

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra ČUK

**RAZREŠEVANJE MEJNIH REZULTATOV TESTA
HYBRID CAPTURE 2 HPV DNA ZA DOKAZOVANJE
VISOKORIZIČNIH HUMANIH VIRUSOV
PAPILOMA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra ČUK

**RAZREŠEVANJE MEJNIH REZULTATOV TESTA HYBRID
CAPTURE 2 HPV DNA ZA DOKAZOVANJE VISOKORIZIČNIH
HUMANIH VIRUSOV PAPILOMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**RESOLVING BORDERLINE RESULTS OF HYBRID CAPTURE 2
HPV DNA TEST FOR DETECTION OF HUMAN
PAPILLOMAVIRUSES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med., za somentorico dr. Edo Vrtačnik Bokal, dr. med. in za recenzenta prof. dr. Maria Poljaka, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Somentorica: izr. prof. dr. Eda Vrtačnik Bokal, dr. med.

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: izr. prof. dr. Eda VRTAČNIK BOKAL, dr. med.

Univerzitetni klinični center, Ginekološka klinika Ljubljana

Član: prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in Imunologijo

Datum zagovora: 14. marec 2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Čuk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 578.7:616.97-006+616-071(043)=163.6
KG medicinska mikrobiologija/humani virusi papiloma/HPV/diagnostične metode/
tekočinska hibridizacija/molekularne metode /Hybrid Capture 2 HPV DNA test /Abbott
RealTime HPV High Risk test/genotipizacija
AV ČUK, Petra
SA SEME, Katja (mentorica)/VRTAČNIK BOKAL, Eda (somentorica)/ POLJAK, Mario
(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2011
IN RAZREŠEVANJE MEJNIH REZULTATOV TESTA HYBRID CAPTURE 2 HPV
DNA ZA DOKAZOVANJE VISOKORIZIČNIH HUMANIH VIRUSOV
PAPILOMA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 45 str., 3 pregl., 4 sl., 52 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Humani papiloma virusi (HPV) se razmnožujejo v bazalnih celicah ploščatega epitelija in tako povzročijo nastanek različnih novotvorb, tako benignih, kot malignih. Dolgotrajna okužba z enim izmed visokorizičnih genotipov HPV, je primarni vzrok za nastanek patoloških sprememb celic epitelija materničnega vratu, kar lahko vodi v nastanek malignih tumorjev. Zaradi dolgotrajnega razvoja in učinkovitega odkrivanja predrakavih sprememb lahko stopnjo incidence raka materničnega vratu zmanjšamo. Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) (Qiagen) je eden izmed štirih komercialno dostopnih testov za rutinsko dokazovanje HPV okužb, ki jih je odobrila FDA. Njegova glavna pomanjkljivost so lažno pozitivni rezultati, ki se pojavijo zaradi navzkrižne reakcije z ostalimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test in so najpogosteje prisotni pri vzorcih z mejno pozitivnim rezultatom. Transportno gojišče ThinPrep® je eno izmed dveh gojišč, ki se uporablja za transport vzorcev, odvzetih za testiranje s hc2 (Qiagen). Za vzorce shranjene v tem gojišču, proizvajalec testa hc2 predlaga sivo območje, ki zajema vrednosti 1,0–2,5 RLU/CO, za razreševanje HPV-statusa le-teh, pa priporoča zelo zamuden algoritem razreševanja, ki vključuje tudi do dve ponovitvi testa hc2. Namen diplomske naloge je bilo ugotoviti pogostost pojavljanja mejnih rezultatov testa hc2 (Qiagen) pri primarnem HPV testiranju in primerjava proizvajalčevega algoritma za razreševanje HPV statusa, v vzorcih z rezultatom v sivem območju, z zelo specifičnim Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.). Ugotovili smo, da je pogostost mejnih rezultatov pri primarnem HPV testiranju znašala 2,2 %. Proizvajalčev algoritem za razreševanje HPV-statusa v sivem območju (1,0–2,5RLU/CO) za vzorce shranjene v ThinPrep gojišču, je zelo zamuden, njegova specifičnost pa je nizka (62,5 %). Neposredni pristop razreševanja HPV-statusa v vzorcih z rezultatom hc2 v sivem območju z Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.) je 100 % specifičen in hitrejši kot algoritem proizvajalca za hc2.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 578.7:616.97-006+616-071(043)=163.6
- CX medical microbiology/papillomaviruses/HPV/diagnostic methods/ hybridization/
molecular methods /Hybrid Capture 2 HPV DNA test /Abbott RealTime HPV High
Risk test/genotyping
- AU ČUK, Petra
- AA SEME, Katja (supervisor)/VRTAČNIK BOKAL, Eda (co-advisor)/POLJAK, Mario
(reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2011
- TY RESOLVING BORDERLINE RESULTS OF HYBRID CAPTURE 2 HPV DNA
TEST FOR DETECTION OF HUMAN PAPILOMAVIRUSES
- DT Graduation Thesis (University Studies)
- NO XI, 45 p., 3 tab., 4 fig., 52 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Human papillomaviruses (HPV) infect squamous epithelial cells and are thus capable to cause different types of lesions/masses, which can be benign or malignant. The most important is a persistent infection with one of high-risk genotypes of HPV, which can lead to pathological transformations in squamous epithelia and cervical cancer. For its long progression, the incidence of cervical cancer can be efficiently reduced. Hybrid Capture 2 HPV DNA (Qiagen) test is at present one amongst four commercially available assays for routine detection of HPV, approved by FDA. This assay, can occasionally produce false positive results on behalf of its cross-reactivity with HPV genotypes not included in current hc2 high-risk probe cocktail, which occur in specimen with borderline hc2 result. Two different mediums are used for transportation of cervical swabs. For samples collected in ThinPrep® medium (Hologic Inc.), the manufacturer recommends a grey-zone (1.0-2.5 RLU/CO) in which all the samples should be retested. This algorithm includes more than one retesting with hc2 assay. The aim of our study, was to determine the frequency of hc2 borderline results and compare the manufacturer's algorithm for resolving borderline results with real-time PCR Abbott HR HPV assay (Abbott Molecular Inc.). The frequency of hc2 borderline results in this study was 2.2%. Manufacturer's algorithm for resolution of HPV-status, for samples collected in ThinPrep® with results in grey-zone (1.0-2.5 RLU/CO), was time-consuming and had a low specificity (62.5 %). A direct approach for resolving HPV-status with the Abbott HR HPV assay (Abbott Molecular Inc.) was faster and had 100 % specificity in comparison to hc2 algorithm for samples with result within a grey-zone.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HUMANI PAPILOMA VIRUSI.....	3
2.1.1 Zgradba HPV	5
2.1.2 Razmnoževanje/patogeneza HPV	6
2.1.3 Epidemologija	10
2.1.4 Zdravljenje in preprečevanje okužb s HPV	12
2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽB S HPV.....	15
2.2.1 Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2)	18
2.2.2 Abbott RealTime High Risk HPV Test (Abbott HR HPV)	19
3 MATERIALI IN METODEDE	21
3.1 VZORCI	21
3.2 METODEDE	21
3.2.1 Konverzija (Hybrid Capture 2 Sample Conversion Kit).....	22
3.2.2 Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2)	23
3.2.3 Abbott RealTime HPV High Risk Test	26
3.2.4 Genotipizacijske metode	28
4 REZULTATI.....	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	34

5.1	ANALIZA REZULTATOV	34
5.2	SKLEPI.....	37
6	POVZETEK.....	38
7	VIRI	39
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Postopek testa hc2 (Qiagen).....	25
Preglednica 2: Ujemanje rezultatov pridobljenih s hc2 in Abbott HR HPV testom za 101 vzorec z vrednostmi v sivem območju	31
Preglednica 3: Primerjava neskladnih rezultatov pridobljenih z hc2 in Abbott HR HPV testom, za 101 vzorec (bris materničnega vratu)z vrednostmi v sivem območju, z rezultati genotipizacije.....	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba genoma HPV-16 (Stanley in sod., 2007).....	6
Slika 2: Življenjski cikel HPV (Moody in Laimins, 2010).....	10
Slika 3: Postopek obdelave vzorcev po sprejemu v laboratorij	27
Slika 4: Rezultati testiranja 101 vzorca z vrednostmi v sivem območju (med 1,0–2,5 RLU/CO) pridobljeni z hc2 in Abbott HR HPV testom	30

KAZALO PRILOG

Priloga A: Skladnost vseh rezultatov, pridobljenih z hc2 in Abbott HR HPV testom, v primerjavi z rezultati genotipizacije

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija
CO	mejna vrednost (angl. cutoff value)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
FDA	ameriška Agencija za Hrano in Zdravila (angl. Food & Drug Administration)
hc2	Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Qiagen, Hilden, Nemčija)
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
HPV	humani papiloma virusi (angl. human papillomaviruses)
IgG	protitelesa imunoglobulinskega razreda G
ORI	mesto začetka replikacije (angl. origin of replication)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RLU	relativne svetlobne enote (angl. relative light units)
Rb	beljakovine retinoblastomske družine (angl. retinoblastom)
VLP	virusom podobni delci (angl. virus like particles)

1 UVOD

Humani papiloma virusi (HPV), ki jih taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, so zelo heterogena skupina majhnih virusov, ki so odgovorni za številne benigne in maligne novotvorbe ploščatoceličnega epitelija (Poljak in sod., 2005).

Rak materničnega vratu se razvije preko več stopenj predrakavih sprememb. Nedvomno je dokazano, da je dolgotrajna okužba z enim izmed visokorizičnih genotipov nujno potrebna za nastanek malignih novotvorb, dedni material HPV pa je prisoten kar v 99,7 % primerih malignih tumorjev materničnega vratu (Bosch in de Sanjosé, 2002; Moody in Laimins, 2010; Trottier in Franco, 2006). Taka vrsta raka tako ostaja drugi najpogostejši vzrok za smrt med ženskami po celem svetu. Med HPV genotipi, ki so odgovorni za nastanek le-tega, je najpogostejši in najpomembnejši HPV-16, ki je bil dokazan v 50–70 % primerov, sledi pa mu HPV-18 z 7–20 % prisotnostjo (Stanley in sod., 2007).

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) (Qiagen, Hilden, Nemčija) je komercialno dostopen test za rutinsko dokazovanje HPV okužb, njegova glavna pomanjkljivost pa so lažno pozitivni rezultati, in sicer zaradi navzkrižne reakcije z ostalimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test (Poljak in sod., 2002). Lažno pozitivni rezultati se pojavljajo najpogosteje pri vzorcih z mejno pozitivnim rezultatom. Transportno gojišče ThinPrep®PreservCyt® je eno izmed dveh gojišč, ki se uporablja za transport vzorcev, odvzetih za testiranje s hc2 (Qiagen). Za vzorce shranjene v tem gojišču proizvajalec testa hc2 predlaga sivo območje, v katerega spadajo vsi vzorci z rezultati med 1,0–2,5 svetlobnih enot/mejna vrednost (RLU/CO). Za razreševanje HPV-statusa v vzorcih z rezultatom v sivem območju proizvajalec priporoča zelo zamuden algoritem razreševanja, ki vključuje tudi do dve ponovitvi testa hc2.

V prvem delu naloge želimo ugotoviti pogostost pojavljanja mejnih rezultatov testa hc2 (Qiagen) pri primarnem HPV testiranju. V drugem delu želimo primerjati proizvajalčev algoritem razreševanja HPV-statusa v vzorcih z rezultatom v sivem območju z bolj neposrednim pristopom, ki vključuje uporabo analitično zelo specifičnega Abbott RealTime High Risk HPV testa (Abbott Molecular Inc.).

1.1 NAMEN DELA

Pogostost pojavljanja mejnih rezultatov testa hc2 (Qiagen) pri primarnem HPV testiranju je lahko tudi do 8 % (Seme in sod., 2006). Neposredni pristop razreševanja HPV-statusa v vzorcih z rezultatom v sivem območju je hitrejši, analitično bolj specifičen in cenovno bolj ugoden kot algoritem proizvajalca za hc2.

V prvem delu naloge smo želeli ugotoviti pogostost pojavljanja mejnih rezultatov testa hc2 (Qiagen) pri primarnem HPV testiranju. V drugem delu, pa smo primerjali proizvajalčev algoritem razreševanja HPV-statusa v vzorcih z rezultatom v sivem območju, z bolj neposrednim pristopom, ki vključuje uporabo analitično zelo specifičnega testa HPV.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANI PAPILOMA VIRUSI

Viruse papiloma (PV) taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ki po najnovejših raziskavah obsega 31 rodov, v katere spada 217 PV in od tega je 146 humanih virusov papiloma (HPV) (Burk, 2010).

Rodovi so poimenovani z grško abecedo in vsi genotipi HPV so porazdeljeni v 5 rodov. Rod alfa vsebuje 13 vrst HPV in 1 vrsto opičjega PV, rod beta vsebuje 5 vrst HPV in 1 vrsto opičjega PV, rod gama vsebuje 10 vrst HPV, rod mu vsebuje 2 vrsti HPV, rod nu pa vsebuje 1 vrsto HPV (Bernard in sod., 2010). Največji in klinično najpomembnejši je rod alfa, kamor uvrščamo visokorizične in nizkorizične genotipe HPV, ki jih povezujemo z nastankom novotvorb na koži in sluznicah (Bernard in sod., 2006).

Nukleotidno zaporedje strukturne beljakovine L1 je najbolj ohranjeno zaporedje v genomu HPV in se zato uporablja za identifikacijo in taksonomsko razvrščanje novih virusnih genotipov (de Villiers in sod., 2004).

