

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra VUČKO

**PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE DNA V  
POSTOPKU DOKAZOVANJA OKUŽB S HUMANIMI VIRUSI  
PAPILOMA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF MANUAL AND AUTOMATIC DNA ISOLATION  
METHODS FOR DETECTION OF INFECTIONS WITH HUMAN  
PAPILLOMAVIRUSES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, in sicer v Laboratoriju za molekularno biologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Maria Poljaka, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentor: prof. dr. Mario Poljak

Recenzentka: prof.dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof.dr. Darja Žgur Bertok,  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.,  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo.

Članica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.,  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo.

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD

DK UDK 578.7:577.2.083:616-071(043)=863

KG virusi/humani virusi papiloma/HPV/diagnostične metode/izolacija DNA/ročna izolacija DNA/avtomatska izolacija DNA/Amplicor HPV Test/BioRobot EZ1

AV VUČKO, Petra

SA POLJAK, Mario (mentor)/SEME, Katja (recenzentka)

KZ SI-1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije

LI 2007

IN PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZLOCIJE DNA V POSTOPKU DOKAZOVANJA OKUŽB S HUMANIMI VIRUSI PAPILOMA

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP X, 41 str., 4 pregl., 2 sl., 1 pril., 86 vir.

IJ SI

JI sl/en

AI Humani papiloma virusi (HPV) okužijo ploščate epiteljske celice in tako povzročajo različne bolezni. Najpomembnejša je dolgotrajna okužba ploščatih epiteljskih celic sluznice materničnega vratu z visoko rizičnimi genotipi HPV, saj lahko vodi v nastanek raka materničnega vratu. Dokazovanje okužb s HPV običajno poteka z metodo Digene Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA) (hc2), ki lahko daje lažno pozitivne oz. lažno negativne rezultate. Zato se v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani poleg te metode za potrditev rezultatov (mejne vrednosti) hc2 uporablja tudi dokazovanje okužb z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) po predhodni izolaciji DNA HPV. Namen primerjave dveh metod je bil ugotoviti, ali je mogoče v postopku dokazovanja s PCR standardno ročno metodo zamenjati z avtomatsko. V raziskavo smo vključili 144 vzorcev, brisov materničnega vratu, iz katerih smo z obema metodama sočasno izolirali DNA. Ugotovili smo, da sta obe metodi za izolacijo DNA primerljivi. Zaradi hitrejšega postopka izolacije in manjše možnosti kontaminacije vzorca s strani laboratorijskega osebja bo avtomatska metoda izolacije uspešno nadomestila standardno ročno metodo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN

DC UDC 578.7:577.2.083:616-071(043)=863

CX viruses/human papillomavirus/HPV/diagnostic methods/DNA isolation/manual  
DNA isolation/automatic DNA isolation/Amplicor HPV Test/BioRobot EZ1

AU VUČKO, Petra

AA POLJAK, Mario (supervisor)/SEME, Katja (reviewer)

PP SI-1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology

PY 2007

TI COMPARISON OF MANUAL AND AUTOMATIC DNA ISOLATION  
METHODS FOR DETECTION OF INFECTIONS WITH HUMAN  
PAPILLOMAVIRUSES

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 41 p., 4 tab., 2 fig., 1 ann., 86 ref.

LA SI

AL sl/en

AB Human papillomaviruses (HPV) infect squamous epithelial cells and are thus capable of causing different diseases. The most important is a persistent infection of cervical squamous epithelial cells with high-risk genotypes of HPV which can lead to cervical cancer. Diagnosis of HPV infection is routinely based on Digene Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Digene Corporation, Gaithersburg, USA) (hc2), which can produce false positive or false negative results. Consequently, in the Laboratory for molecular diagnostics and diagnostics of hepatitis viruses and aids at the Institute of Microbiology and Immunology apart from using hc2 they also use polymerase chain reaction (PCR) for the confirmation of the borderline hc2 results. The intention of the comparison of the two methods was to establish if it is possible to replace a standard manual method for DNA extraction with an automatic one during PCR detection of HPV. In the study we have included 144 samples of uterine cervix from which we have simultaneously extracted DNA with both methods. We have found out that both methods have the same effectiveness for DNA extraction. Because of more rapid isolation procedure and minor possibility of contamination from laboratory personnel, the automatic method can successfully replace the standard one.

## 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
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 HUMANI PAPILOMA VIRUSI	2
2.1.1 Zgradba	2
2.1.2 Patogeneza	3
2.1.3 Epidemiologija	7
2.1.4 Klinična slika	9
2.1.5 Imunski odziv	10
2.1.6 Zdravljenje in preventiva	12
2.1.6.1 Presejalni testi	12
2.1.6.2 Cepiva	12
2.2 DOKAZOVANJE OKUŽB S HPV	13
2.2.1 Hybrid Capture II (hc2)	13
2.2.2 PCR	14
2.2.2.1 Dokazovanje produktov PCR	15
2.2.3 Izolacija DNA HPV	17
2.3 NAMEN DELA	17
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>19</b>
3.1 VZORCI	19

<b>3.2</b>	<b>METODE DELA</b>	<b>19</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Ročna izolacija DNA</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Avtomatska izolacija DNA</b>	<b>22</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Pomnoževanje izolirane DNA</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Dokazovanje produktov PCR</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>28</b>
5.1	UVOD	28
5.2	ANALIZA REZULTATOV	28
5.3	SKLEPI	29
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>31</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priprava delovnega pufra	20
Preglednica 2: Prikaz skladnosti rezultatov po izolaciji DNA z ročno in avtomatsko metodo	26
Preglednica 3: Prikaz skladnosti rezultatov po ponovljenem pomnoževanju DNA in dokazovanju pomnoženih produktov ter po ponovljeni izolaciji	27
Preglednica 4: Prikaz rezultatov treh neskladnih vzorcev po ponovljenem pomnoževanju DNA in dokazovanju pomnoženih produktov ter po ponovljeni izolaciji	27

## KAZALO SLIK

Slika 1: BioRobot EZ1	22
Slika 2: Delovna miza BioRobota EZ1	23



## KAZALO PRILOG

Priloga A: Pregled rezultatov po izolaciji z ročno in avtomatsko metodo

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CAR	carrier RNA
CIN	cervikalna intraepitelijska neoplazija
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
FDA	Ameriška Uprava za hrano in zdravila (angl. Food & Drug Administration)
hc2	Digene Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA)
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
HPV	humani papiloma virusi (angl. human papillomaviruses)
IFN	interferon (angl. interferon)
IgG/IgA	protitelesa imunoglobulinskega razreda G/A
ORF	odprti bralni okvir (angl. open reading frame)
ORI	mesto za začetek replikacije (angl. origin of replication)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
Rb	beljakovine retinoblastomske družine (angl. retinoblastom)
VLP	virusom podobni delci (angl. virus like particles)

## 1 UVOD

Humani papiloma virusi (HPV, angl. human papillomaviruses) so majhni virusi, ki sestavljajo samostojno družino virusov poimenovano *Papillomaviridae*. Z medicinskega stališča so pomembni kot povzročitelji bradavic in drugih benignih tumorjev ploščatega epitelija, predvsem pa zaradi povzročanja raka materničnega vratu, ki se razvije po dolgotrajni okužbi materničnega vratu z visokorizičnimi genotipi HPV. Dejstvo, da kar v 99 % tumorjev najdemo deoksiribonukleinsko kislino (DNA, angl. deoxyribonucleic acid) HPV dokazuje, da so prav HPV glavni razlog za nastanek in razvoj te vrste raka (Longworth in Laimins, 2004).

Rak materničnega vratu je druga najpogostejša oblika raka, ki prizadene ženske. Letno po svetu odkrijejo okoli 500.000 novih primerov raka te vrste (Brooks in sod., 2004). Stopnja smrtnosti je približno 50 % (Molijn in sod., 2005). V državah v razvoju je prav rak materničnega vratu najpogostejši vzrok smrti zaradi raka (Brooks in sod., 2004).

Dokazovanje okužb s HPV večinoma poteka z metodo Digene Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA) (hc2). Zaradi ugotovitve, da ta lahko da lažno pozitivne oz. lažno negativne rezultate (Poljak in sod., 2002) se v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani poleg te metode uporablja tudi dokazovanje okužb z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) (Seme in sod., 2006). Prva stopnja tega postopka je izolacija DNA HPV iz kliničnih vzorcev.

