porš J, Kolombo I, Hanuš T, Poršová M.** Sexuálně přenosné nemoci. In: Kolombo I, Hanuš T, eds. *Infekce močových cest pro praktické lékaře a specialisty*. Praha: Galén 2007; 111–113.
19. **Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, et al.** Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS ONE* 2009; 4(9): e6872. doi:10.1371/journal.pone.0006872
20. **Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, et al.** Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988–1994. *Clin Inf Dis* 2006; 43: 1143–1151.
21. **Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, et al.** Seroprevalence and Coinfection with Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in the United States, 1988–1994. *J Infect Dis* 2002; 185: 1019–1024.
22. Zprávy CEM 1998; Suppl 1: 34–36.
23. **Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, et al.** Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(3): 718–725.