Kot posamezen rod se opredeli skupino HPV, ki z drugo skupino HPV deli manj kot 60 % nukleotidnega zaporedja L1. Virus, katerega nukleotidno zaporedje gena L1 kaže več kot 10 % odstopanje v primerjavi z nukleotidnimi zaporedji L1 uradno priznanih genotipov HPV, opredelimo kot nov genotip HPV. Če razlika v nukleotidnem zaporedju varira med 2–10 %, opredelimo nov virus kot virusni podtip, razlika manjša od 2 % pa opredeli nov virus kot podtipsko različico enakega genotipa (de Villiers in sod., 2004). Genotipi HPV so oštevilčeni po vrstnem redu osamitve in ne po bioloških lastnostih ali po genomski sorodnosti (Poljak in sod., 2005).

HPV lahko razvrščamo tudi glede na njihovo tarčno tkivo, oziroma tropizem HPV za določeno vrsto epitela. Delimo jih v 4 skupine:

- **Sluznični oziroma anogenitalni genotipi HPV:** povzročajo transformacije ploščatoceličnega epitela sluznic. Glede na to ali povzročajo benigne ali maligne novotvorbe jih delimo še na visokorizične, verjetno visokorizične, nizkorizične in genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom.
- **Nesluznični oziroma kožni genotipi HPV:** najpogosteje povzročijo benigne kožne novotvorbe oziroma navadne kožne bradavice.
- **Kožno-sluznični genotipi HPV:** okužijo poroženeli in neporoženeli večvrstni ploščatocelični epitel.
- **EV-HPV genotipi:** virusi so bili prvotno izolirani iz novotvorb pri bolnikih z dedno boleznijo, ki se imenuje bradavičasta epidermodisplazija oziroma *epidermodysplasia verruciformis*. Značilne spremembe povrhnjice se razvijajo le pri majhnem delu okuženih, ki so imunsko kompromitirani (po presaditvi, HIV okužba) (Poljak in sod., 2005).

Po zadnjih raziskavah, med visokorizične genotipe HPV uvrščamo HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59. Povezujemo jih z nastankom raka na materničnem vratu, medtem ko nizkorizični genotipi HPV povzročajo nastanek benignih novotvorb.

Posebnost je genotip HPV-68, ki je edini »verjetno« visokorizični HPV genotip, medtem ko genotipe 26/30/34/53/66/67/69/70/73/82/85/97 uvrščajo v skupino »mogoče« visokorizičnih genotipov, saj je še premalo dokazov o njihovi nedvomni povezavi z nastankom raka materničnega vratu (Bouvard in sod., 2009).

2.1.1 Zgradba HPV

HPV so majhni goli virusi s krožnim dvojnovijačnim DNA genomom velikosti približno 8000 baznih parov (bp), ki vsebuje 8 genov (de Villiers in sod., 2004). Kapsida je ikozaedrične oblike in je sestavljena iz 72 pentamerov strukturne beljakovine L1 ter 12 molekul strukturne beljakovine L2 (Sapp in Day, 2009). Kljub njihovi majhnosti imajo zelo kompleksno zgradbo.

Virusni genom sestavljajo kodirajoča in nekodirajoča območja, ki so ponazorjena na sliki 1 (Poljak in sod., 2005). Kodirajoče regije delimo na zgodnje območje E (angl. early), ki zavzema več kot 50 % virusnega genoma in pozno območje L (angl. late), ki zavzema približno 40 % virusnega genoma (Zheng in Baker, 2006).

Geni E (E1-E7) so povezani s podvojevanjem virusa, uravnavanjem prepisovanja virusnega genoma in transformacijo okuženih celic. Virusni beljakovini E6 in E7 opredeljujejo kot onkogene, saj sta najpomembnejši pri nastajanju novotvorb, ki so rezultat okužbe s HPV (Poljak in sod., 2005). E1 in E2 sta regulatorni beljakovini, ki uravnata podvojevanje in prepisovanje virusnega genoma (de Villiers in sod., 2004).

Vloga E4 še ni povsem znana, predvidevajo pa, da je povezana s porušenjem citokeratinske mreže, ki omogoči lažji izstop virusnih delcev iz okužene celice (Poljak in sod., 2005).

Območje L vsebuje gena L1 in L2, ki nosita zapis za strukturni beljakovini in tvorita virusno kapsido. L1 območje je najbolj ohranjen nukleotiden zapis, ki je skupen vsem članom družine *Papillomaviridae* (de Villiers in sod., 2004).

Med L1 in E6 se v virusnem genomu HPV nahaja dolga kontrolna regija (LCR) oziroma URR (angl. upstream regulatory region), dolga približno 400–700 baznih parov, ki ne kodira zapisov za beljakovine. URR vsebuje mesto za začetek replikacije (ORI angl. origin of replication), zgodnje promotorje in vezavna mesta za različne transkripcijske faktorje (Chow in sod., 2010).

URR regija:

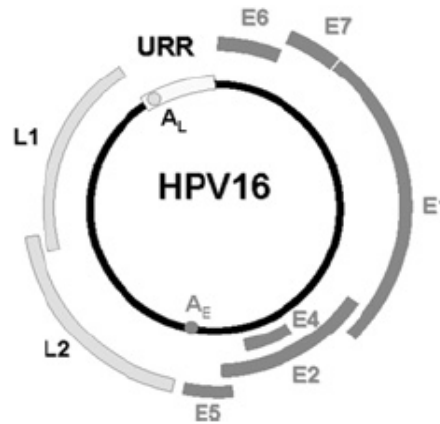
Zgodnji promotorji in vezavna mesta za različne transkripcijske faktorje

ORI mesto

Pozni geni:

L1- večji protein virusne kapside

L2- manjši protein virusne kapside



Zgodnji geni:

E1- podvojevanje

E2- podvojevanje in prepisovanje

E4- izstopenje virusa (?)

E5- transformacija (?)

E6- transformacija

E7- transformacija

Slika 1: Zgradba genoma HPV-16 (Stanley in sod., 2007)

2.1.2 Razmnoževanje/patogeneza HPV

HPV se razmnožuje v bazalnih celicah ploščatega epitelija, ki so tudi mesto samega začetka okužbe s HPV (Poljak in sod., 2005). Do okužbe pride z nastankom mikroranic, ki virusom omogočijo dostop do bazalnih plasti (Chow in sod., 2010).

HPV imajo zelo neobičajen cikel razmnoževanja, ki je prikazan na sliki 2. Sinteza novih virionov poteče le, če je okužena celica vstopila v mitozo in če se je ena od njenih hčerinskih celic pričela diferencirati (Moody in Laimins, 2010). Bazalne celice so še nediferencirane in njihova posebnost je neprestana delitev, medtem ko se diferencirani keratinociti v višjih plasteh epitelija ne delijo več. HPV so v keratinocitih prisotni v episomalni obliki in ker HPV genom ne nosi zapisov za polimerazo ali katere druge encime potrebne za virusno podvojevanje, je tako virus popolnoma odvisen od gostiteljske celice. Pri HPV okužbi nekatere bazalne celice ostanejo aktivne tudi po diferenciaciji in še enkrat vstopijo v S fazo mitotske delitve v zgornjih plasteh epitela ter na ta način omogočijo podvojevanje HPV genoma (Cheng in sod., 1995). Temu procesu sledi sinteza

kapsidnih proteinov, sestavljanje virionov in sprostitvev iz okuženih celic. Dozorevanje virusov poteka skladno s potekom diferenciacije keratinocitov – prične se v bazalni plasti in zaključi se na površju epitelija, kjer se keratinociti dokončno diferencirajo in se iz njih sprosti zrel virus (Stanley, 2006).

Najmanjše število kopij virusne DNA je prisotno v bazalni plasti epitelija, povišan nivo virusne DNA in mRNA se pojavi v višjih plasteh, kjer se bazalni keratinociti diferencirajo v spinozne celice, medtem ko so proteini kapside prisotni le v nekaterih površinskih celicah (Chow in sod., 2010). Takrat, ko se okuženi keratinociti pričnejo diferencirati in se prične pospešeno izražanje virusnih genov ter virusno podvojevanje, naj bi bilo število virusnih kopij/celico približno 1000 (Stanley in sod., 2007).

Glede na to, da vsaka okužba s HPV ne vodi do nastanka malignih transformacij, sklepamo, da so za to potrebne dodatne genetske spremembe (Duensing in Munger, 2004). HPV onkobeljakovine E5, E6 in E7 so primarni virusni dejavniki, ki povzročajo genomsko nestabilnost in vodijo v nastanek karcinogeneze.

V predrakavih spremembah ploščatega epitelija se HPV genom nahaja v episomalni obliki, medtem ko je pri malignih spremembah vsaj del genoma integriran v genom gostiteljske celice (Poljak in sod., 2005). Integracija v gostiteljski genom prekine nukleotidno sekvenco E2 gena in sproži izražanje zgodnjih virusnih genov E6 in E7 (Jeon in sod., 1995). Virusni beljakovini E6 in E7 sta nujni za vzdrževanje transformiranega fenotipa okuženih celic (Francis in sod., 2000; Goodwin in DiMaio, 2000). Njunsko skupno delovanje vzdržuje celično S fazo in zaobide preverjanje določenih kontrolnih točk, ki skrbijo za pravilno podvojevanje celice (Moody in Laimins, 2010).

Transformacija gostiteljskih celic se prične z delovanjem E7 in E6, ki sta obe majhni beljakovini, veliki približno 18 in 13 kDa ter sta lokalizirani v jedru (Moody in Laimins, 2010). Virusne beljakovine E6 so našli prisotne tudi v celični citoplazmi (McLaughlin-Drubin in Munger, 2009; Howie in sod., 2009). Visokorizični genotipi HPV vsebujejo beljakovine E7, ki lahko že v nizkih koncentracijah naredijo človeške keratinocite nesmrtni, medtem ko pri E6 niso zaznali take aktivnosti, vendar kombinacija obeh

onkobeljakovin omogoča nesmrtnost pri več različnih tipov primarnih celic (Hawley-Nelson in sod., 1989).

Beljakovini E6 in E7 povzročata pospešeno delitev nediferenciranih in diferenciranih bazalnih celic in zavirata celično apoptozo, kar vodi do vedno večjih poškodb DNA/mutacij in postopoma nastanek malignih transformacij (Moody in Laimins, 2010).

Onkogene beljakovine E7 imajo sposobnost vezave z beljakovinami retinoblastomske družine (Rb), v katero spadata tudi proteina p107 in p300, ki so tumorski zaviralci in nadzorujejo prehod iz G1 v S-fazo z regulacijo transkripcijskega faktorja E2F. E2F vezavna mesta so najdena na različnih genskih promotorjih, ki nadzorujejo celični cikel, diferenciacijo, mitotsko delitev in celično smrt (DeGregori in Johnson, 2006). V pozni G1 fazi ciklin kinazni kompleksi fosforilirajo beljakovino Rb, kar povzroči disociacijo E2F faktorja in s tem prehod v S-fazo celičnega cikla (Stevaux in Dyson, 2002). Vezava visokorizičnih onkobeljakovin E7 na Rb omogoči prezgodnji vstop v S fazo in sintezo DNA, ki je nujno potrebna za virusno replikacijo, hkrati pa tudi označijo beljakovine Rb za razgradnjo po ubikvitinski poti (Cheng in sod., 1995; Longworth in Laimins, 2004; Boyer in sod., 1996). Uničenje beljakovin Rb omogoča, da E7 že v nizkih koncentracijah preprečuje združevanje Rb, p107 ali p130 z E2F. S tem onemogoči popravilo DNA in ruši genomsko stabilnost in omogoči replikacijo v že diferenciranih celicah (Longworth in Laimins, 2004).

Vse beljakovine E7 HPV se vežejo na Rb, vendar imajo beljakovine E7 visokorizičnih HPV do 10-krat višjo afiniteto (Bharti in sod., 2009).

Aktivnost beljakovine E7 povzroči porast beljakovine p53, ki deluje kot tumorski supresor. Tu nastopi onkobeljakovina E6, ki skupaj z ubikvintin ligazo tvori E6-AP kompleks. Ta se veže na p53 in s tem povzroči njegovo ubikvitinacijo in razgradnjo s pomočjo proteasoma 26S (Bharti in sod., 2009). E6 se veže tudi na koaktivator molekule p53, ki je p300/CBP protein in tako zmanjša njegovo aktivnost (Kumar in sod., 2002).

Visokorizične HPV beljakovine E6 aktivirajo tudi prepis telomerazne reverzne transkriptaze (TERT), ki je poleg inaktivacije Rb beljakovin zelo pomembna za celično nesmrtnost (Howie in sod., 2009).