S primerjavo ročne in avtomatske metode izolacije DNA HPV iz vzorcev materničnega vratu smo želeli ugotoviti, ali je mogoče v postopku dokazovanja okužb s HPV s PCR standardno metodo izolacije DNA zamenjati z avtomatsko metodo.

Pričakovali smo, da bosta obe metodi izolacije DNA enako učinkoviti. V postopku dokazovanja okužb bo lahko avtomatska metoda zaradi večje hitrosti in manjše možnosti kontaminacije uspešno nadomestila standardno ročno metodo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 HUMANI PAPILOMA VIRUSI

Humani papiloma virusi (HPV) spadajo v družino *Papillomaviridae*, ki vsebuje 16 rodov poimenovanih z grškimi črkami. Kot posamezen rod se opredeli skupino HPV, ki z drugo skupino HPV deli le manj kot 60 % nukleotidnega zaporedja gena L1. Znotraj rodov se HPV delijo na vrste, ki imajo med seboj enakega 60 do 70 % nukleotidnega zaporedja gena L1. Genotipi HPV so si enaki v 71 do 89 % zaporedja gena za L1 (de Villiers in sod., 2004). Genitalni HPV se nahajajo v rodu  $\alpha$  HPV (Muñoz in sod., 2006). Znanih je več kot 100 genotipov HPV in več kot 40 od teh je zmožnih okužbe anogenitalnega trakta (Walboomers in sod., 1999).

Na podlagi tarčnega tkiva lahko HPV delimo na kožne in sluznične HPV (Murray in sod., 2002). Pogosto uporabljena je tudi delitev genotipov HPV na visokorizične genotipe, ki so povezani z nastankom raka materničnega vratu, in nizkorizične genotipe, ki so sposobni povzročiti le benigne spremembe. 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, HPV-68, HPV-73 in HPV-82. Za potencialno onkogene genotipe veljajo še HPV-26, HPV-53 in HPV-66 (Muñoz in sod., 2003).

#### 2.1.1 Zgradba

HPV so virusi brez ovojnice z ikozaedrično kapsido, katere premer meri od 50 do 55 nm (Brooks in sod., 2004). Kapsida je sestavljena iz 72 pentamerov strukturne beljakovine L1 in 12 molekul strukturne beljakovine L2 (Molijn in sod., 2005).

Genom HPV predstavlja približno 8 kbp dolga dvojno vijačna DNA krožne oblike (Brooks in sod., 2004). Vsi geni virusne DNA so locirani samo na eni, in sicer pozitivni verigi DNA (Murray in sod., 2002). Virusno DNA lahko razdelimo na tri regije: zgodnjo, pozno in dolgo kontrolno regijo. Te tri regije ločujeta dve poliadenilacijski mesti, zgodnje in pozno (Zheng in Baker, 2006).

Zgodnja regija zavzema več kot 50 % virusnega genoma in običajno kodira 6 odprtih bralnih okvirjev (ORF, angl. open reading frame) (E1, E2, E4, E5, E6, E7). K tej regiji spadata še dva ORF, in sicer E3 in E8, ki ju najdemo le v nekaterih genotipih HPV (Zheng in Baker, 2006).

Pozna regija HPV pokriva skoraj 40 % genoma in kodira 2 ORF (L1 in L2), ki se prepišeta v večjo in manjšo kapsidno beljakovino (Zheng in Baker, 2006).

Med obema kodirajočima regijama se nahaja dolga kontrolna regija, ki obsega približno 1000 bp dolg segment in nima kodirajoče funkcije (Muñoz in sod., 2006). Gre za regijo v kateri se nahaja mesto za začetek replikacije (ORI, angl. origin of replication) in več mest za vezavo transkripcijskih faktorjev, ki regulirajo prepisovanje DNA od zgodnjega in poznega promotorja (Zheng in Baker, 2006).

Najbolj raziskan je genom HPV-16. Genom tega virusa vsebuje dva večja promotorja (P97 in P670). P97 leži navzgor od ORF E6 in je odgovoren za gensko izražanje skoraj vseh zgodnjih genov (Smotkin in Wettstein, 1986). Promotor P670 leži znotraj ORF E7 in je odgovoren za izražanje poznih genov (Grassman in sod., 1996). V genomu HPV se nahajajo tudi manjši promotorji, vendar je njihova vloga zaenkrat še neznana (Rosenstierne in sod., 2003).

### **2.1.2 Patogeneza**

HPV z visoko afiniteto okužijo epitelijske celice kože in sluznic. Do okužbe celic pride preko zelo majhnih ranic v epiteliju, ki virusom omogočajo dostop do bazalnih plasti kože ali sluznic (Longworth in Laimins, 2004).

Infekcijski cikel HPV je dobro prilagojen diferenciacijskemu programu tarčnih celic, keratinocitov (Stanley, 2006). HPV okužijo primitivne keratinocite v bazalni plasti kože (Stern, 2005). V nediferenciranih keratinocitih se začne pomnoževanje virusne DNA s pomočjo celičnega replikacijskega aparata. Virusno dozorevanje poteka skladno z dozorevanjem keratinocitov in se torej začne v notranjosti epitelija, zaključi pa na površju

le-tega. Tu se keratinociti dokončno diferencirajo v luskaste celice (Stanley, 2006), iz katerih se po odmrtnosti sproščajo dovršeni virusni delci (Muñoz in sod., 2006).

Replikacijski cikel virusa v epiteliju lahko razdelimo na dva dela. Prvi del cikla poteka v razmnožujočih se keratinocitih. V teh pride do izražanja virusnih genov za zgodnji beljakovini E1 in E2, ki sta potrebni za pomnoževanje virusne DNA. E1 se veže na DNA polimerazo in pomaga privedi celični replikacijski kompleks do virusnega ORI (Frattini in Laimins, 1994; Conger in sod., 1998). Poleg tega ima E1 ATPazno in 3`-5` helikazno aktivnost. Ta mu omogoča ločevanje dveh verig DNA pred replikacijskim kompleksom (Hughes in Romanos, 1993).

E2 se veže na specifično mesto na virusni DNA in pomaga privedi E1 do mesta ORI (Mohr in sod., 1990). Poleg tega je E2 pomemben tudi za regulacijo virusne transkripcije od zgodnjega promoterja (Cripe in sod., 1987). Pri nizkih koncentracijah te beljakovine se zgodnji geni izražajo, pri visokih koncentracijah se beljakovina veže na transkripcijske faktorje in s tem zatira izražanje zgodnjih genov E6 in E7 (Steger in Corbach, 1997). Ta regulacija je pomembna za nadzor števila kopij virusne DNA v nediferenciranih celicah. Proces se zaključi v 20 do 100 kopijah virusne DNA na gostiteljsko celico (Longworth in Laimins, 2004). Poleg tega ima E2 tudi druge funkcije: lahko sproži apoptozo celic in s tem olajša sproščanje virusov iz teh (Blachon in Demeret, 2003). Lahko tudi spodbudi topoizomerzo I k sprostitvi iz DNA in tako igra pomembno vlogo pri pomnoževanju virusne DNA (Clower in sod., 2006).

V začetnih stopnjah okužbe s HPV se virusna DNA v celicah nahaja v episomalni obliki. Z napredovanjem okužbe se DNA vgradi v celični genom, in sicer večinoma tako, da se krožna DNA pretrga na področju gena E2. To povzroči izgubo funkcije E2, kar se kaže kot povečan nivo izražanja ostalih zgodnjih genov. Poveča se tudi izražanje genov za beljakovini E6 in E7, ki sta onkobeljakovini in vodita v nastanek raka materničnega vratu (Jeon in sod., 1995).

Prekinitev gena za E2 ni edini dejavnik, ki lahko povzroči prekomerno izražanje genov za beljakovini E6 in E7, saj do razvoja raka materničnega vratu pride tudi v primeru

neprekinjenega zapisa za E2. Leta 1996 so Thain in sod. ugotovili, da metilacija cisteinov na vezavnih mestih za E2 onemogoči vezavo beljakovine na ta mesta. Zaradi tega ne pride do represije s strani E2 in se poveča izražanje onkobeljakovin.