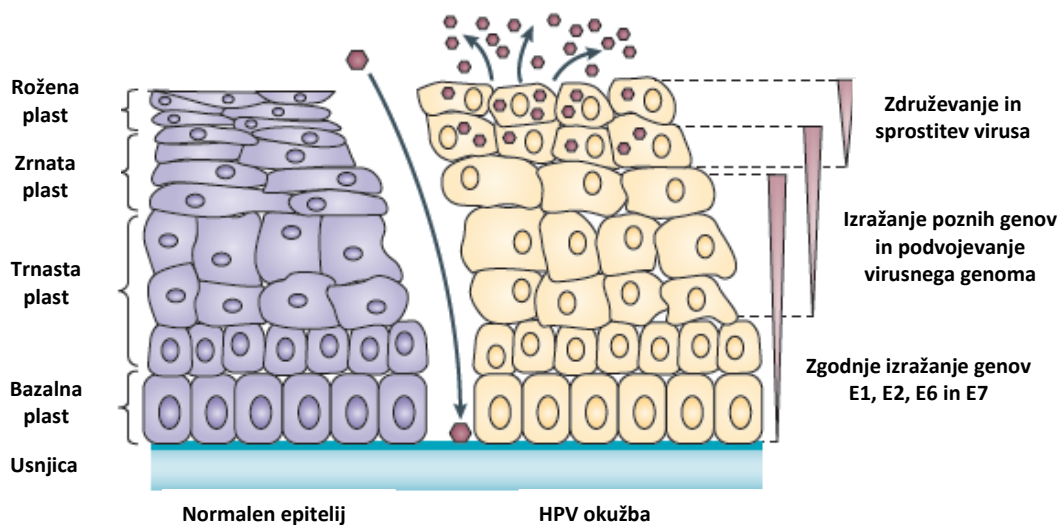
Izražanje E7 in E6 naj bi izzvalo tudi napake pri mitozih npr. multipolarno mitozo, anafazne spremembe in aneuploidijo, ki se lahko pojavi zaradi centrosomskih nepravilnosti (Duensing in sod., 2009; Yugava in Kiyono, 2009).

Kljub temu, da sta beljakovini E6 in E7 najbolj odgovorni za transformacijo okuženih celic, tudi beljakovina E5 prispeva k onkogenezi. Virusne beljakovine E5 so majhni hidrofobni peptidi, ki so primarno lokalizirani na endoplazmatskem retikulumu (Conrad in sod., 1993). Povečali naj bi delovanje onkobeljakovin E6, E7 in negativno regulirali poglavitni histokompatibilnostni kompleks I (MHCI angl. major histocompatibility complex I) ter s tem preprečili ustrezen imunski odziv (Ashrafi in sod., 2006).

Zadnji del cikla HPV okužbe poteka v zgornjih plasteh epitelija, kjer so keratinociti popolnoma diferencirani in se ne delijo več. Tu pride do izražanja poznih virusnih genov, ki kodirajo zapis za virusne beljakovine L1 in L2. Sledi sestavljanje kapside in nato sproščanje zrelih virionov, ki so sposobni okužiti sosednje celice (Poljak in sod., 2005).

Kot posledica razmnoževanja HPV nastanejo v povrhnjih epiteljskih celicah značilne morfološke spremembe, imenovane koilocitoza. Za koilocite so značilna skrčena, hiperkromna jedra različnih oblik, kromatin je grudast, okoli jeder pa se pojavlja značilen svetel pas ali halo (Poljak in sod., 2005).

Čas, potreben za popolno diferenciacijo keratinocitov je 6–12 tednov in je hkrati tudi čas, ki poteče od začetka okužbe do sproščanja novih virusnih delcev (Stanley in sod., 2007).



Slika 2: Življenjski cikel HPV (Moody in Laimins, 2010)

2.1.3 Epidemologija

Nedvomno je dokazano, da je dolgotrajna okužba z enim izmed visokorizičnih genotipov HPV, ki se prenašajo spolno, nujno potrebna za nastanek malignih tumorjev, kot je rak na materničnem vratu (Bosch in de Sanjosé, 2002; Moody in Laimins, 2010).

Dedni material HPV je prisoten kar v 99,7 % primerih malignih tumorjev materničnega vratu (Trottier in Franco, 2006).

Okužba s temi virusi je primarni vzrok za nastanek patoloških sprememb celic epitelija materničnega vratu, ki so poznane kot cervikalna intraepitelijska neoplazija (CIN) (Yugava in Kiyono, 2009). Večina CIN nižje stopnje (CIN1) spontano regresira, medtem ko lahko CIN višje stopnje (CIN2, CIN3) napredujejo v invazivni karcinom (Melnikow in sod., 1998).

Približno 500.000 novih primerov raka materničnega vratu se pojavi vsako leto, umre pa okoli 274.000 žensk (Ma in sod., 2010; Chauhan in sod., 2009). Taka vrsta raka tako ostaja drugi najpogostejši vzrok za smrt med ženskami po celem svetu. Najpogosteje ga povzročajo visokorizični genotipi HPV-16, HPV-18 in HPV-31, ki so prisotni v več kot 90 % primerov malignih transformacij (Yugava in Kiyono, 2009). Med njimi je najpogostejši in najpomembnejši HPV-16, ki je bil dokazan v 50–70 % primerov, sledi pa mu HPV-18 z 7–20 % prisotnostjo (Stanley in sod., 2007).

Register raka Republike Slovenije je leta 2008 zabeležil 130 novih primerov na 100.000 žensk, kar pomeni, da je bila stopnja incidence raka materničnega vratu 12,6.

V meta-analizi, ki je vsebovala podatke iz 38 študij so določili 5 najpogostejših HPV genotipov pri ženskah z normalno citologijo. Med HPV pozitivnimi ženskami je prevladoval HPV-16 (25,5 %), sledili so mu HPV-18 (7,5 %), HPV-31 (6,1 %), HPV-58 (5,6 %), HPV-52 (4,5 %) in ostali HPV genotipi (50,8 %) (Bosch in de Sanjosé, 2007).

Namesto genotipa HPV-31 se na tretjem mestu zelo pogosto pojavlja tudi visokorizični genotip HPV-45, kar je dokazala Munozeva s sodelavci, ko je preučevala distribucijo različnih HPV genotipov pri osebah z rakom na materničnem vratu, v 5 različnih območjih po celem svetu. Prevalenca genotipa HPV-45 je variirala v območju med 5,6–15,0 % (Munoz in sod., 2004).

Različni genotipi HPV so odgovorni tudi za razvoj malignih sprememb na zunanjih spolovilih (vulva, vagina in penis) in anusu, lahko pa povzročajo tudi rekurentno respiratorno papilomatozo (RRP angl. recurrent respiratory papillomatosis) ter raka vratu in glave (Yugava in Kiyono, 2009). Okužbi z visokorizičnimi genotipi HPV pripisujejo 85 % raka anusa, 50 % raka vulve, vagine in penisa ter 20 % raka orofarinksa (Trottier in Franco, 2006).

Nizkorizična genotipa HPV-6 in HPV-11 sta najpogostejša povzročitelja genitalnih bradavic (lat. *condylomata acuminata*), rekurentne respiratorne papilomatoze in cervikalne intraepitelijske neoplazije nizke stopnje (CIN1) (Giuliano in sod., 2008).

HPV okužbe so najbolj razširjene spolno prenosljive okužbe med spolno aktivnimi posamezniki. Prevalenca HPV okužb med ženskami po celem svetu je v zadnjem času ocenjena na 10,5 % in močno varira glede na populacijo ter geografsko območje (Chauhan in sod., 2009). Z epidemiološkimi študijami so dokazali, da je najvišja pri mlajših spolno aktivnih osebah in da s staranjem upada, vendar je možno, da se pred ali po menopavzi lahko ponovno poveča zaradi reaktivacije virusa (Trottier in Franco, 2006).

Prenos HPV večinoma poteka preko direktnega stika kože s kožo/sluznico, najpogosteje s spolnimi odnosi (Winer in sod., 2003).

HPV okužba najpogosteje izzveni sama od sebe. Pri 70 % žensk okuženih z določenim genotipom po 12 mesecih od okužbe genotipa ne zaznamo več, po 18 mesecih od okužbe pa je takih žensk 80 % (Ho in sod., 1998).

2.1.4 Zdravljenje in preprečevanje okužb s HPV

Rak materničnega vratu, je predvsem v razvitih državah za rakom dojke drugi najpogostejši rak pri ženskah. Zaradi dolgotrajnega razvoja in učinkovitega odkrivanja predrakavih sprememb lahko stopnjo incidence raka na materničnem vratu zmanjšamo (Poljak in sod., 2005).

Trenutno ne poznamo specifičnega protivirusnega zdravljenja okužbe s HPV. Obstoječi načini zdravljenja temeljijo na kirurški ali nekirurški odstranitvi lezij s pomočjo kriokirurgije, elektrokavterizacije, različnih laserjev in konizacije s hladnim nožem. Način odstranitve je odvisen od mesta nahajanja spremenjenega tkiva. Okužbo lahko zdravimo tudi z različnimi imunomodulatorji kot sta na primer interferon- α in imikvimod (Poljak in sod., 2005; Chow in sod., 2010).

Rak materničnega vratu se razvije preko več stopenj predrakavih sprememb in ravno zaradi njegovega počasnega razvoja, ga lahko preprečimo z učinkovitim presejalnim programom (Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010).

Najbolj znan in zelo pogosto uporabljen test namenjen v presejalne namene je Papanicolaou test (PAP), ki ga je leta 1943 razvil George Papanicolaou, predstavlja pa pomemben mejnik v zgodovini preventivne medicine. Test temelji na ustrezni pripravi in barvanju citoloških preparatov, na podlagi katerih odkrivamo predrakavo in rakavo spremenjene celice (Bernard, 2005; Bukhari in sod., 2010; Jančar in Vrtačnik Bokal, 2010). Kljub temu da je njegova občutljivost nizka, je visoko učinkovit, če se uporablja dovolj pogosto in množično. Izvajanje presejalnega PAP testiranja, je incidenco raka materničnega vratu znižalo za več ko 80 % (Moody in Laimins, 2010).

Veliko raziskav o preprečevanju HPV okužbe je bilo izvedenih v zadnjih letih in pred kratkim sta komercialno dostopni postali dve profilaktični cepivi, kar predstavlja pomemben mejnik na področju preprečevanja raka materničnega vratu. Cepivi vsebujeta virusom podobne delce (VLP angl. virus like particles) in s tem omogočata nastanek protiteles proti L1, ki je glavna plaščna beljakovina HPV (Ma in sod., 2010). VLP ne vsebujejo virusne DNA in zaradi tega ne morejo okužiti človeških celic, se v njih razmnoževati ali povzročiti okužbe.

S cepljenjem spodbudimo nastanek anti-HPV nevtralizirajočih protiteles razreda IgG, ki se izločajo iz seruma v sluznični matriks in tako preprečujejo vstop HPV v gostiteljsko celico. Protitelesa so specifična, kar pomeni, da ščitijo le pred okužbo z genotipi HPV, ki so vključeni v cepivo (Poljak, 2007).

Junija 2006 je ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration, FDA) odobrila štirivalentno cepivo družbe Merck z imenom Gardasil®/Silgard®, ki vsebuje VLP visokorizičnih genotipov HPV-16/HPV-18 in nizkorizičnih genotipov HPV-6/HPV-11 za ženske stare od 9 do 26 let. Drugo profilaktično cepivo z imenom Cervarix® (GlaxoSmithKline) je FDA odobrila oktobra 2009. Cepivo je bivalentno in ščiti le proti visokorizičnima genotipoma HPV-16 in HPV-

18, namenjeno pa je ženskam od 10 do 25 let (Ma in sod., 2010). Cepivi sta pokazali tudi navzkrižno reaktivnost med genotip-specifičnimi protitelesi anti-HPV in naj bi tako ščitili tudi pred nekaterimi genotipi HPV, ki niso vključeni v cepivo (Stanley, 2009).

Program cepljenja vsebuje 3 odmerke cepiva v časovnem razmiku 0, 2 in 6 mesecev. Obe cepivi proti HPV sta izključno profilaktični in nista namenjeni izvajanju kakršnihkoli terapevtskih ukrepov (Poljak, 2007). Doslej opravljene raziskave so pokazale, da sta cepivi učinkoviti in naj bi uspešno preprečevali nastanek lezij z visokorizičnima genotipoma HPV-16/HPV-18 tudi do 6,4 let (Cervarix®), oziroma 5 let (Silgard®/Gardasil®) po cepljenju (Ma in sod., 2010; Stanley, 2009). Cepivi uspešno preprečita začetno okužbo s HPV, vendar nista učinkoviti pri preprečevanju nastanka raka materničnega vratu pri že okuženih osebah (Moody in Laimins, 2010).

Kljub temu da sta cepivi pokazali visoko učinkovitost, je presejalno PAP testiranje še vedno izjemno pomembno, saj lahko pride do okužb tudi z drugimi visokorizičnimi genotipi, ki niso zajeti v cepivu, vendar prav tako povzročajo maligne transformacije celic materničnega vratu (Moody in Laimins, 2010).

V razvoju in v zgodnji fazi kliničnega preizkušanja je nekaj terapevtskih cepiv, s katerimi naj bi v prihodnosti močno omejili razvoj novotvorb povzročenih s HPV. Terapevtska cepiva spodbujajo nastanek celičnega imunskega odziva in citotoksičnih limfocitov T, ki prepoznajo in uničijo s HPV okužene celice, vključno s tumorskimi celicami. Usmerjena so proti zgodnjim virusnim beljakovinom E2, E6 in E7 (Ma in sod., 2010; Poljak, 2007).

2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽB S HPV

HPV zaradi njihovega zapletenega življenjskega cikla ne moremo gojiti na celičnih linijah. Preostali neposredni virološki pristopi, kot je na primer elektronska mikroskopija ali imunohistokemijske metode, so premalo občutljivi in specifični za rutinsko diagnostiko HPV. Serološke metode za detekcijo HPV imajo omejeno analitično točnost, njihova klinična uporabnost pa še ni evaluirana. Kakorkoli, vsi testi za rutinsko diagnostiko HPV (»in-house« ali komercialni), ki so v uporabi, temeljijo na zaznavanju značilnih zaporedij virusne HPV DNA v kliničnih vzorcih (Poljak in Kocjan, 2010). Dva najbolj pogosta pristopa, ki se uporabljata za rutinsko diagnostiko, sta hibridizacija z RNA/DNA lovkami, usmerjenimi proti značilnim odsekom HPV genoma, in pa verižna reakcija s polimerazo (PCR), v kateri značilna kratka zaporedja HPV genoma pomnožimo, PCR produkte pa nato dokazujemo na različne načine (gelska elektroforeza, encimska razgradnja, dot blot...) (Poljak in sod., 2005).

Test, ki se najpogosteje uporablja in ima trenutno največjo klinično uporabnost, je **Hybrid Capture 2 HPV DNA Test** (Qiagen, Hilden, Nemčija). Poleg tega testa je FDA za rutinsko uporabo odobrila tudi ViraPap Test (Life Technologies, Silver Spring, ZDA), Cervista HPV HR Test (Hologic, Madison, ZDA) in Cervista HPV 16/18 Test (Hologic).

Najbolj pomembne teste za večkratno (angl. multiplex) detekcijo alfa HPV, ki so trenutno komercialno dostopni delimo v 5 večjih skupin:

- **HR HPV DNA presejalni testi** so kvalitativni oz semi-kvantitativni večkratni testi, ki temeljijo na detekciji tarčne HPV DNA z uporabo različnih mešanic prob. Nobeden od teh testov ne določa prisotnosti posameznega HPV-genotipa v vzorcu, opredelijo ga le kot pozitivnega/negativnega za visokorizične HPV genotipe. Pomembnejši testi, ki spadajo v to skupino, so: Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Qiagen), Cervista HPV HR Test (Hologic) in Amplicor HPV Test (Roche Molecular Systems).

- **HR HPV DNA presejalni testi, ki omogočajo ločeno detekcijo genotipov HPV-16/18**, so skupina novejših testov, ki omogočajo kvalitativno detekcijo 13-14 visokorizičnih HPV genotipov, hkrati pa lahko določijo posamično okužbo z zgoraj omenjenima genotipoma. Določanje prisotnosti genotipov 16/18 predstavlja veliko prednost, saj sta odgovorna za približno 70 % primerov raka materničnega vratu. V to skupino testov spadajo: RealTime High Risk HPV test (Abbott Molecular Inc.), cobas 4800 HPV Test (Roche Molecular Diagnostics), Cervista HPV 16/18 Test (Hologic) in HR-HPV 16/18/45 Probe Set Test (Qiagen).

- **HPV DNA genotipizacijski testi** omogočajo določanje prisotnosti posameznega HPV genotipa v vzorcu in so največja skupina komercialno dostopnih testov. Nepogrešljivi so predvsem v raziskovalnem delu, in sicer pri preučevanju patogeneze, prenosa, razvoja in preprečevanja HPV okužb. Temeljijo na pomnoževanju določenih HPV zaporedij z označenimi začetnimi nukleotidi, ki jih nato preko hibridizacije z različnimi probami ujamemo in določimo. Znotraj skupine jih delimo na reverzno line-blot hibridizacijske teste, kot sta na primer INNO-LIPA HPV Genotyping (Innogenetics) in Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics), teste na mikromrežah, teste, ki uporabljajo Luminex tehnologijo ter elektroforezne teste.

- **Hr-HPV E6/E7 mRNA presejalni testi** omogočajo določanje onkoproteinov E6 in E7 preko njihovih mRNA zapisov. Številne študije so pokazale, da bi lahko bilo Hr-HPV mRNA testiranje klinično uporabno. Komercialno dostopni so PreTect HPV-Proofer (NorChip), NucliSENS EasyQ HPV (NucliSENS; bioMerieux) in APTIMA HPV Assay (GenProbe).

- **In situ hibridizacija (ISH)** je edina molekularna metoda, ki omogoča zanesljivo detekcijo, identifikacijo in lokalizacijo HPV DNA. Celotna detekcija poteka v jedru okužene celice in ne na različnih nosilcih. Rezultat ISH je ovrednoten mikroskopsko in prisotnost precipitata znotraj jedra epiteljske celice potrjuje okužbo z določenim HPV genotipom. Ti testi klinično še niso odobreni, saj so zelo zamudni, imajo pa tudi prenizko klinično občutljivost, da bi se uporabljali v

rutinsko diagnostiki. Med ISH teste spadajo INFORM HPV (Ventana), GenPoint HPV Biotinylated DNA Probe (Dako), ZytoFast HPV Probes (ZytoVision), HPV OncoTect Test Kit (IncellDx) (Poljak in Kocjan, 2010).

Ena od indikacij za HPV testiranje je pojav določenih citopatoloških sprememb v brisih materničnega vratu, ki jih ginekologi odkrivajo s presejalnimi programi, kamor je vključeno redno PAP testiranje. V tem primeru se testiranje na HPV izvaja pri pacientkah, katerih rezultati testa PAP niso normalni (brisi označeni s črko A), temveč kažejo patološke spremembe celic in so označeni s črko C. Najnovejše smernice društva Zora priporočajo HPV testiranje pri naslednjih indikacijah:

- atipične ploščate celice (C1) ali atipična ploščata metaplazija (C10);
- blago diskariotične ploščate celice (C3) pri ženskah starih 35 let in več;
- cervikalna intraepitelijska neoplazija prve stopnje (CIN1) (Onkološki inštitut, 2010).

V zadnjem desetletju se kot standard za primarno presejalno HPV testiranje, katerega namen je odkrivanje patoloških sprememb epiteljskih celic materničnega vratu, uporabljajo HPV DNA testi, ki dokazujejo skupno prisotnost 13-14 visokorizičnih HPV genotipov. Negativen rezultat za visokorizične HPV genotipe varno omogoča daljše intervale med testiranjmi v primerjavi s citološkimi izvidi brisa materničnega vratu. Nov standard za HPV testiranje predstavljajo testi, ki bodo poleg pozitivnega/negativnega rezultata za 13-14 visokorizičnih HPV genotipov opredelili tudi posamezno okužbo z genotipoma HPV-16/18. Na ta način bi lažje odkrili HPV-16/18 pozitivne ženske z negativno citologijo, ki imajo večje tveganje za nastanek CIN3 ali karcinom in situ, kot HPV16/18 negativne. V uporabi je veliko različnih genotipizacijskih testov, vendar njihova klinična uporabnost še ni dokončno preizkušena/ovrednotena, v evalvaciji pa so tudi Hr-HPV mRNA testi, ki naj bi pokazali primerljivo klinično občutljivost v primerjavi z že validiranimi HPV-DNA testi (Poljak in Kocjan, 2010).

V bližnji prihodnosti pričakujemo, da bo kar nekaj izmed teh testov klinično preizkušenih in odobrenih, izbira pravega testa za rutinsko diagnostiko HPV okužbo pa bo tako predstavljala veliko dilemo za virološke laboratorije (Poljak in Kocjan, 2010).

2.2.1 Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2)

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) (Qiagen, Hilden, Nemčija) je komercialno dostopen test za rutinsko dokazovanje HPV okužb, ki se najpogosteje uporablja in ima največjo klinično uporabnost. FDA ga je odobrila leta 2003 (Poljak in Kocjan, 2010).

Metoda temelji na principu tekočinske hibridizacije, pri kateri pride do združevanja tarčne HPV DNA z značilnimi neradioaktivno označenimi enovijačnimi RNA-lovkami, ki so proste v tekočini. Test vsebuje mešanico dveh različnih kompletov RNA-lovk: en komplet prepozna nizkorizične HPV genotipe 6/11/42/43/44, drugi komplet pa prepozna visokorizične HPV genotipe 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68, kar skupno znaša 18 HPV genotipov (Poljak in sod., 1999). Nastali DNA-RNA hibridi se vežejo na monoklonska protitelesa, ki so prisotna v vdolbnicah mikrotiterske ploščice in so označena z alkalno fosfatazo, kar nato z dodatkom kemiluminiscentega substrata omogoča njihovo detekcijo. Intenziteto svetlobe, ki jo oddaja substrat merimo z luminimetrom in je sorazmerna količini HPV DNA v vzorcu (Poljak in sod., 2005). Rezultati so podani kot razmerje med relativnimi svetlobnimi enotami RLU (angl. relative light units) in mejno vrednostjo (CO angl. cutoff value), ki je enaka povprečni RLU vrednosti pozitivnega kalibratorja. Po kriterijih proizvajalca so vsi vzorci, katerih vrednost rezultata presega 1,0 RLU/CO pozitivni. Analitična občutljivost hc2 testa je med 1.000 in 5.000 kopij HPV DNA in je odvisna od prisotnosti določenega genotipa HPV v vzorcu (Poljak in sod., 2002).

Test hc2 (Qiagen) je v primerjavi s PCR manj občutljiv in ne zazna okužbe s posameznimi HPV genotipi, vendar je bolj specifičen in ima večjo pozitivno napovedno vrednost za CIN3 (Poljak in sod., 2005). Pomanjkljivost hc2 testa (Qiagen) predstavljajo predvsem

občasni lažno pozitivni rezultati, ki se pojavijo zaradi navzkrižne reaktivnosti z drugimi HPV genotipi, ki niso vključeni v testno mešanico RNA-lovk. Teh genotipov, ki navzkrižno reagirajo je kar 22, med najpogostejšimi pa so HPV-53/66/54/6/40/42 (Poljak in sod., 2002). Lažno pozitivne rezultate, ki se pojavljajo predvsem ob mejni vrednosti testa hc2 (Qiagen), je priporočljivo potrditi z alternativno metodo za dokazovanje HPV DNA (Seme in sod., 2006). To v navodilih za pravilno izvedbo testa priporoča tudi proizvajalec.

Eno izmed dveh gojišč, ki se uporablja za transport vzorcev odvzetih za testiranje s hc2 metodo, je transportno gojišče ThinPrep®PreservCyt® (Hologic Inc., Marlborough, ZDA). Za vzorce shranjene v tem gojišču proizvajalec testa hc2 (Qiagen) predlaga sivo območje, ki zajema vrednosti med 1,0 in 2,5 RLU/CO in za razreševanje HPV-statusa v teh vzorcih proizvajalec priporoča tudi do dve ponovitvi testa.

2.2.2 Abbott RealTime High Risk HPV Test (Abbott HR HPV)

Abbott RealTime High Risk HPV Test (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, Illinois, ZDA) je nov, avtomatiziran, kvalitativen molekularni test zasnovan za odkrivanje 14 visokorizičnih genotipov HPV, ki lahko hkrati zazna tudi samostojno prisotnost HPV-16 ali HPV-18 genotipa (Huang in sod., 2009). Temelji na principu dokazovanja HPV DNA s PCR v realnem času in se izvaja na m2000rt real-time PCR napravi (Abbott Molecular Inc.) (Poljak in sod., 2009).

Test zazna visokorizične genotipe HPV-16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68 z pomočjo GP5+/6+ mešanice začetnih oligonukleotidov, katerih tarčna DNA se nahaja v ohranjenem L1 zaporedju HPV genoma (Huang in sod., 2009). Naprava m2000rt zaznava različne signale in meri fluorescenco na 4 kanalih: na prvem kanalu zaznava interno kontrolo, ki je človeški β -globin (prisoten je v vseh celicah), na drugem HPV-16, na tretjem HPV-18 in na četrtem kanalu zazna preostalih 12 visokorizičnih HPV genotipov (Poljak in sod., 2009).

S tem testom lahko v 6–8 urah (odvisno od metode, ki se uporablja za izolacijo DNA) testiramo 96 vzorcev, odobren pa je za obdelavo vzorcev, ki so hranjeni v treh različnih transportnih medijih, med katere spada tudi gojišče ThinPrep®PreservCyt® (Hologic Inc.) (Poljak in Kocjan, 2010).

Z različnimi študijami, ki so preučevale učinkovitost Abbott HR HPV testa (Abbott Molecular Inc.), so dokazali, da je analitična občutljivost testa med 500 do 5.000 kopij HPV DNA in je odvisna od prisotnosti določenega HPV genotipa v vzorcu. Zaznali niso nobene navzkrižne reaktivnosti z nizkorizičnimi HPV genotipi, niti z drugimi mikroorganizmi, ki so pogosto prisotni v ženskem anogenitalnem predelu (Huang in sod., 2009). Ovrednotili so tudi njegovo klinično občutljivost, ki je bila primerljiva s hc2 metodo (Poljak in sod., 2009).

Glede na to, da sta visokorizična genotipa HPV-16 in HPV-18 odgovorna za približno 70 % primerov raka materničnega vratu, ima Abbott HR HPV test (Abbott Molecular Inc.) veliko prednost pred drugimi metodami, saj je sposoben zaznavanja samostojne okužbe z HPV-16 ali HPV-18 genotipom (Moody in Laimins, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.3 VZORCI

V raziskavo smo vključili 4507 vzorcev brisov materničnega vratu, odvzetih istemu številu žensk starih 20–64 let v okviru slovenske nacionalne pilotne raziskave učinkovitosti primarnega HPV testiranja, ki je potekala v letih 2009/2010. Vzorci so bili v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa dostavljeni v transportnem gojišču ThinPrep® PreservCyt® (ThinPrep®) (Hologic Inc., Marlborough, ZDA).

Vse vzorce, pri katerih je bil rezultat testiranja med 1,0–2,5 RLU/CO (sivo območje) smo ponovno testirali v skladu z navodili proizvajalca testa in s testom Abbott RealTime High Risk HPV Test (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, ZDA) ter primerjali učinkovitost obeh pristopov razreševanja HPV-statusa v vzorcih z rezultatom v sivem območju.

3.4 METODE

Ko so vzorci (brisi materničnega vratu) prišli v laboratorij v transportnem gojišču Thinprep® (Hologic Inc.) (20 ml) smo jih najprej vorteksirali in nato takoj odvzeli 4 ml gojišča za testiranje z hc2 testom (Qiagen) ter 1,5 ml gojišča za testiranje z Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.). Preostali vzorec smo shranili na –80 °C.