Onkobeljakovini E6 in E7 visokorizičnih genotipov HPV igrata v patogenezi pomembno vlogo, saj povročita ponoven prehod celic v celični cikel in nesmrtnost celic. E6 se veže na beljakovino p53, ki deluje kot tumorski supresor in lahko sproži prekinitev celičnega cikla ali apoptozo (Longworth in Laimins, 2004). E6 z vezavo povzroči ubikvitinacijo p53 in posledično razgradnjo proteasoma 26S. To vodi v skrajšanje razpolovne dobe p53, in sicer iz nekaj ur na 20 minut (Hubbert in sod., 1992). E6 se lahko veže tudi na koaktivator p53 p300/CBP in tako zniža aktivnost p53 (Zimmermann in sod., 1999). Zmanjšana aktivnost p53 onemogoča prepoznavo celic s poškodovano DNA, prav tako je onemogočena prepoznavna z virusi okuženih celic. Ker je p53 odgovoren tudi za nadzor nad G1/S in G2/M kontrolnimi točkami celičnega cikla, pride zaradi inaktivacije te beljakovine do neomejenega podvojevanje oz. transformacije celic (Foster in sod., 1994; Kesis in sod., 1993). Samo interakcija E6 s p53 naj ne bi bila dovolj za povzročitev nesmrtnosti celic (Liu in sod., 1999). Za to je potrebna tudi interakcija E6 z beljakovinami PDZ družine (Psd-95, Dlg, ZO-1) (Lee in sod., 2000) in s hTERT telomerazo (Klingelutz in sod., 1996).

E7 so v patogenezi HPV pomembni zaradi zmožnosti vezave z beljakovinami retinoblastomske družine (Rb, p107, p130) (Munger in sod., 1989). Rb je pomemben za gostiteljske celice, saj v nefosforilirani obliki tvori kompleks s transkripcijskimi faktorji E2F/DP1 in tako onemogoča transkripcijo genov v G1 fazi celičnega cikla (Edmonds in Vousden, 1989). Pri prehodu iz G1 v S fazo celičnega cikla pride do fosforilacije Rb s ciklin-kinazo, kar povzroči sprostitev Rb iz transkripcijskega kompleksa; prepisejo se geni, potrebni za sintezo DNA. Vloga E7 v tem procesu je vezava na Rb in sprožitev njegove degradacije, kar vodi v stalno prepisovanje genov za sintezo DNA (Edmonds in Vousden, 1989; Jewers in sod., 1992; Wang in sod., 2001). Beljakovine Rb družine so tudi glavni regulatorji izstopa celic iz celičnega cikla, do katerega pride med diferenciacijo keratinocitov. E7 tako z degradacijo Rb omogoči tudi replikacijo celic v diferenciranih keratinocitih (Longworth in Laimins, 2004).

E7 lahko celično transformacijo povzroči tudi na druge načine, in sicer z vezavo s ciklini A in E ter z inhibitorji od ciklinov odvisne kinaze (p21 in p27) (Funk in sod., 1997; Jones in sod., 1997; Tommasino in sod., 1993; Zerfass-Thome in sod., 1996). Z vezavo na cikline zadrži kinazno aktivnost, kar se kaže kot podaljšana fosforilacija Rb, ki omogoča transkripcijo genov, vpletenih v sintezo DNA (McIntyre in sod., 1996). Vezava na inhibitorje deluje podobno, saj blokira aktivnost inhibitorjev in tako poveča aktivnost od ciklinov odvisnih kinaz (Funk in sod., 1997; Jones in sod., 1997; Zerfass-Thome in sod., 1996).

E7 se lahko veže tudi z deacetilazami histonov, ki imajo podobno kot Rb funkcijo represije E2F inducibilnih promotorjev (Brehm in sod., 1998). Vezava na te beljakovine povzroči nesmrtnost celic in virusno DNA zadržuje v episomalni obliki (Longworth in Laimins, 2004).

Funkciji beljakovin E4 in E5 nista popolnoma znani (Longworth in Laimins, 2004). Za beljakovino E4 je znano, da interagira s citoskeletnimi beljakovinami celice in povzroča sesedanje keratinske mreže v gostiteljskih celicah (Blachon in Demeret, 2003), kar povzroči lažji izstop virusov iz teh (Longworth in Laimins, 2004). Beljakovina E5 sodeluje pri aktivaciji receptorjev za rastne faktorje. Pri nekaterih genotipih HPV E5 deluje tudi tako, da negativno regulira poglobitveni histokompatibilnostni kompleks I (MHCI, angl. major histocompatibility complex I) in s tem preprečuje imunski nadzor nad virusom (Ashrafi in sod., 2006).

Izražanje zgodnjih genov HPV poteka od zgodnjega promotorja, ki je pri HPV-16 označen kot P97. Transkripcijo od tega promotorja regulirajo cis-elementi (Zheng in Baker, 2006), ki se vežejo na vezavna mesta v dolgi kontrolni regiji, in sicer navzgor od ORF E6 (Longworth in Laimins, 2004). Za izražanje poznih genov je odgovoren pozni promotor (pri HPV-16 je to P670). Njegova aktivnost je regulirana s cis-elementom, ki leži v E6 in E7 kodirajoči regiji. Transkripcija od tega promotorja lahko poteka le v diferenciranih keratinocitih (Zheng in Baker, 2006), kar pomeni, da je za začetek prepisovanja od tega



promotorja odgovoren za diferencirane celice specifičen celični faktor (Longworth in Laimins, 2004).

Drugi del cikla poteka v višjih plasteh ploščatega epitelija, v katerih so keratinociti že popolnoma diferencirani in se ne razmnožujejo več. Tu pride do izražanja virusnih genov, ki kodirajo virusne beljakovine in so potrebni za sestavljanje virusnih delcev (Brooks in sod., 2004). Izražati in sestavljati se začneta pozni beljakovini L1 in L2, ki spontano tvorita virusno kapsido (Longworth in Laimins, 2004).

Čas od infekcije celic s HPV do sprostitve novih virusnih delcev je enak času, ki je potreben za popolno diferenciacijo keratinocitov, kar pomeni približno 3 tedne (Stanley, 2006).

### **2.1.3 Epidemiologija**

Visokorizični HPV so nujen dejavnik za nastanek raka materničnega vratu, kar potrjuje dejstvo, da se DNA teh virusov nahaja kar v 99,7 % tumorjev (Walboomers in sod., 1999).

Okužbe s HPV v današnjem času veljajo za najpogostejše spolno prenosljive bolezni, saj prevalenca žensk okuženih s HPV v populaciji dosega tudi do 44 % (Trottier in Franco 2006). Kar več kot 50 % spolno aktivnih žensk naj bi bilo vsaj enkrat v življenju okuženih z vsaj enim genotipom HPV (Baseman in Koutsky, 2005). Okoli 105.000.000 žensk po celem svetu naj bi bilo vsaj enkrat v življenju okuženih s HPV-16 ali HPV-18 (Burchell in sod., 2006). Višja prevalenca okužb je opazna pri mlajših spolno aktivnih ženskah (Trottier in Franco, 2006). S staranjem prevalenca upada, vendar se lahko v obdobju menopavze ali po tej ponovno poveča (Smith in sod., 2004), ker lahko pride do reaktivacije latentnega virusa (Trottier in Franco, 2006).

Podobno kot prevalenca je tudi incidenca okužb s HPV najvišja pri mladih spolno aktivnih ženskah in z leti pada. Prav tako je včasih opazen tudi ponoven porast incidence pri starejših ženskah (Franco in sod., 1999). Incidenca okužb z visokorizičnimi genotipi je dokazano pogostejša od okužb z nizkorizičnimi genotipi (Richardson in sod., 2003).

Za okužbo s HPV je seveda pomemben tudi prenos HPV, do katerega v primeru genitalnih okužb pride preko spolnih stikov posameznikov. Za uspešno okužbo s HPV so potrebne majhne odrgnine in ranice, ki nastanejo med spolnim odnosom (Moscicki, 2005). Prenosljivost okužb v primeru HPV znaša okoli 60 % (Bruchell in sod., 2006) in je odvisna od virusnega bremena, sočasne okužbe z drugimi spolno prenosljivimi boleznimi, uporabe kondomov, imunskega odziva in prehranjevalnih navad. Prenosljivost HPV je višja kot prenosljivost ostalih virusnih spolno prenosljivih bolezni in je primerljiva s prenosljivostjo bakterijskih spolno prenosljivih bolezni (Bruchell in sod., 2006).

Rak se vendarle ne razvije pri vseh posameznicah, okuženih s HPV, kar pomeni, da je za napredovanje okužbe v rakasto stanje odgovornih več dejavnikov. Te lahko v splošnem razdelimo v tri skupine, in sicer na virusne, gostiteljske in okoljske oz. zunanje dejavnike (Muñoz in sod., 2006). Najpomembnejši dejavnik za tveganje je veliko število spolnih partnerjev, saj so prav ti odgovorni za prenos in nastanek okužbe (Baseman in Koutsky, 2005). Dokazano je, da razvoj raka povečujejo tudi dolgotrajna uporaba hormonskih kontracepcijskih sredstev, kajenje, sočasna okužba s človeškim virusom imunske pomanjkljivosti (HIV, angl. human immunodeficiency virus) in visoka rodnost (pri kateri je pomembno tako število nosečnosti kot tudi starost pri prvi nosečnosti). Poleg teh za možne kofaktorje veljajo tudi sočasna okužba s *Chlamydia trachomatis* ali virusom herpes simplex genotipa 2 (Muñoz in sod., 2006), kronično vnetje in oslabljen imunski sistem posameznice (Trottier in Franco, 2006).

Okužba s HPV večinoma izzveni sama od sebe. Pri 70 % žensk okuženih z določenim genotipom HPV po 12 mesecih virus istega genotipa ni več prisoten. Po 18 mesecih je takih žensk kar 80 % (Ho in sod., 1998). V kolikšnem času bo telo uničilo virus, je odvisno tudi od samega virusa. V primerjavi z drugimi genotipi je za uničenje HPV-16 potrebno relativno dolgo časa (Richardson in sod., 2003).

Okužbe, ki jih gostitelj ne zatire, lahko napredujejo in povzročijo nastanek raka materničnega vratu. Gre za drugo najpogostejšo obliko raka, ki prizadene ženske. V letu 2000 so na novo odkrili kar 470000 primerov te vrste raka, 80 % od tega v državah v

razvoju. Rak materničnega vratu je tretji najpogostejši vzrok smrtnosti zaradi raka po svetu, smrtnost je največja v državah v razvoju (Jones, 1999; Pecorelli in sod., 2003).

V svetu v rakasto spremenjenih celicah najpogosteje najdemo HPV-16, ki povzroči razvoj 54 % invazivnih tumorjev materničnega vratu, s 17 % mu sledi HPV-18 (Muñoz in sod., 2003).

Inkubacijska doba, ki poteče od okužbe do pojava simptomov, je zelo variabilna in odvisna od genotipa HPV. Genitalne bradavice se lahko pojavijo že nekaj mesecev po okužbi, medtem ko je za razvoj raka materničnega vratu potrebno tudi desetletje ali več (Moscicki, 2005).

#### **2.1.4 Klinična slika**

Tipična klinična slika, ki nastane po okužbi s HPV, so bradavice, ki se nahajajo na različnih delih telesa. Najpogosteje jih najdemo na prstih rok in na stopalih, lahko pa se pojavijo tudi na notranjih in zunanjih genitalnih področjih. V tem primeru gre za genitalne bradavice ali *condylomata acuminata* (Moscicki, 2005). Genitalne bradavice so spolno prenosljive. Lahko se pojavljajo posamezno, vendar jih večinoma najdemo več na kupu, pogosto se tudi zraščajo (Kumar in sod., 2005).

Bradavice povzročajo nizkorizični genotipi HPV. Kar za 97 % genitalnih bradavic sta odgovorna HPV-6 in HPV-11 (Brown in sod., 1999). Tako genitalne kot tudi vse druge bradavice povzročene z nizkorizičnimi HPV so benigne in torej ne povzročajo rakastih sprememb celic (Moscicki, 2005).

Nasprotno od okužbe z nizkorizičnimi genotipi lahko kronična okužba z visokorizičnimi genotipi povzroči nastanek raka materničnega vratu. Izražanje virusnih beljakovin med okužbo povzroči patološke spremembe celic (Moscicki, 2005). Prva stopnja v razvoju raka je CIN I (cervikalna intraepitelijska neoplazija), pri kateri so opazne blage spremembe celic (Murray in sod., 2002), kot so povečava jedra in nastanek koilocitov v površinskih epiteljskih celicah. Sledi ji CIN II (zmerna displazija), pri kateri so atipične celice prisotne v spodnjih dveh tretjinah epitelija. Velikost celičnih jeder variira, celice izgubijo polarnost,

povečajo se mitotične strukture. Celice že kažejo značilnosti malignih celic. Z napredovanjem lezij pride do izgube sposobnosti diferenciacije epitelijskih celic, kar se kaže kot atipičnost celic v vseh plasteh epitelija. Tako stanje označuje CIN III (resna displazija ali karcinom *in situ*) (Kumar in sod., 2005). Karcinom *in situ* je izraz za prekancerogeno stanje, iz katerega se lahko razvije rak ploščatih celic materničnega vratu oz. invazivni rak materničnega vratu.

Razvoj invazivne oblike raka od karcinoma *in situ* (stopnja 0) dalje poteka v več stopnjah. V stopnji I se razvije karcinom, ki ostane omejen le na maternični vrat. V drugi in tretji stopnji pride do razširitve karcinoma na medenični obroč in nožnico. V zadnji (četrti) stopnji je že opazna metastatična razširitev karcinoma po telesu. Poleg invazivne oblike raka materničnega vratu poznamo še adenokarcinom, adenoskvamozni karcinom, nediferenciran karcinom in druge redkejšje genotipe karcinomov. Ti predstavljajo 10 do 25 % vseh karcinomov materničnega vratu (Kumar in sod., 2005).

Poleg raka materničnega vratu lahko HPV povzročajo tudi druge vrste raka, in sicer raka zunanjih ženskih spolovil in raka penisa (Kumar in sod., 2005) ter raka na tonzilah (Muñoz in sod., 2006).

### **2.1.5 Imunski odziv**

HPV imajo več mehanizmov za izmikanje imunskemu odzivu gostitelja. Virus okuži keratinocite in se v njih tudi razmnožuje. Ker so keratinociti določeni za propad in odlučenje, so daleč od imunsko kompetentnih celic in zato niso pod nadzorom le-teh. Novi virusni delci se iz okuženih celic sprostijo po njihovem naravnem propadu in tako s svojo replikacijo, sestavljanjem in sproščanjem ne povzročajo citolize. Virusne infekcije tudi ne spremlja vnetje, saj virus tarčne celice ne uniči in s tem v poteku okužbe ni nobenega signala, ki bi gostiteljsko celico opozoril na prisotnost virusa (Stanley, 2006).

Tudi v odsotnosti citolize in celične smrti bi preko okuženih keratinocitov morale priti do aktivacije antivirnega obrambnega sistema s pomočjo interferonov (IFN, angl. interferon), vendar so HPV razvili mehanizem za inhibicijo sinteze IFN in prekinitev

signaliziranja le-teh (Stanley, 2006). Visokorizični genotipi HPV znižujejo izražanje z IFN- $\alpha$  inducibilnih genov (Chang in Laimins, 2000; Nees in sod., 2001), onkobeljakovini E6 in E7 HPV-16 pa direktno interagirata s komponentami interferonske signalne poti in tako preprečita signalizacijo (Barnard in McMillan, 1999; Ronco in sod., 1998).

Kljub virusni sposobnosti izmikanja imunskemu odzivu ta prepreči večino okužb s HPV. V prid temu govori dejstvo, da je pogostost okužb s HPV-16 pri ženskah z normalno delujočim imunskim odzivom visoka, vendar v večini subklinična (Nguyen in sod., 2005). Poleg tega večina okužb tudi spontano izveni.

Okužbo omeji in zatre močan in lokaliziran celično posredovan imunski odziv, ki je usmerjen predvsem proti virusnim beljakovinam E2 in E6 (Stanley, 2006). V nadzoru virusne okužbe imajo pomembno vlogo predvsem specifični citotoksični limfociti T, v sodelovanju s celicami T pomagalkami, makrofagi in celice NK (angl. natural killer) (Nguyen in sod., 2005). Makrofagi sintetizirajo tumor nekrotizirajoči faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ki znižuje izražanje genov E6 in E7 v okuženih, vendar še ne transformiranih celicah (Guimarães Gonçalves in Donadi, 2004). Komponente celičnega imunskega odziva se pojavijo v kratkem časovnem obdobju, ki sovpada s pomnoževanjem virusne DNA (Stanley, 2006).