Preden smo lahko izvedli hc2 (Qiagen) test, smo morali uporabiti Hybrid Capture 2 Sample Conversion Kit (Qiagen) in po proizvajalčevih navodilih vzorec predhodno obdelati s konverzijo. Za izvedbo Abbott HR HPV (Abbott Molecular Inc.) testa, ni bila potrebna nobena predhodna obdelava vzorca.

3.4.1 Konverzija (Hybrid Capture 2 Sample Conversion Kit)

Hybrid Capture 2 Sample Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) vsebuje reagente, ki omogočajo odstranitev ThinPrep® gojišča (Hologic Inc.), resuspendiranje usedline v novem gojišču in denaturacijo cervikalnih celic pridobljenih z brisom. Tako obdelani vzorci se nato lahko rutinsko testirajo s testom hc2 (Qiagen).

4 ml gojišča ThinPrep® (Hologic Inc.) smo prenesli v primerno označeno 15 ml koničasto epruveto in dodali 400 µl Sample Conversion pufra. Epruvete z gojiščem smo nato vorteksirali in 15 ± 2 min centrifugirali pri $2900 \times g$. Med centrifugiranjem smo pripravili delovno mešanico sestavljeno iz Specimen Transport medija (STM) in denaturacijskega reagenta (DNR). DNR smo predhodno pripravili tako, da smo mu dodali 3 kapljice indikatorskega barvila. Tako pripravljen DNR lahko hranimo pri temperaturi $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$ do 3 mesece. Mešanica STM/DNR za 1 vzorec je vsebovala 120 µl STM in 60 µl DNR. Po končanem centrifugiranju je delo potekalo hitro, da se nastala usedlina ne bi ponovno raztopila. Odlili smo supernatant in obrnjeno tubico 6 x previdno zavrteli na staničevini, da se usedlina ne bi odlepila od stene epruvete. V vsako epruveto smo nato dodali 150 µl STM/DNR mešanice in v njej resuspendirali usedlino z 2-minutnim vorteksiranjem pri najvišji hitrosti. V primeru, da se usedlina ni resuspendirala, smo si epruveto označili in nadaljevali konverzijo. Resuspendirane vzorce smo nato za 15 ± 2 min postavili v vodno kopel na $65 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Po inkubaciji smo vzorce ponovno vorteksirali in jih nato še za 30 ± 3 min postavili v vodno kopel na $65 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Epruvete, v katerih se pelet tudi po 15 minutni inkubaciji ni raztopil, nismo uporabili za nadaljnje testiranje. Na koncu smo celotno vsebino epruvet prenesli v 2 ml označene epruvetke in nadaljevali s Hybrid Capture 2 HPV DNA testom (Qiagen) ali jih shranili pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (do 3 mesece).

V enem postopku konverzije, ki traja približno 2 uri, smo lahko obdelali največ 32 vzorcev hkrati, saj bi bila pri večjem številu vzorcev velika verjetnost, da bi se usedlina, medtem ko smo epruvete osuševali z vrtenjem po staničevini, ponovno raztopila oziroma odlepila.

3.4.2 Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2)

V Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa se za rutinsko diagnostiko HPV okužb uporablja Hybrid Capture 2 **High Risk** HPV DNA test (Qiagen), ki vsebuje mešanico lovk RNA za zaznavanje izključno visokorizičnih HPV genotipov 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Test se izvaja za 88 vzorcev hkrati in poteka približno 5–6 ur.

Pred začetkom hc2 testa (Qiagen) smo pripravili vzorce, ki so bili po konverziji shranjeni v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih zložili v stojalo. Vodno kopel in inkubator smo nastavili na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kit za izvedbo testa je bil shranjen v hladilnici pri $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Najprej smo pripravili denaturacijsko raztopino (DR), tako da smo denaturacijskemu reagentu dodali 5 kapljic indikatorskega barvila. V štiri označene 1,5 ml epruvice smo odpipetirali 200 μl negativnega kalibratorja (- CAL) in high-risk HPV kalibratorja (HR HPV CAL) ter 100 μl low-risk HPV quality kontrole (LR HPV QC) in high-risk HPV quality kontrole (HR HPV QC). HR HPV CAL vsebuje 1 pg/ml HPV-16 DNA, LR HPV QC in HR HPV QC pa vsebujeta 5 pg/ml HPV DNA, vendar se razlikujeta v tem, da prvi vsebuje HPV-6 DNA, drugi pa HPV-16 DNA.

V prvi dve epruvetki, ki sta vsebovali kalibratorje smo dodali po 100 μl DNR, v drugi dve epruvetki s kontrolami pa 50 μl DNR. Le-te smo nato zaprli, vorteksirali in postavili za $45 \pm 5\text{ min}$ v inkubator na $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med inkubacijo smo pripravili tri 2 ml epruvetke in v vsako odpipetirali 1 mL Probe diluenta in 40 μl visokorizične probe. Nato smo jih vorteksirali in 25 μl nastale mešanice dodali v tubice, ki smo jih vstavili v stojalo.

Po inkubaciji smo CAL in QC vorteksirali in jih pustili 15 min na sobni temperaturi, da so se ohladili. V prvo kolono tubic, v katere smo predhodno dodali visokorizično probo, smo dodali najprej 3 x negativni CAL, nato 3 x high-risk CAL in nazadnje še low-risk QC ter high-risk QC. V naslednjo kolono smo nato pričeli po vrsti dodajati vzorce. Volumen kalibratorjev, kontrol in vzorcev, ki smo jih dodali je bil 75 μl . Tubice smo pokrili s folijo, jih skupaj s stojalom vorteksirali, pokrili s pokrovom in jih postavili $60 \pm 5\text{ min}$ v vodno

kopel na 65 ± 2 °C. V tem času naj bi prišlo do nastajanja hibridov med tarčno HPV DNA in visokorizičnimi RNA lovkami (če je seveda kateri izmed 13 visokorizičnih HPV genotipov prisoten v vzorcu).

Med inkubacijo smo vklopili napravo DML2000 (Digene DML2000 Microplate Luminometer), odprli program DMS2 (Digene Microplate System 2.0) in vnesli zaporedne številke naših vzorcev.



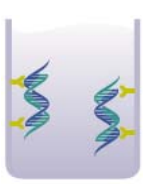
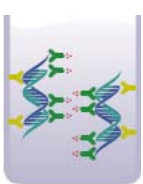
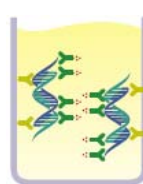
Ko se je enourna inkubacija v vodni kopeli iztekla, smo celotno vsebino tubic (100 μ l) prenesli v mikrotitersko ploščico, v kateri so na dnu vezana protitelesa proti nastalim RNA-DNA hibridom. Tubice smo zavrgli, mikrotitersko ploščico pa smo pokrili s folijo in jo inkubirali 60 ± 5 min na sobni temperaturi s stresanjem na stresalniku pri 1100 ± 100 RPM (angl. rotations per minute).

Test smo nadaljevali tako, da smo celotno vsebino iz mikrotiterske ploščice odlili proč in dodali 75 μ l detekcijskega reagenta 1, ki vsebuje protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo in se veže na ujete RNA-DNA hibride. Sledila je 30 minutna inkubacija na sobni temperaturi v temi.

Medtem smo si pripravili 600 ml spiralnega pufra. Po inkubaciji smo detekcijski reagent 1 odstranili s spiranjem, s ploščico pa smo nato potolkli po papirnati brisači in tako osušili vse luknjice. Nato smo dodali 75 μ l detekcijskega reagenta 2, ki vsebuje substrat in mikrotitersko ploščico odnesli v napravo DML2000 (Digene DML2000 microplate luminometer). Po 15 minutah (a najkasneje po 30 minutah), smo izmerili intenziteto svetlobe, ki je sorazmerna količini HPV DNA v vzorcu. Kot sem že omenila, so rezultati podani kot razmerje med relativnimi svetlobnimi enotami RLU (angl. relative light units) in mejno vrednostjo (CO angl. cutoff value), ki je enaka povprečni RLU vrednosti pozitivnega kalibratorja. Vzorci z rezultatom $\geq 1,0$ RLU/CO se obravnavajo kot pozitivni, vendar za vzorce shranjene v ThinPrep® gojišču (Hologic Inc.) proizvajalec testa hc2 predlaga sivo območje, ki zajema vrednosti med 1,0–2,5 svetlobnih enot/mejna vrednost (RLU/CO).

Vzorci z rezultati v sivem območju smo po navodilih proizvajalca ponovno testirali s hc2 testom (Qiagen). Če je bil rezultat drugega testa $\geq 1,0$ RLU/CO, je bil vzorec pozitiven, če pa je bil rezultat $< 1,0$ RLU/CO, smo vzorec s hc2 testom testirali še enkrat. V tem primeru je bil tretji rezultat končen in smo ga po navodilih opredelili kot pozitivnega (RLU/CO ≥ 1) oziroma negativnega (RLU/CO < 1).

Preglednica 1: Postopek testa hc2 (Qiagen)

DENATURACIJA	HIBRIDIZACIJA	VEZAVA	DETEKCIJA HIBRIDOV	
 <p>Sprostitev DNA iz celic in razpad dvojne vijačnice</p>	 <p>Nastanek hibridov iz RNA mešanice lovk in DNA HPV virusov, če so ti prisotni v vzorcu</p>	 <p>Vezava RNA-DNA hibridov na monoklonska protitelesa v ploščici</p>	 <p>Dodatek protiteles z konjugirano alkalno fosfatazo, ki se vežejo na vezane hibride</p>	 <p>Dodatek substrata, ki generira kemiluminiscenčni signal</p>
<p>45 min \pm 5 min pri 65°C \pm 2 °C</p>	<p>60 min \pm 5 min pri 65 °C \pm 2 °C</p>	<p>60 min \pm 5 min na sobni temperaturi s stresanjem pri 1100 \pm 100 rpm</p>	<p>30–45 min na sobni temperaturi</p>	<p>15 min na sobni temperaturi v temi</p>

3.4.3 Abbott RealTime HPV High Risk Test

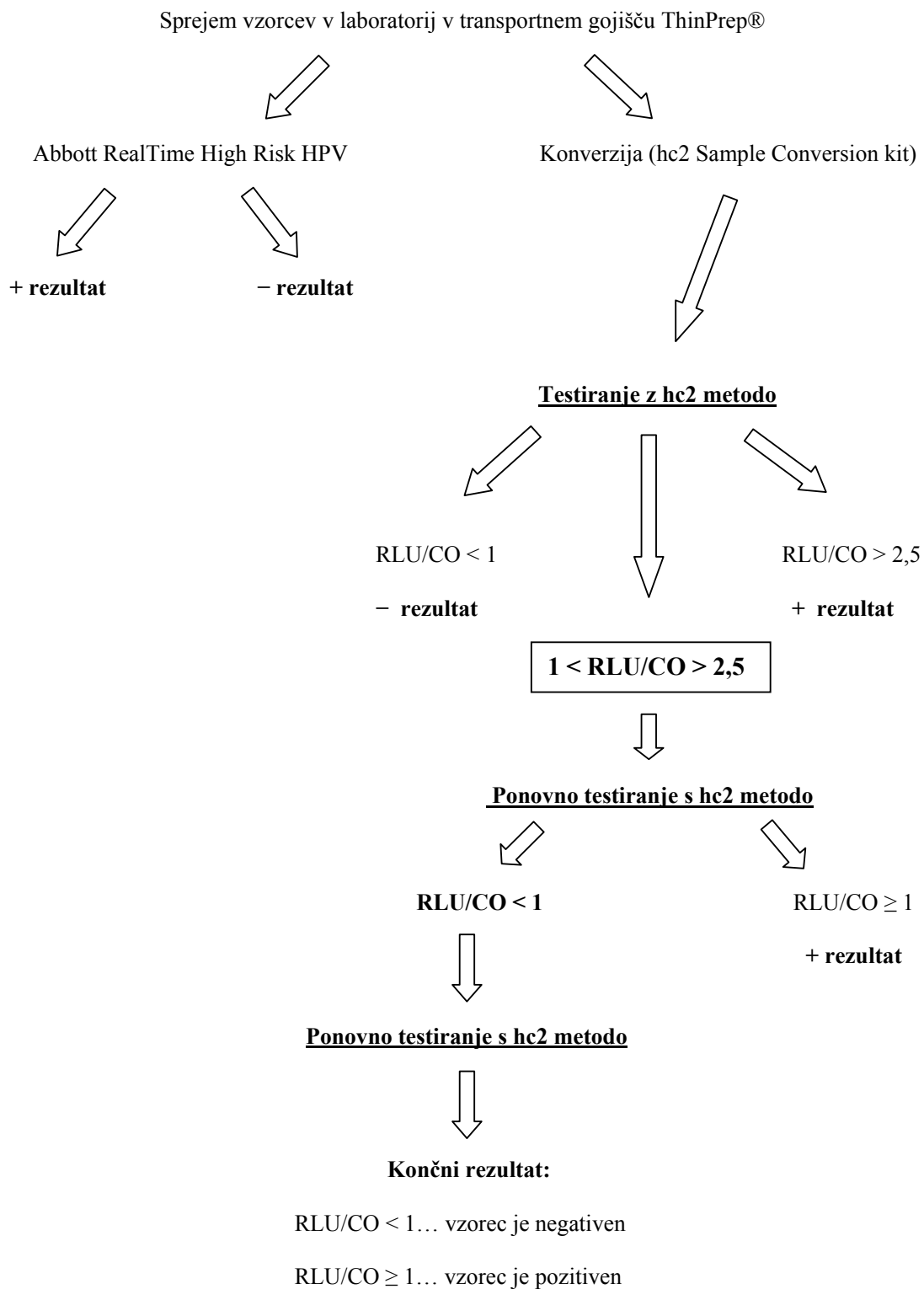
Za izvedbo testa ni bila potrebna nobena predhodna obdelava vzorca v ThinPrep® gojišču (Hologic Inc.). Vzorce (1,5 ml gojišča ThinPrep®, ki smo ga odvzeli ob prihodu v laboratorij) smo 5 min centrifugirali pri 5000 obratih/min, minimalen volumen potreben za testiranje pa je bil 400 µl. Ker je test avtomatiziran, smo po navodilih proizvajalca pripravili reagente, pozitivno/negativno kontrolo, interno kontrolo in vzorce ter jih vstavili v napravo *m2000sp* (Abbott Molecular Inc.).

Po končani izolaciji in pripravi amplifikacijske mešanice, ki je potekala približno 3 ure, smo ploščico z izolati 4 min centrifugirali pri 3700 obratih/minuto. Nato smo izvedli še pomnoževanje HPV DNA in detekcijo le-te, z merjenjem 4 različnih kanalov na napravi *m2000rt* (Abbott Molecular Inc.).

Rezultati testa so bili podani v računalniški obliki. Če je bila tarčna HPV DNA prisotna v vzorcu, so bili rezultati testa:

- HPV-16 (prisotnost genotipa HPV-16),
- HPV-18 (prisotnost genotipa HPV-18),
- Other HR HPV (prisotnost ostalih visokorizičnih genotipov HPV).

Abbott Real Time HPV High Risk Test (Abbott Molecular Inc.) smo uporabili kot referenčno metodo, ki je omogočila neposreden pristop pri razreševanju HPV-statusa v vzorcih z mejnim hc2 (Qiagen) rezultatom.



Slika 3: Postopek obdelave brisov materničnega vratu po sprejemu v laboratorij

3.4.4 Genotipizacijske metode

Vse vzorce, pri katerih se končni rezultat testiranja s hc2 (Qiagen) in Abbott HPV HR testom (Abbott Molecular Inc.) ni ujema, smo nato testirali še z tretjim neodvisnim testom, ki je omogočil genotipizacijo HPV. Uporabili smo bodisi **INNO-LiPA HPV Genotyping Extra** test (Innogenetics, Gent, Belgija) ali **Linear Array HPV Genotyping** test (Roche Diagnostics, Branchburg, New Jersey, ZDA) in z njima ugotovili, kateri genotipi HPV so bili prisotni v vzorcu.

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* test (Innogenetics) omogoča genotipizacijo 28 različnih HR HPV genotipov. Princip testa temelji na pomnoževanju regije HPV gena L1 z označenimi začetnimi oligonukleotidi, nato pa mu sledi hibridizacija s specifičnimi probami, nanesenimi na nitrocelulozen trakec. Test zaznava vse visokorizične HPV genotipe, ki jih določata hc2 in Abbott HR HPV test, dodatno pa omogoča detekcijo še za visokorizična genotipa HPV-73 in HPV-82 in pa verjetno visokorizična genotipa HPV-26 in HPV-52 (Poljak in sod., 2009). Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics) poteka na podoben način, omogoča pa genotipizacijo 37 alfa-HPV genotipov. Oba testa sta kvalitativna, komercialno dostopna in se za dokazovanje HPV okužb v kliničnih vzorcih uporabljata v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa.

Vzorci, v katerih sta testa zaznala prisotnost enega ali več visokorizičnih genotipov HPV, smo opredelili kot pozitivne za visokorizične genotipe HPV, vzorce, v katerih pa so bili prisotni ostali genotipi HPV, pa kot negativne za visokorizične genotipe HPV.

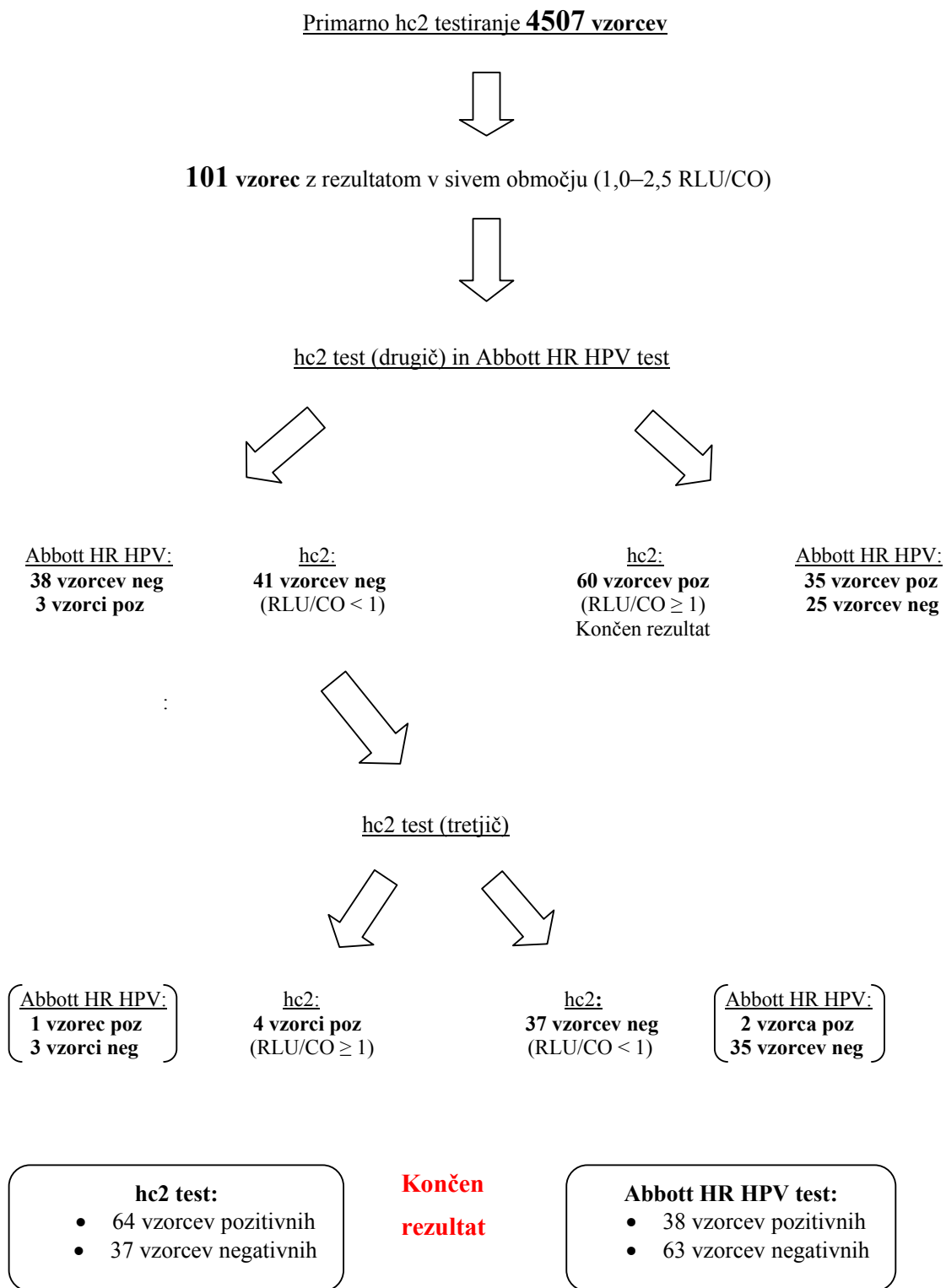
4 REZULTATI

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Qiagen), s katerim smo dokazovali prisotnost DNA HPV v vzorcih materničnega vratu, je kvalitativna metoda, ki ovrednoti posamezen vzorec le kot pozitiven ali negativen. Kot pozitivne rezultate smo opredelili tiste, katerih vrednost RLU/CO je bila ≥ 1 , kot negativne rezultate pa smo opredelili tiste, katerih RLU/CO je bila < 1 .

Od skupno 4507 testiranih vzorcev, je bil pri 101 vzorcu rezultat v sivem območju, kar pomeni, da je pogostost pojavljanja mejnih rezultatov testa hc2 znašala 2,2 %. Po drugem testiranju je bilo 60 vzorcev pozitivnih (59,4 %), 41 vzorcev (40,6 %) pa je bilo negativnih, kar pomeni, da jih je bilo potrebno ponovno testirati. Po tretjem hc2 testiranju smo dobili končni rezultat, in sicer je bilo 37 vzorcev negativnih, 4 pa so bili pozitivni.

Od vsakega 101 vzorca, katerih vrednosti RLU/CO so bile v sivem območju, je bilo po končanem algoritmu testiranja 37 vzorcev negativnih, 64 vzorcev pa pozitivnih.

Če ne bi izvedli dodatnega testiranja vzorcev z rezultati v sivem območju po navodilih proizvajalca, bi bili vsi ti vzorci zaključeni kot pozitivni, saj je bila njihova prvotna vrednost po primarnem hc2 testiranju ≥ 1 RLU/CO. S tem smo se skušali izogniti lažno pozitivnim rezultatom mejnih vrednosti, ki se pojavljajo pri hc2 testiranju zaradi navzkrižne reaktivnosti testa z drugimi genotipi HPV.



Slika 4: Rezultati testiranja 101 vzorca z vrednostmi v sivem območju (med 1,0–2,5 RLU/CO), pridobljeni z hc2 in Abbott HR HPV testom

Vzorci z rezultati v sivem območju smo testirali tudi z Abbott HR HPV High testom (Abbott Molecular Inc.), s katerim smo primerjali rezultate hc2 (Qiagen) testiranja. Je avtomatiziran kvalitativen test, ki poleg pozitivnega/negativnega rezultata določa tudi posamezno okužbo z HPV-16 in HPV-18 genotipom.

Od 101 vzorca z mejnim rezultatom hc2, ki smo jih testirali, je bilo s testom Abbott HR HPV 63 vzorcev opredeljenih kot negativnih (62,4 %), 38 vzorcev pa je bilo pozitivnih (37,6 %).

Ko smo primerjali rezultate obeh testov, je bilo 35 vzorcev z obema metodama negativnih (34,7 %), 36 vzorcev pa z obema metodama pozitivnih (35,6 %), kar pomeni, da je skupno ujemanje metod **70,3 %**. 30 vzorcev je imelo neskladne rezultate, kar pomeni, da je bil odstotek neujemanja 29,7 %. 28 od teh vzorcev je bilo s hc2 metodo pozitivnih, 2 pa negativna. Pri testiranju z Abbott HR HPV testom pa je bilo ravno obratno, saj je test 28 vzorcev opredelil kot negativne, 2 vzorca pa kot pozitivna. Omenjeni rezultati so podani v preglednici 2.

Preglednica 2: Ujemanje rezultatov, pridobljenih s hc2 in Abbott HR HPV testom, za 101 vzorec z vrednostmi v sivem območju

		Hybrid Capture 2 HPV DNA Test	
		Pozitivni	Negativni
Abbott RealTime High Risk HPV Test	Pozitivni	36	2
	Negativni	28	35

Pri 30 vzorcih (29,7 %), katerih rezultati obeh testov se niso ujemali, smo izvedli genotipizacijo s kvalitativnima testoma INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics) ali Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics). Vzorce, v katerih smo z genotipizacijskima testoma dokazali prisotnost enega ali več visokorizičnih genotipov HPV, smo opredelili kot pozitivne za visokorizične genotipe HPV, vzorce, v katerih nismo dokazali visokorizičnih HPV ali smo dokazali druge genotipe HPV, pa kot negativne za visokorizične genotipe HPV.

V 21 od 20 vzorcev z genotipizacijskima testoma nismo dokazali visokorizičnih genotipov HPV, v 9 vzorcih, pa so le-ti bili prisotni. Ujemanje rezultatov genotipizacije s testom hc2 (Qiagen) je bilo 23,3 % (7 vzorcev od 30), z Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.) pa 76,7 % (23 vzorcev od 30), kar je razvidno iz preglednice 3.

Po končni analizi rezultatov vseh testiranj smo ugotovili, da je bilo med 101 vzorcem z izhodnim rezultatom testa hc2 v sivem območju, 45 vzorcev pozitivnih za visokorizične genotipe HPV in 56 vzorcev negativnih za visokorizične genotipe HPV.

Na podlagi rezultatov pridobljenih z genotipizacijo, ki je razrešila neskladne rezultate, smo lahko po spodnji formuli izračunali specifičnost obeh testov na 101 vzorcu, z izhodnimi rezultati testa hc2 (Qiagen) v sivem območju.

$$\text{Specifičnost hc2} = \frac{RN}{LP + RN} = \frac{35}{21 + 35} = 0,625 \quad \dots (1)$$

$$\text{Specifičnost Abbott HR HPV} = \frac{RN}{LP + RN} = \frac{56}{0 + 56} = 1 \quad \dots (2)$$

RN= resnično negativni vzorci; LP= lažno pozitivni vzorci

Specifičnost Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) (Qiagen) je znašala 62,5 %, specifičnost Abbott RealTime High Risk HPV testa (Abbott Molecular Inc.) pa 100 %.