Na velik pomen celično posredovanega imunskega odziva, v obrambi proti HPV, kaže povečana pojavnost in hitrejše napredovanje okužb pri imunsko oslABLjenih posameznicah (Levi in sod., 2004). To je predvsem opazno pri bolnicah po transplantaciji ledvic (Sillman in sod., 1997) ali pri bolnicah okuženih s HIV-1 (Ferenczy in sod., 2003).

Poleg celičnega odziva pride pri okužbi s HPV tudi do indukcije humoralnega imunskega odziva. To se kaže kot prisotnost protiteles imunglobulinskega razreda G (IgG) in imunoglobulinskega razreda A (IgA), ki nastanejo kot odgovor na nekatere antigene HPV (Stanley, 2001; Frazer, 1996). Večina žensk okuženih s HPV-16 razvije sistemski imunski odziv proti beljakovini L1 (Kirnbauer in sod., 1994). Kljub nastanku protiteles prisotnost le-teh v serumu naj ne bi bila povezana z nastankom in prognozo raka materničnega vratu (Silins in sod., 2002).

## 2.1.6 Zdravljenje in preventiva

### 2.1.6.1 Presejalni testi

Najbolj znan test za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu je Pap test, ki temelji na barvanju citoloških vzorcev. Razvil ga je Papanicolaou, in sicer še preden so bolezen povezali s povzročiteljem (Bernard, 2005). Učinkovitost testa podpira dejstvo, da se je pojavnost raka materničnega vratu v severnih evropskih državah od začetka 60. let zmanjšala kar za 80 % (Monsonogo, 2005). Vendar ima Pap test tudi določene omejitve. Občutljivost testa za dokazovanje CIN in invazivnega raka materničnega vratu je okoli 51 %, specifičnost pa okoli 98 % (Nanda in sod., 2000), kar pomeni da test daje veliko lažno negativnih rezultatov. V Združenih državah Amerike se kot presejalni program uporablja ThinPrep Pap Test (Cytex Corporation, ZDA). Gre za avtomatizirano različico citološkega testa, ki omogoča računalniško, in zaradi tega manj subjektivno, obdelavo vzorcev (Monsonogo, 2005).

Poleg Pap testa se za odkrivanje raka materničnega vratu uporablja tudi pregledovanje ustja materničnega vratu po barvanju z očetno kislino (VIA, angl. visual inspection with acetic acid) ali z lugolovo raztopino (VILI, angl. visual inspection with Lugol's iodine). Novejša tehnika je tudi vizualizacija lezij s pomočjo spektrofotometra (Monsonogo, 2005).

### 2.1.6.2 Cepiva

Veliko je bilo narejenega na področju cepiv, ki preprečujejo okužbe s HPV. Najbolj obetavna so cepiva, ki vsebujejo virusom podobne delce (VLP, angl. virus like particles) in vzpodbujajo nastanek protiteles, usmerjenih proti plaščnim beljakovinom HPV. VLP ne vsebujejo virusne DNA in zaradi tega ne morejo okužiti človeških celic ter povzročiti bolezni. Cepljenje vzpodbudi nastanek specifičnih anti-HPV nevtralizirajočih protiteles razreda IgG, ki preprečujejo HPV vstop v gostiteljsko celico. Zaradi specifičnosti protiteles ta ščitijo le proti genotipom HPV, ki so vključeni v cepivo (Poljak, 2007).

Junija 2006 je Ameriška Uprava za hrano in zdravila (FDA, angl. Food and Drug Administration) odobrila uporabo štirivalentnega cepiva družbe Merck Sharp & Dohme, ki

vsebuje VLP genotipov HPV-6, HPV-11, HPV-16 in HPV-18. Isto cepivo je septembra 2006 odobrila tudi Evropska agencija za zdravila (EMA). Cepivo se v ZDA, Kanadi in Avstraliji trži kot GARDASIL<sup>®</sup> v državah Evropske unije pa kot SILGARD<sup>®</sup>. En odmerek cepiva vsebuje 20 do 40 µg rekombinantne beljakovine L1 HPV (Poljak, 2007).

Cepivo je odobreno za uporabo pri dekletih in ženskah, starih od 9 do 26 let. Za osnovno cepljenje so potrebni trije odmerki cepiva, in sicer pri 0, 2 in 6 mesecih. Trajanje zaščite še ni znano, po doslej opravljenih raziskavah naj bi učinkovita zaščita trajala vsaj še 4,5 let po cepljenju (Poljak, 2007).

Tako kot večina cepiv ima tudi GARDASIL<sup>®</sup>/SILGARD<sup>®</sup> stranske učinke. Med temi so najpogostejši povišana telesna temperatura, glavobol, eritem, bolečina in oteklina na mestu aplikacije (Poljak, 2007).

## 2.2 DOKAZOVANJE OKUŽB S HPV

Za dokazovanje okužb s HPV ne moremo uporabljati običajnih tehnik gojenja virusov v celičnih kulturah, ker se v teh virusi ne razmnožujejo. Tudi serološki testi imajo le omejeno vrednost, saj lahko protitelesa v serumu odkrijemo še leta po okužbi, kar nam onemogoča ločevanje med novo okužbo in okužbo v preteklosti (Dillner, 1999).

HPV DNA lahko dokazujemo v brisih materničnega vratu ali v vzorcih odvzetih z biopsijo. Za dokazovanje DNA se kot dopolnilo citologiji uporablja metoda hibridizacije *in situ*, ki temelji na specifični vezavi označenih sond z DNA HPV (Molijn in sod., 2005). Prisotnost DNA HPV lahko dokažemo tudi s testom Southern blot ali s hibridizacijo dot spot (Kuypers in sod., 1993).

### 2.2.1 Hybrid Capture II (hc2)

V veliko državah se za dokazovanje okužb s HPV uporablja metoda hc2 (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA), ki je edina priznana metoda za rutinsko diagnostiko s strani FDA (Poljak in sod., 2002). Metoda temelji na hibridizaciji DNA HPV z označenimi

RNA sondami in dokazovanju DNA-RNA hibridov s specifičnimi monoklonskimi protitelesi ter kemiluminiscentnim substratom. Test vsebuje dve mešanici sond, in sicer eno za dokazovanje 5 nizkorizičnih in drugo za dokazovanje 13 visokorizičnih genotipov HPV (Lörincz, 1996). Kljub temu, da je metoda v nekaterih državah postala standard za dokazovanje okužb s HPV, ima tudi določene omejitve (Molijn in sod., 2005).

Pravilnost pozitivnega rezultata zmanjša dejstvo, da lahko visokorizična mešanica sond navzkrižno reagira kar z 22 drugimi genotipi HPV, ki niso vključeni v mešanico, in tako da lažno pozitivne rezultate (Poljak in sod., 2002). Zaradi tega je potrebno mejne rezultate testa potrditi z alternativno metodo za dokazovanje HPV (Seme in sod., 2006). Metoda hc2 je tudi manj občutljiva od pomnoževanja virusne DNA s PCR, saj je s hc2 mogoče dokazati okužbo le v primeru, da je v vzorcu prisotnih od 1000 do 5000 kopij genoma (Lörincz, 1996).

### **2.2.2 PCR**

PCR je ciklična metoda, s pomočjo katere po več ciklih dobimo veliko kopij iskane DNA, kar olajša dokazovanje prisotnosti DNA v vzorcih. Metoda temelji na denaturaciji DNA, prileganju začetnih oligonukleotidov in pomnoževanju posameznih verig denaturirane DNA s termostabilno polimerazo.

PCR lahko izvajamo z različnimi začetnimi oligonukleotidi, genotipsko specifičnimi ali splošnimi. Genotipsko specifični oligonukleotidi omogočajo pomnoževanje le določenega genotipa HPV, zaradi česar niso primerni za dokazovanje DNA HPV v kliničnih vzorcih, saj želimo v teh dokazati prisotnost DNA katerega koli genotipa HPV. S splošnimi začetnimi oligonukleotidi lahko pomnožujemo širok spekter genotipov HPV, ker nalegajo na ohranjene regije v genomu HPV, večinoma na regijo, ki kodira zapis za L1 ali zapis za E1 (Molijn in sod., 2005).