Preglednica 3: Primerjava neskladnih rezultatov, pridobljenih z hc2 in Abbott HR HPV testom, za 101 vzorec (bris materničnega vratu), ki so imeli vrednosti v sivem območju, z rezultati genotipizacije

Številka vzorca	Šifra preiskovanke	hc2 končen rezultat	Abbott HR HPV rezultat	Genotip HPV	Hc2	Abbott HR HPV
1	01243	poz	neg	67	LP	RN
2	07164	poz	neg	42,89	LP	RN
3	10018	poz	neg	neg	LP	RN
4	20065	poz	neg	67	LP	RN
5	14038	poz	neg	67	LP	RN
6	01397	poz	neg	67	LP	RN
7	24008	poz	neg	neg	LP	RN
8	06257	poz	neg	53,55	LP	RN
9	01807	poz	neg	42	LP	RN
10	01191	poz	neg	neg	LP	RN
11	01421	poz	neg	55	LP	RN
12	06271	poz	neg	69, 71	LP	RN
13	24050	poz	neg	neg	LP	RN
14	24018	poz	neg	55	LP	RN
15	17058	poz	neg	53	LP	RN
16	24010	poz	neg	neg	LP	RN
17	06413	poz	neg	53	LP	RN
18	10041	poz	neg	53	LP	RN
19	09042	poz	neg	61	LP	RN
20	10020	poz	neg	neg	LP	RN
21	02180	poz	neg	neg	LP	RN
22	02017	neg	poz	16	LN	RP
23	01538	neg	poz	18	LN	RP
24	12026	poz	neg	52	RP	LN
25	09069	poz	neg	31, 39	RP	LN
26	08027	poz	neg	31, 53	RP	LN
27	02047	poz	neg	58	RP	LN
28	07112	poz	neg	68	RP	LN
29	04034	poz	neg	68	RP	LN
30	21048	poz	neg	45,53	RP	LN

RN= resnično negativni; RP= resnično pozitivni; LN= lažno negativni; LP= lažno pozitivni; hc2 rezultati skladni z rezultati genotipizacije; Abbott HR HPV rezultati skladni z rezultati genotipizacije

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Ker dolgotrajna okužba z visokorizičnimi HPV genotipi privede do nastanka invazivne oblike raka materničnega vratu, je njihovo dokazovanje izredno pomembno.

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) (Qiagen, Hilden, Nemčija) je trenutno eden izmed štirih komercialno dostopnih testov, ki jih je odobrila FDA in se v laboratorijih uporablja za rutinsko dokazovanje HPV okužb.

Zaradi lažno pozitivnih rezultatov, ki se lahko zaradi navzkrižne reaktivnosti testa z drugimi HPV genotipi pojavljajo predvsem ob mejni vrednosti hc2 testa, smo za razreševanje HPV-statusa pri vzorcih, ki so imeli mejne vrednosti, uporabili algoritem, ki ga priporoča proizvajalec (Qiagen). Proizvajalčev algoritem smo primerjali z bolj neposrednim pristopom, ki vključuje uporabo analitično zelo specifičnega Abbott HR HPV testa (Abbott Molecular Inc.).

5.1 ANALIZA REZULTATOV

Pri ugotavljanju pogostosti mejnih rezultatov testa hc2 (Qiagen) smo ugotovili, da le-ta znaša 2,2 %, kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji.

Uporaba proizvajalčevega algoritma za razreševanje mejnih rezultatov je bila učinkovita, vendar zamudna, saj zahteva tudi do tri ponovitve hc2 metode, kar pomeni, da lahko testiranje traja tudi do več dni. Glede na končne rezultate vseh testiranj za visokorizične genotipe HPV, smo ugotovili, da bi bilo že po prvem hc2 testu pravilno (pozitivni za HR HPV) opredeljenih 45 od 101 vzorca (44,5 %), po drugem hc2 testu 41 vzorcev in po tretjem hc2 testu 38 vzorcev.

Pri predhodni obdelavi vzorca v ThinPrep® gojišču je končni volumen vzorca po konverziji, ki ga lahko uporabimo za hc2 testiranje, 150 µL, kar pomeni, da ga je dovolj le

za 2 testiranja. Če bi vzorec potreboval še tretje testiranje, bi morali postopek konverzije ponoviti, kar pomeni, da bi potrebovali dodatne 4 ml transportnega gojišča ThinPrep®.

Rezultati obeh testov za dokazovanje visokorizičnih HPV okužb, so se ujemali v 70,3 %. 32,8 % vzorcev, ki smo jih po končanem testiranju s hc2 (Qiagen) opredelili kot pozitivne, je bilo lažno pozitivnih, medtem ko niti eden od pozitivnih rezultatov testa Abbott HR HPV (Abbott Molecular Inc.), ni bil lažno pozitiven.

Veliko višje število pozitivnih rezultatov pri hc2 testiranju si lahko razlagamo s pojavom lažno pozitivnih rezultatov zaradi navzkrižne reaktivnosti z drugimi HPV genotipi. Od 21 testiranih vzorcev s hc2 testom, ki jih je genotipizacija opredelila kot lažno pozitivne, je bilo 7 vzorcev negativnih, kar pomeni, da ni bil prisoten nobeden od HPV genotipov, ki se določajo z enim ali drugim genotipizacijskim testom. 14 vzorcev (66,7 %) je bilo dejansko lažno pozitivnih zaradi navzkrižne reaktivnosti z genotipi, ki niso vključeni v visokorizično mešanico prob hc2 testa (Qiagen).

Ker test ni avtomatiziran in je potrebna ročna izvedba, bi do takih rezultatov lahko prišlo tudi zaradi nepravilnega oziroma slabega izpiranja mikrotitrne ploščice, zaradi preslabega osuševanja mikrotitrne ploščice po izpiranju in nenatančnosti pri prenašanju vzorcev na ploščico. Vse to je človeški faktor, ki lahko vpliva na merjenje absorbance in s tem na pojav višjega števila pozitivnih vrednosti.

Do napak bi lahko prišlo tudi pri izvedbi konverzije, kar tudi vpliva na rezultate pridobljene s hc2 (Qiagen) metodo.

Velika pomanjkljivost testa hc2 je ta, da nima interne kontrole, ki bi zagotavljala prisotnost cervikalnih celic v vzorcu in ki bi nas opozorila na prisotnost inhibicije, ki se lahko pojavi med samo izvedbo testa. To je lahko vzrok za pojav lažno negativnih rezultatov pri hc2 testiranju, ki jih je bilo v naši raziskavi zelo malo (2 vzorca).

Pri testiranju z Abbott HR HPV testom, smo dobili dosti nižje število pozitivno opredeljenih vzorcev, med katerimi nobeden ni bil lažno pozitiven. Vzrok za odsotnost

lažno pozitivnih rezultatov je najverjetneje ta, da je test avtomatiziran, bolj specifičen kot hc2 (Qiagen), izključimo pa lahko tudi pojavljanje lažno pozitivnih rezultatov, saj ni bilo dokazane nobene navzkrižne reaktivnosti z ostalimi HPV genotipi ali z drugimi mikroorganizmi, ki so prisotni v ženskem anogenitalnem predelu.

Vzrok za lažno negativne rezultate pridobljene z Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.), bi lahko bila nizka koncentracija tarčne DNA HPV v vzorcih. V takem primeru, se DNA ne bi dovolj pomnožila in tako bi prišlo do napak pri detekciji HPV genotipov. Pri teh vzorcih smo tudi preverili citološke izvide (PAP) pripadajočih žensk. Ugotovili smo, da so bili pri vseh ženskah citološki rezultati negativni, kar pomeni, da glede na trenutna priporočila, teh brisov zaradi neustreznih indikacij, v Sloveniji ne bi testirali na prisotnost visokorizičnih HPV.

Rezultati genotipizacije so potrdili trditve o pojavu lažno pozitivnih rezultatov v mejnih vrednostih testa hc2 (Qiagen), kljub izvedbi dodatnega algoritma testiranja po proizvajalčevih navodilih.

Potrdili smo tudi, da je neposredni pristop razreševanja HPV-statusa z Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.) v vzorcih z rezultatom v sivem območju hitrejši in analitično bolj specifičen kot algoritem proizvajalca.

5.2 SKLEPI

- Pogostost mejnih rezultatov je pri primarnem testiranju brisov materničnega vratu s hc2 testom znašala 2,2 %, kar je v skladu z našimi pričakovanji.
- Proizvajalčev algoritem za razreševanje HPV-statusa v sivem območju (1,0–2,5 RLU/CO) za vzorce, shranjene v ThinPrep® gojišču (Hologic Inc.), je zelo zamuden in zahteva veliko vzorca (do 8 mL), saj proizvajalec priporoča tudi do dve ponovitvi testa hc2, kar pomeni, da lahko testiranje traja tudi več dni.
- Specifičnost proizvajalčevega algoritma za vzorce v sivem območju, testirane s hc2 (Qiagen), je nizka in znaša 62,5 %.
- Uporaba Abbott HR HPV testa (Abbott Molecular Inc.) za neposredno razreševanje HPV-statusa v vzorcih z rezultatom hc2 v sivem območju je 100 % specifična in hitrejša kot algoritem proizvajalca za hc2.

6 POVZETEK

Humani papiloma virusi (HPV) se razmnožujejo v bazalnih celicah ploščatega epitelija in tako povzročijo nastanek različnih novotvorb, tako benignih, kot malignih. Dolgotrajna okužba z enim izmed visokorizičnih genotipov HPV je primarni vzrok za nastanek patoloških sprememb celic epitelija materničnega vratu, kar lahko vodi v nastanek malignih tumorjev. Zaradi dolgotrajnega razvoja in učinkovitega odkrivanja predrakavih sprememb lahko stopnjo incidence raka materničnega vratu zmanjšamo.

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (hc2) (Qiagen) je trenutno eden izmed štirih komercialno dostopnih testov za rutinsko dokazovanje HPV okužb, ki jih je odobrila FDA. Njegova glavna pomanjkljivost so lažno pozitivni rezultati, ki se pojavijo zaradi navzkrižne reakcije z ostalimi genotipi HPV, ki niso vključeni v test in so najpogosteje prisotni pri vzorcih z mejno pozitivnim rezultatom. Transportno gojišče ThinPrep® je eno izmed dveh gojišč, ki se uporablja za transport vzorcev, odvzetih za testiranje s hc2 (Qiagen). Za vzorce shranjene v tem gojišču, proizvajalec testa hc2 predlaga sivo območje, ki zajema vrednosti 1,0–2,5 RLU/CO, za razreševanje HPV-statusa le-teh, pa priporoča zelo zamuden algoritem razreševanja, ki vključuje tudi do dve ponovitvi testa hc2.

Namen diplomske naloge je bilo ugotoviti pogostost pojavljanja mejnih rezultatov testa hc2 (Qiagen) pri primarnem HPV testiranju in primerjava proizvajalčevega algoritma za razreševanje HPV-statusa, v vzorcih z rezultatom v sivem območju, z zelo specifičnim Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.).

Ugotovili smo, da je pogostost mejnih rezultatov pri primarnem HPV testiranju znašala 2,2 %. Proizvajalčev algoritem za razreševanje HPV-statusa v sivem območju (1,0–2,5 RLU/CO) za vzorce shranjene v ThinPrep gojišču je zelo zamuden, njegova specifičnost pa je nizka (62,5 %). Neposredni pristop razreševanja HPV-statusa, v vzorcih z rezultatom hc2 v sivem območju, z Abbott HR HPV testom (Abbott Molecular Inc.), je 100 % specifičen in hitrejši kot algoritem proizvajalca.

7 VIRI

- Ashrafi G. H., Brown D. R., Fife K. H., Campo M. S. 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Research*, 120: 208–211
- Bernard H. U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32, 1: 1–6
- Bernard H. U., Burk R. D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 104: 70–79
- Bernard H.U., Celleja-Macias I. E., Dunn S. T. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118: 1071–1076
- Bosch F. X., de Sanjose S. 2007. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease Markers*, 23: 213–227
- Bosch F. X., Lorincz A., Munoz N., Meijer C. J. L. M., Shah K. V. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55: 244–265
- Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V. On behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. 2009. A review of human carcinogens-Part B: Biological agents. *Lancet Oncology*, 10; 321–322
- Boyer S. N., Wazer D. E., Band V. 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitinproteasome pathway. *Cancer Research*, 56: 4620–4624

- Bukhari M. H., Majeed M., Qamar S., Niazi S., Syed S. Z., Yusuf W. A., Yusuf N. W. 2010. Clinicopathological study of Papanicolaou (Pap) smears for diagnosing of cervical infections. *Diagnostic Cytopathology*, doi: 10.1002/dc.21498: 1–7 (v tisku)
- Burk R. D. 2010. Papillomavirus nomenclature. Lecture. V: 26th International Papillomavirus Conference & Clinical and Public Health Workshops. Montreal, 3-8 julij 2010. Birmingham, International Papillomavirus Society.
http://www.hpvmedia.org/index.php?option=com_hpv&view=presentation&id=1806
(februar 2011)
- Chauhan S. C., Jaggi M., Bell M. C., Verma M., Kumar D. 2009. Epidemiology of human papilloma virus (HPV) in cervical mucosa. *Methods in Molecular Biology*, 471: 439–456
- Cheng S., Schmidt-Grimminger D. C., Murant T., Broker T. R., Chow L. T. 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Development*, 9: 2335–2349
- Chow L. T., Broker T. R., Steinberg B. M. 2010. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 118: 442–449
- Conrad M., Bubb V. J., Schlegel R. 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *Journal of Virology*, 67: 6170–6178
- de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17–27
- DeGregori J., Johnson D.G. 2006. Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Current Molecular Medicine*, 6: 739–748

- Duensing A., Spardy N., Chatterjee P., Zheng L., Parry J., Cuevas R., Korzeniewski N., Duensing S. 2009. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 8: 741–747
- Duensing S., Munger K. 2004. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *International Journal of Cancer*, 109: 157–162
- Francis D. A., Schmid S. I., Howley P. M. 2000. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *Journal of Virology*, 74: 2679–2686
- Giuliano A.R., Tortolero-Luna G., Ferrer E., Burchell A.N., de Sanjose S., Kruger Kjaer S., Munoz N., Schiffman M., Bosch F. X. 2008. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine*, 26, Suppl. 10: K17–K28
- Goodwin E. C., DiMaio D. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 12513–12518
- Hawley-Nelson P., Vousden K. H., Hubbert N. L., Lowy D. R., Schiller J. T. 1989. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *European Molecular Biology Organization Journal*, 8: 3905–3910
- Ho G. Y., Bierman R., Beardsley L., Chang C. J., Burk R.D. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine*, 338, 7: 423–428

- Howie H. L., Katzenellenbogen R. A., Galloway D. A. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384: 324–334
- Huang S., Tang N., Mak W. B., Erickson B., Salituro J., Li Y., Krumpke E., Schneider G., Yu H., Robinson J., Abravaya K. 2009. Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test. *Journal of Clinical Virology*, 45: 13–17
- Jančar N., Vrtačnik Bokal E. 2010. Predrakave spremembe materničnega vratu. *Medicinski Razgledi*, 49: 275–284
- Jeon S., Allen-Hoffman B. L., Lambert P. F. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*, 69, 5: 2989–2997
- Kumar A., Zhao J., Meng G., Zeng M., Srinivasan S., Delmolino L. M., Gao Q., Dimri G., Weber G. F., Wazer D. E., Band H., Band V. 2002. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Molecular and Cell Biology*, 22, 16: 5801–5812
- Longworth M. S., Laimins L. A. 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc fingerlike motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *Journal of Virology*, 78: 3533–3541
- Ma B., Roden R., Wu T. C. 2010. Current Status of HPV Vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*, 109: 481–483
- McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. 2009. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research*, 143: 195–208
- Melnikow J., Nuovo J., Willan A. R., Chan B. K., Howell L. P. 1998. Natural history of cervical squamous intra-epithelial lesions: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 92; 727–735

- Moody C. A., Laimins L. A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10: 550–560
- Munoz N., Bosch F. X., Castellsague X., Diaz M., de Sanjose S., Hammouda D., Shah K. V., Meijer C. J. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? *International Journal of Cancer*, 111: 278–285
- Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K. V., Snijders P. J., Meijer C. J. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348: 518–527
- Onkološki inštitut Ljubljana. 2010. ZORA - Državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb materničnega vratu: Triažni test HPV. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana: 5 str.
http://zora.onko-i.si/index.php?mod=mi_triazniHPV (december 2010)
- Poljak M. 2007. Štirivalentno cepivo proti okužbi s HPV končno v EU. *ISIS: glasilo Zdravniške zbornice Slovenije*, 16, 1: 44–45
- Poljak M., Brenčič A., Seme K., Vince A., Marin I. J. 1999. Comparative evaluation of first- and second-generation Digene Hybrid Capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3: 796–797
- Poljak M., Kocjan B.J. 2010. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8: 11391–162
- Poljak M., Kocjan B. J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 9: 60–72
- Poljak M., Kovanda A., Kocjan B. J., Jančar N., Vrtačnik Bokal E. 2009. The Abbott RealTime High Risk HPV test: Comparative evaluation of analytical specificity and

- clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 18: 94–103
- Poljak M., Marin I. J., Seme K., Vince A. 2002. Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *Journal of Clinical Virology*, 25: 89–97
- Sapp M., Day P.M. 2009. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*, 384: 400–409
- Seme K., Fujs K., Kocjan B. J., Poljak M. 2006. Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture 2 HPV DNA Test using polymerase chain reaction and genotyping. *Journal of Virological Methods*, 134: 252–256
- Stanley M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24, 1: 16–22
- Stanley M. A. 2009. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian Journal of Medical Research*, 130: 266–276
- Stanley M. A., Pett M.R., Coleman N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35, 6: 1456–1460
- Stevaux O., Dyson N. J. 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 684–691
- Trottier H., Franco E. L. 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24: 4–15
- Winer R. L., Lee S. K., Hughes J. P., Adam D. E., Kiviat N. B., Koutsky L. A. 2003. Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female University students. *American Journal of Epidemiology*, 157; 218–226

Yugawa T., Kiyono T. 2009. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology*, 19: 79–113

Zheng Z. M., Baker C. C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Bioscience*, 11: 2286–2302

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za strokovno vodenje in za vse koristne nasvete, ki so pripomogli k nastanku diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi so-mentorici dr. Edi Vrtačnik Božal, dr. med., za dodatne strokovne nasvete.

Prof. dr. Mariu Poljaku dr. med., se zahvaljujem, ker mi je omogočil izvedbo diplomskega dela v svojem laboratoriju, za strokovne nasvete in za temeljito opravljeno recenzijo diplomske naloge.

Za vso pomoč, prijaznost, spodbudne besede in razne strokovne nasvete se zahvaljujem Tini, Kristini, Blanki in vsem ostalim iz Laboratorija za molekularno biologijo in diagnostiko aidsa in hepatitisov. Posebej bi se rada zahvalila Petri Markočič, ki me je uvedla v raziskovalno delo.

Največja zahvala gre mojim staršem, sestri in Blažu, ki so mi skozi vsa leta študija stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame. Hvala za potrpežljivost in skrb.

Nenazadnje hvala tudi vsem prijateljicam/prijateljem za vso podporo in spodbudne besede, kadar sem jih najbolj potrebovala.

PRILOGE

Priloga A: Skladnost vseh rezultatov, pridobljenih z hc2 in Abbott HR HPV testom, v primerjavi z rezultati genotipizacije

Zaporedna številka vzorca	Šifra preiskovanke	Rezultati primarnega hc2 testiranja (RLU/CO)	Rezultati drugega hc2 testiranja (RLU/CO)	RLU/CO \geq 1 (pozitiven rezultat)	Rezultati tretjega hc2 testiranja (RLU/CO)	hc2 končni rezultat	Abbott HR HPV končni rezultat	Genotip HPV
1	06254	2,35	0,19		0,15	neg	neg	/
2	17074	1,37	0,27		0,15	neg	neg	/
3	01358	2,22	0,18		0,16	neg	neg	/
4	21012	1,45	0,26		0,16	neg	neg	/
5	20170	1,26	0,88		0,16	neg	neg	/
6	15301	1,15	0,20		0,17	neg	neg	/
7	14077	1,66	0,21		0,17	neg	neg	/
8	10084	1,27	0,28		0,17	neg	neg	/
9	14018	1,81	0,27		0,18	neg	neg	/
10	17073	1,29	0,21		0,19	neg	neg	/
11	11035	1,62	0,12		0,20	neg	neg	/
12	22029	1,11	0,21		0,20	neg	neg	/
13	17065	1,44	0,23		0,21	neg	neg	/
14	02101	1,10	0,24		0,21	neg	neg	/
15	22036	1,18	0,25		0,21	neg	neg	/
16	03006	1,17	0,19		0,22	neg	neg	/
17	20199	1,15	0,44		0,23	neg	neg	/
18	14013	1,10	0,22		0,24	neg	neg	/
19	02072	1,32	0,27		0,24	neg	neg	/
20	03019	2,06	0,15		0,26	neg	neg	/
21	19106	1,12	0,21		0,27	neg	neg	/
22	01401	1,08	0,23		0,27	neg	neg	/
23	11006	1,69	0,19		0,29	neg	neg	/
24	11105	1,05	0,59		0,32	neg	neg	/
25	02017	1,62	0,39		0,35	neg	poz	16
26	20182	1,18	0,50		0,37	neg	neg	/
27	17283	1,02	0,94		0,37	neg	neg	/
28	05104	1,07	0,16		0,39	neg	neg	/
29	18134	1,10	0,45		0,40	neg	neg	/
30	01631	1,84	0,74		0,41	neg	neg	/
31	07070	1,24	0,38		0,44	neg	neg	/
32	02107	1,78	0,57		0,47	neg	neg	/
33	01349	2,02	0,92		0,80	neg	neg	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge A: Skladnost vseh rezultatov obeh metod v primerjavi z rezultati genotipizacije

Zaporedna številka vzorca	Šifra preiskovanke	Rezultati primarnega hc2 testiranja (RLU/CO)	Rezultati drugega hc2 testiranja (RLU/CO)	RLU/CO \geq 1 (pozitiven rezultat)	Rezultati tretjega hc2 testiranja (RLU/CO)	hc2 končni rezultat	Abbott HR HPV končni rezultat	Genotip HPV
34	07132	2,00	0,42		0,81	neg	neg	/
35	17060	1,79	0,72		0,82	neg	neg	/
36	01538	1,14	0,98		0,82	neg	poz	18
37	17216	1,33	0,72		0,95	neg	neg	/
38	12026	2,17	0,96		1,03	poz	neg	52
39	05173	1,48	0,66		1,12	poz	poz	33
40	01243	1,93	0,25		3,43	poz	neg	67
41	09069	1,03	0,45		4,11	poz	neg	31, 39
42	07164	1,15	1,02		/	poz	neg	42, 89
43	10018	1,02	1,04		/	poz	neg	neg
44	20065	1,29	1,25		/	poz	neg	67
45	14038	1,40	1,50		/	poz	neg	67
46	01397	1,32	1,51		/	poz	neg	67
47	24008	1,45	1,67		/	poz	neg	neg
48	06257	1,39	1,72		/	poz	neg	53, 55
49	01807	1,83	2,33		/	poz	neg	42
50	01191	1,88	2,34		/	poz	neg	neg
51	01421	2,30	2,38		/	poz	neg	55
52	06271	1,14	2,61		/	poz	neg	69,71
53	24050	2,05	2,78		/	poz	neg	neg
54	24018	1,86	2,91		/	poz	neg	55
55	17058	1,93	3,00		/	poz	neg	53
56	24010	1,33	3,31		/	poz	neg	neg
57	06413	1,59	4,16		/	poz	neg	53
58	10041	1,53	4,56		/	poz	neg	53
59	09042	1,44	5,23		/	poz	neg	61
60	10020	2,25	6,49		/	poz	neg	neg
61	02180	2,38	10,14		/	poz	neg	neg
62	08027	1,19	1,94		/	poz	neg	31, 53
63	02047	1,33	2,05		/	poz	neg	58
64	07112	1,95	2,70		/	poz	neg	68
65	04034	1,73	3,97		/	poz	neg	68
66	21048	1,43	4,08		/	poz	neg	45, 53
67	01789	1,41	1,06		/	poz	poz	40, 51
68	07056	1,14	1,11		/	poz	poz	31
69	20200	2,18	1,13		/	poz	poz	16, 18, 42

Se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge A: Skladnost vseh rezultatov obeh metod v primerjavi z rezultati genotipizacije

Zaporedna številka vzorca	Šifra preiskovanke	Rezultati primarnega hc2 testiranja (RLU/CO)	Rezultati drugega hc2 testiranja (RLU/CO)	RLU/CO ≥ 1 (pozitiven rezultat)	Rezultati tretjega hc2 testiranja (RLU/CO)	hc2 končni rezultat	Abbott HR HPV končni rezultat	Genotip HPV
70	02041	2,08	1,24	/	/	poz	poz	39
71	15161	1,02	1,31	/	/	poz	poz	45
72	01193	1,17	1,33	/	/	poz	poz	45
73	11158	1,70	1,34	/	/	poz	poz	18, 51
74	01800	1,22	1,49	/	/	poz	poz	6, 51, 55, 61
75	20121	1,33	1,52	/	/	poz	poz	66, 73
76	06019	1,96	1,56	/	/	poz	poz	31, 89
77	06263	1,72	1,67	/	/	poz	poz	53, 66, 89
78	17044	2,20	1,91	/	/	poz	poz	39
79	20083	1,77	2,01	/	/	poz	poz	51, 53, 62
80	11016	1,67	2,04	/	/	poz	poz	16, 42
81	10078	1,76	2,09	/	/	poz	poz	18
82	23082	2,48	2,20	/	/	poz	poz	31, 42, 54, 70
83	05170	1,18	2,28	/	/	poz	poz	16, 62
84	15375	1,56	2,28	/	/	poz	poz	31, 53, 54
85	17087	1,43	2,44	/	/	poz	poz	45, 53
86	15108	1,16	2,56	/	/	poz	poz	59, 62, 73
87	04076	1,10	2,64	/	/	poz	poz	90
88	20033	2,13	2,73	/	/	poz	poz	16, 54
89	02192	1,39	2,74	/	/	poz	poz	53, 58
90	06201	1,04	2,84	/	/	poz	poz	42, 51
91	14039	1,30	2,94	/	/	poz	poz	16, 89
92	02103	2,18	3,23	/	/	poz	poz	31
93	17253	1,34	3,49	/	/	poz	poz	16
94	07111	1,18	3,77	/	/	poz	poz	51
95	08007	1,86	3,95	/	/	poz	poz	39
96	17079	1,38	4,51	/	/	poz	poz	52, 66
97	06071	2,18	6,43	/	/	poz	poz	52
98	02050	2,05	9,26	/	/	poz	poz	51
99	01638	1,47	9,72	/	/	poz	poz	16, 45
100	02167	1,03	10,23	/	/	poz	poz	59
101	20099	2,42	17,50	/	/	poz	poz	16, 31, 39, 42, 66

negativni z obema metodama;
 pozitivni z obema metodama;
 neskladni rezultati, pri katerih smo z genotipizacijo razrešili HPV-status v vzorcu; rdeča zaporedna številka označuje vzorce, katerih rezultat primarnega hc2 testiranja se ujema z končnimi rezultati vse testiranj (44,5 %)