Dokazovanje širokega spektra HPV s splošnimi začetnimi oligonukleotidi lahko dosežemo na tri različne načine. Primer za prvi način je GP5+/6+ PCR sistem, ki vključuje dva nasprotno usmerjena začetna oligonukleotida, ki nalegata na ohranjene regije HPV DNA,



vendar sta popolnoma komplementna le enemu ali nekaj genotipom HPV. Da se doseže naleganje na ostale genotipe HPV, je potrebno PCR izvajati pri nižji temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (Jacobs in sod., 1997; Molijn in sod., 2005). Pri drugem načinu se za pomnoževanje uporablja set različnih in nasprotno usmerjenih degeneriranih začetnih oligonukleotidov, kar omogoča prileganje različnim genotipom HPV. Primer za tak sistem je MY09/11 (Qu in sod., 1997). Pri tretjem načinu gre za mešanico različnih in nasprotno usmerjenih začetnih oligonukleotidov (Molijn in sod., 2005). Primera za tretji način pomnoževanja sta PGMY09/11 (Gravitt in sod., 2000) in SPF 1/2 začetni oligonukleotidi (Kleter in sod., 1998).

Josefsson in sod. (1999) in Tucker in sod. (2001) poročajo, da se za dokazovanje DNA HPV lahko uporablja tudi PCR v realnem času, in sicer tako, da se kombinira genotipsko specifične začetne oligonukleotide s fluorescentnimi sondami. Težave pri tem predstavlja pomnoževanje DNA z različnimi genotipsko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v eni reakciji PCR.

S pomočjo PCR reakcije v katero je pred pomnoževanje vključen prepis DNA v RNA z reverzno transkriptazo (RT-PCR, angl. reverse transcriptase PCR), je mogoče dokazovati tudi RNA HPV. Za dokazovanje RNA HPV je na voljo en komercialen test, in sicer PreTect HPV Proofer (Norchip AS Klokkarstza, Norveška) (Molijn in sod., 2005).

Kot diagnostični marker bi se lahko v primeru okužbe s HPV uporabljalo tudi stanje genoma HPV v celici, saj integracija genoma v človeški kromosom nakazuje okužbo z visokorizičnimi genotipi HPV in možnost za razvoj raka (Molijn in sod., 2005).

#### 2.2.2.1 Dokazovanje produktov PCR

Za dokazovanje produktov PCR se uporabljajo različne metode, med katerimi je najenostavnejša metoda agarozne gelske elektroforeze. Ker sekvenčno specifična analiza produktov PCR močno poveča občutljivost in specifičnost testa, so za dokazovanje produktov PCR razvili teste, ki tako analizo omogočajo (Molijn in sod., 2005).

Sekvenčno sestavo produktov PCR lahko določimo s polimorfizmom terminalnih fragmentov po rezanju z restrikcijskimi endonukleazami (RFLP, angl. restriction fragment length polymorphism). Razrezane produkte PCR damo na gelsko elektroforezo. Po končani elektroforezi na gelu dobimo specifičen vzorec, iz katerega razberemo, ali je v vzorcu prisotna DNA HPV (Molijn in sod., 2005).

Pogosta metoda za dokazovanje produktov PCR je hibridizacija z eno ali več oligonukleotidnimi sondami. V diagnostiki hibridizacija pogosto poteka v mikrotitrskih ploščicah, kar omogoča izvedbo testa za več vzorcev hkrati. V postopku hibridizacije se z biotinom označeni produkti PCR ujamejo na s streptavidinom prekrito dno luknjic v mikrotitrski ploščici. Nato pride v alkalnih razmerah do denaturacije dvojno verižne DNA in odstranjevanja nevezane verige DNA s spiranjem. Na ujete verige DNA se vežejo označene oligonukleotidne sonde. Hibride se nato dokaže z vezavo konjugata in dodajanjem substrata, ki v primeru prisotnosti hibridov spremeni barvo (Molijn in sod., 2005).

Zelo uporabna je tudi metoda reverzne hibridizacije, pri kateri pride do hkratne hibridizacije produktov PCR z več oligonukleotidnimi sondami. Prednost te metode je ločevanje med genotipsko specifičnimi okužbami in okužbami z več genotipi hkrati (Molijn in sod., 2005). Primer take metode je HPV LiPA (angl. line probe assay) (Melchers in sod., 1999).

Na podoben način delujejo tudi HPV DNA mikromreže, ki omogočajo ločevanje posameznih genotipov in dokazovanje okužb z več genotipi hkrati (Klaassen in sod., 2004).

Komercialno dostopna sistema za dokazovanje okužb s HPV, ki temeljita na pomnoževanju DNA HPV in dokazovanju produktov PCR, sta Amplicor HPV Test in Linnear array HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) (Stevens in sod., 2006). Amplicor HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) je kvalitativen test, ki vsebuje Amplicor HPV Amplification Kit in Amplicor HPV Detection Kit. Prvi omogoča

pomnoževanje 13 visokorizičnih genotipov HPV, in sicer z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na L1 regijo genoma. V reakciji PCR se pomnožuje približno 165 bp dolg segment L1 HPV. Sočasno s pomnoževanjem HPV se pomnožuje tudi 268 bp dolgo zaporedje za  $\beta$ -globin, ki je prisoten v vseh človeških celicah in deluje kot kontrola izolacije ter pomnoževanja HPV. Dokazovanje produktov PCR poteka s hibridizacijo produktov na oligonukleotidne sonde vezane v luknjicah na mikrotitrski ploščici. Hibride nato dokažemo s pomočjo dodatka konjugata in substrata ter z merjenjem absorbance pri 450 nm (Monsonego in sod., 2005).

Monsonego in sod. (2005) so ugotovili, da ima test za dokazovanje CIN II in CIN III pri ženskah z nenormalnimi rezultati Pap testa 95,2 % občutljivost, 42,2 % specifičnost, 33,7 % pozitivno napovedno vrednost in 96,7 % negativno napovedno vrednost.

Linear array HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) je prav tako kvalitativen test, vendar ta omogoča dokazovanje in genotipiziranje do 37  $\alpha$ -genotipov HPV. Za izvedbo obeh testov je potrebna predhodna izolacija DNA (Stevens in sod., 2006).

### **2.2.3 Izolacija DNA HPV**

Amplacor HPV Test in Linear array HPV Test priporočata ročno izolacijo DNA z AmpliLute Media Extraction Kitom (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija). Slabosti te metode so dolgotrajnost, delovna intenzivnost in nagnjenost h kontaminaciji vzorcev (Stevens in sod., 2006).

Stevens in sod. (2006) so ugotovili, da ročno izolacijo lahko uspešno nadomesti izolacija z avtomatiziranim sistemom MagNA Pure LC extraction system (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija).

## **2.3 NAMEN DELA**

V Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani se za dokazovanje

okužb materničnega vratu s HPV uporablja metoda hc2. Zaradi nezaupanja rezultatom vzorcev, katerih vrednost po analizi s to metodo pade v območje med 0,4 in 4 RLU/CO, se v laboratoriju za razjasnitev nejasnih rezultatov uporablja metoda PCR po predhodni izolaciji DNA HPV (Seme in sod., 2006).

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti ali lahko v postopku dokazovanja okužb S HPV s PCR standardno ročno metodo izolacije zamenjamo z avtomatsko metodo.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili brise materničnega vratu, ki so bili odvzeti ženskam z visokim tveganjem za okužbo s HPV in so bili poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa. Uporabili smo vzorce, ki so v laboratorij prispeli med 15. 4. 2006 in 15. 7. 2006. V laboratorij so bili prinešeni v transportnem gojišču Digene Specimen Transport Medium (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA). Prisotnost visokorizičnih genotipov HPV v vzorcih smo najprej določili z metodo hc2 (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA). Rezultati testa so podani kot razmerje med relativnimi svetlobnimi enotami (RLU, angl. relative light units), ki jih izmerimo s pomočjo luminometra in mejno vrednostjo (CO, angl. cutoff value), ki je enaka srednji vrednosti RLU pozitivnega kalibratorja. RLU/CO vrednosti 1 ali več pomeni prisotnost visokorizičnih genotipov HPV v vzorcu. RLU/CO vrednost manj od 1 pomeni, da taki genotipi v vzorcu niso prisotni. Za izolacijo DNA smo izbrali take vzorce, katerih vrednosti hc2 RLU/CO so bile med 0,4 in 4. Poleg teh smo na nadaljnjo analizo vzorcev z izolacijo dali tudi vzorce, ki so z metodo hc2 dali negativen rezultat, vendar so imeli citološki izvid PAP III ali več oz. histološki izvid CIN II ali več.

Na podlagi testa hc2 smo zbrali 144 vzorcev, ki smo jih vključili v našo raziskavo.

#### 3.2 METODE DELA

Vzorce smo v laboratoriju razdelili na dva dela. Iz njih smo sočasno izolirali DNA z ročno in avtomatsko metodo. Za ročno izolacijo smo uporabili standardno metodo AmpliLute Liquid Media Extraction Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija), za avtomatsko pa BioRobot EZ1 (Qiagen GmgH, Hilden, Nemčija) in diagnostični komplet EZ1 Virus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija).

Po izolaciji smo prisotnost HPV DNA določili z uporabo diagnostičnih kompletov AMPLICOR HPV Amplification Kit in AMPLICOR HPV Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija).

### 3.2.1 Ročna izolacija DNA

Ročno izolacijo smo izvajali za 24 vzorcev hkrati. Pred začetkom izolacije smo si pripravili 2 toplotna bloka za inkubacijo, in sicer enega segretega na 56 °C in drugega na 70 °C. Reagente potrebne za izolacijo smo za 15 minut postavili na sobno temperaturo. Liofiliziran Carrier RNA (CAR) smo raztopili tako, da smo mu dodali 310 µl elucijskega pufra (AVE) in nato 10 sekund vorteksirali. Raztopljen CAR je v hladilniku (2–8 °C) stabilen do 24 ur, če ga v tem času ne porabimo ga alikvotiramo in zamrzujemo pri -20 °C. Pripravili smo si tudi spiralni pufer in delovni pufer AL, ki lizira celice. Spiralni pufer smo naredili tako, da smo koncentriran pufer iz kita zmešali s 30 ml absolutnega etanola. Delovni pufer smo si pripravili z mešanjem primerne količine delovnega pufra in CAR. Količino enega in drugega reagenta, ki smo jo dodali, smo določili glede na to, koliko vzorcev oz. kontrol smo imeli namen izolirati.

Preglednica 1: Priprava delovnega pufra

Reagenti	Število vzorcev/kontrol, ki jih bomo analizirali						
	12	24	36	48	60	72	96
CAR (ml)	0,04	0,07	0,10	0,13	0,16	0,20	0,25
AL (ml)	4,00	7,00	10,00	13,00	16,00	20,00	25,00

Delovni pufer mora biti sveže pripravljen malo pred začetkom izolacije DNA iz vzorcev in kontrol. Neporabljen delovni pufer po končanem testu zavržemo.

Za vsak vzorec smo si označili eno 2 ml epruvetko z navojem. V epruvetke smo dodali 80 µl pufra, ki povzroči lizo tkiva. Vzorce smo 10 sekund vorteksirali. Od vsakega smo vzeli 250 µl in jih prenesli v pripravljene 2 ml epruvetke. V vsako epruvetko smo nato dodali 20 µl proteinaze K. Le-te smo zaprli in jih 10 sekund vorteksirali. Nato smo jih za 30 minut postavili na 56 °C ± 2 °C v toplotni blok. Po inkubaciji smo v vsako epruvetko dodali 250 µl delovnega pufra, jih zaprli in jih za 10 sekund vorteksirali. Epruvetke smo ponovno dali inkubirati v toplotni blok s suho vročino, vendar tokrat pri 70 °C ± 2 °C za 15 minut.

Med inkubacijo smo si po navodilih proizvajalca pripravili vakuumsko črpalko QIAvac24 (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija). Za vsak vzorec smo si označili po eno kolono z membrano silica (v nadaljevanju kolona). Kolekcijske epruvetke kolon smo shranili.

Kolone smo odprli in jih pritrdili na konektorje na vakuumski črpalki. V vsako smo vstavili podaljševalec kolone.

Po končani inkubaciji pri 70 °C smo v vsako epruvetko dodali 300 µl absolutnega etanola. Epruvetke smo zaprli in jih 15 sekund vorteksirali. Nato smo jih inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali za nekaj sekund na najvišjih obratih in s tem omogočili, da se je vsa tekočina zberala na dnu epruvetk.

Lizate iz epruvetk smo prenesli v kolone na vakuumski črpalki in jih tako inkubirali vsaj 1 minuto. Nato smo vključili vakuumsko črpalko in počakali, da se je ves lizat iz vseh epruvetk prečrpal. Črpalko smo pustili vključeno vsaj še 1 minuto. Po tem smo vakuum iz črpalke sprostili po navodilih proizvajalca. Če se lizat iz posameznih vzorcev ni popolnoma prečrpal, smo kolone prestavili v čiste 2 ml kolekcijske epruvetke in centrifugirali na najvišji hitrosti za 1 minuto ali toliko časa, da je šel skozi membrano ves lizat.

V kolone smo dodali 750 µl puфра za spiranje in inkubirali vsaj 1 minuto. Ponovno smo vključili vakuumsko črpalko in jo pustili vključeno še minuto po tem, ko se je iz kolon prečrpala vsa tekočina.

V vsako kolono smo dodali 750 µl absolutnega etanola in inkubirali vsaj 1 minuto. Vključili smo vakuumsko črpalko in ponovili opisani postopek. Iz kolon smo previdno odstranili podaljševalce in jih zavrgli. Kolone smo postavili v kolekcijske epruvetke, ki smo si jih shranili pri pripravi črpalke, in jih zaprli. Nato smo kolone v kolekcijskih epruvetkah dali centrifugirati za 3 minute na najvišjo hitrost.

Za vsak vzorec smo si označili po eno 1,5 ml elucijsko epruvetko. Kolekcijske epruvetke iz prejšnjega koraka smo zavrgli in kolone namestili v označene elucijske epruvetke. Pokrovčke kolon smo odprli in tako pustili inkubirati pri sobni temperaturi za 15 minut. Po inkubaciji smo v vsako kolono dodali 120 µl elucijskega puфра, ki smo ga pred tem segreli na sobno temperaturo, in kolone zaprli. To smo pustili 5 minut inkubirati pri sobni temperaturi, nato smo 1 minuto centrifugirali na najvišji hitrosti.

Iz elucijskih epruvetk smo odstranili in zavrgli kolone, epruvetke smo zaprli. Označene epruvetke smo do pomnoževanja in dokazovanja DNA, ki je potekalo naslednji dan, shranili v hladilniku pri 4 °C.

### 3.2.2 Avtomatska izolacija DNA

Avtomatska izolacija DNA omogoča izolacijo od 1 do 6 vzorcev naenkrat. Protokoli za izolacijo DNA s pomočjo BioRobota EZ1 (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija) (Slika 1) se nahajajo na karticah EZ1. Pred začetkom izolacije smo zato v avtomat vstavili EZ1 Virus Card (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija), na kateri se nahaja protokol za izolacijo virusnih nukleinskih kislin iz seruma in plazme.



Slika 1: BioRobot EZ1

Reagenti za avtomatsko izolacijo DNA za posamezen vzorec se nahajajo v kartušah. Vsaka luknjica na kartuši vsebuje določen reagent, kot so magnetni delci, pufer za lizo celic, spiralni pufer, elucijski pufer ... V luknjicah ne najdemo proteaze in CAR, ki imata drugačne pogoje shranjevanja. Proteazo si pripravimo tako, da liofilizirani proteazi dodamo 4,4 ml proteaznega resuspenzijskega pufra. Pri tem pazimo, da se proteaza popolnoma raztopi. Pripravljeno proteazo alikvotiramo in hranimo v zamrzovalniku pri -20 °C. CAR si pripravimo iz 310 µl liofiliziranega CAR in 1000 µl elucijskega pufra (konc.



CAR je  $0,31 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Ko se CAR popolnoma raztopi, ga alikvotiramo in shranimo pri  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Proteazo in CAR smo pred postopkom izolacije zmešali v  $1,5 \text{ ml}$  epruvetki, in sicer  $75 \mu\text{l}$  proteaze in  $10 \mu\text{l}$  CAR. Pripravili smo si  $2 \text{ ml}$  epruvetke, v katere smo dodali  $200 \mu\text{l}$  predhodno vorteksiranega vzorca in elucijske epruvetke, v katerih nam je avtomat po končanem postopku pustil  $100 \mu\text{l}$  izolirane DNA. Pokrovčke teh smo shranili in jih uporabili po končanem postopku izolacije DNA.

Reagente in vzorce smo naložili v stojalo robota po navodilih proizvajalca, ki so prikazana na Sliki 2.

1. vrsta: Elucijske epruvetke ( $1,5 \text{ ml}$ )
2. vrsta: Držala za tipse in tipsi s filtrom
3. vrsta:  $1,5 \text{ ml}$  epruvetke, ki vsebujejo proteazo in CAR
4. vrsta:  $2 \text{ ml}$  epruvetke, v katerih se nahajajo vzorci
5. vrsta: Reagenti v kartušah
6. vrsta:  $1,5 \text{ ml}$  epruvetke, v kateri poteka toplotna inkubacija



Slika 2: Delovna miza BioRobota EZ1

Na ekranu robota smo nastavili volumen vzorca in elucijski volumen izolirane DNA. Pregledali smo, ali smo vse reagente in epruvetke pravilno namestili v stojalo in na koncu vključili robota.

Po končani izolaciji smo vsak izolat postavili za 1 minuto na magnet in s tem dosegli, da so se magnetni delci, ki bi lahko inhibirali PCR, posedli na dno. Izolate smo dali v hladilnik na 4 °C in delo z njimi nadaljevali naslednji dan.

### 3.2.3 Pomnoževanje izolirane DNA

Pred pomnoževanjem smo izolirane vzorce vzeli iz hladilnika in jih pustili na sobni temperaturi. Medtem smo si pripravili delovno mešanico za PCR (AMPLICOR Working Master Mix) tako, da smo zmešali 150 µl HPV MgCl<sub>2</sub> in 1250 µl HPV MMX, ki smo ju dobili v kompletu AMPLICOR HPV Amplification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija).

V stojalo smo postavili reakcijske epruvetke za PCR, v katere smo s pipeto odmerili 50 µl delovne mešanice. Nato smo v epruvetke dodali 50 µl ročno izolirane DNA ali 10 µl avtomatsko izolirane DNA (v tem primeru smo v epruvetko dodali še 40 µl sterilne vode).

Reakcijske epruvetke smo postavili v GeneAmp PCR System 9700 (Applied BioSystems, Forster City, ZDA). Nastavili smo željeno temperaturo in čas po katerih je potekala reakcija:

- 2 minuti 50 °C
  - 9 minut 95 °C
  - 30 sekund 95 °C
  - 45 sekund 54 °C
  - 30 sekund 72 °C
  - 72 °C nedoločeno, vendar največ 1 uro
- } 40 ciklov

V 1 uri po končanem pomnoževanju smo vzorcem dodali 100 µl denaturacijske raztopine in omogočili popolno denaturacijo tako, da smo vzorce pustili 10 minut inkubirati pri sobni temperaturi. V 2 urah od dodatka denaturacijske raztopine smo začeli z detekcijo. Če detekcije nismo naredili v tem času, smo vzorce shranili v hladilniku (+4 °C).

### 3.2.4 Dokazovanje produktov PCR

Vse reagente potrebne za dokazovanje produktov PCR smo pred postopkom segreti na sobno temperaturo. Iz 10-kratnega pufra za spiranje smo si z dodatkom destilirane vode pripravili raztopino za spiranje. Pripravili smo si tudi mikrotitrsko ploščico z vezanimi specifičnimi sondami za HPV in sondami za  $\beta$ -globin, ki ga uporabimo kot pozitivno kontrolo, saj je prisoten v vseh celicah. Razlogi, da ne pride do pomnožitve kontrole, so lahko slaba izolacija, premajhno število celic ali inhibicija pomnoževanja s PCR.

V vsako luknjico smo dodali 100  $\mu$ l hibridizacijskega pufra, za tem pa še 25  $\mu$ l vzorca. Ob dodajanju vzorca smo vsebino vsake luknjice s pomočjo pipete dobro premešali, tako da se je barva iz modre spremenila v rumeno. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili s folijo in inkubirali 1 uro pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po inkubaciji smo vsebino luknjic sprali s spiralno raztopino. Spiranje je potekalo avtomatizirano, in sicer v treh korakih:

- aspiracija vsebine luknjic,
- polnjenje luknjic s spiralno raztopino, ki se v luknjici zadrži 30 sekund, aspiracija spiralne raztopine (ta korak ponovi še 4-krat),
- po avtomatiziranem spiranju smo z mikrotitrsko ploščico tolkli po ravni, čisti in vpojni površini (papirnata brisača), dokler ni bila popolnoma suha.

Po spiranju smo v vsako luknjico dodali 100  $\mu$ l konjugata Avidin-Horseradish Peroxidase in inkubirali 15 minut pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Med inkubacijo smo si pripravili delovni substrat iz substrata A in substrata B v razmerju 4 : 1. Pripravljen delovni substrat smo do uporabe postavili v temo.

Po inkubaciji smo mikrotitrsko ploščico ponovno sprali po predhodno opisanem postopku. V suho ploščico smo dodali 100  $\mu$ l delovnega substrata in ploščo za 10 minut postavili na sobno temperaturo in v temo. Nato smo dodali še 100  $\mu$ l reagenta STOP. V 10 minutah po dodatku reagenta smo izmerili absorbanco pri 450 nm.

## 4 REZULTATI

Metoda, ki smo jo uporabili za dokazovanje prisotnosti DNA v vzorcih, je kvalitativna, zato smo vzorce po izolaciji in detekciji razdelili le na pozitivne in negativne. Kot pozitivne rezultate smo opredelili tiste, pri katerih je absorbanca pri 450 nm presegala mejo 0,2, kot negativne pa tiste, kjer je bila absorbanca nižja od te meje. Od 144 izoliranih vzorcev jih je bilo z obema metodama izolacije negativnih 92 (64 %). Iz 43 vzorcev (30 %) je bila HPV DNA izolirana z obema metodama. Pri devetih vzorcih (6 %) se rezultati obeh metod niso ujemali. Pri sedmih od teh vzorcev je bil rezultat po ročni izolaciji pozitiven, po avtomatski izolaciji pa negativen. Pri drugih dveh vzorcih je bila situacija obratna (pozitiven rezultat z avtomatsko izolacijo in negativen z ročno izolacijo).

Preglednica 2: Prikaz skladnosti rezultatov po izolaciji DNA z ročno in avtomatsko metodo

		BioRobot EZ1/ Viral Card (QIAGEN)	
		pozitiven	negativen
AmpliLute Media Extraction Kit (ROCHE)	pozitiven	43 (29,9 %)	7 (4,9 %)
	negativen	2 (1,3 %)	92 (63,9 %)

Pri vseh devetih neskladnih vzorcih smo najprej iz istega izolata ponovili pomnoževanje s PCR in dokazovanje produktov. Štirje vzorci, ki so bili z ročno izolacijo pozitivni, z avtomatsko izolacijo pa negativni, so bili po ponovljenem PCR in dokazovanju produktov negativni z obema metodama izolacije. Do enakih rezultatov smo prišli tudi pri dveh vzorcih, ki sta po prvem PCR in detekciji z ročno izolacijo dala negativen rezultat, z avtomatsko pa pozitivnega.

Pri treh vzorcih, ki so bili z ročno izolacijo pozitivni, z avtomatsko izolacijo pa negativni so bili rezultati po ponovnem PCR in detekciji še vedno neskladni, zato smo se odločili ponoviti izolacijo DNA. Enega vzorca je bilo za ponovno izolacijo premalo, pri drugih dveh smo ponovili le ročno izolacijo, ker je bilo za obe premalo vzorca. Za ponovitev

ročne izolacije smo se odločili, ker so bili rezultati testa Amplicor HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) šibko pozitivni in bi njihova pozitivnost lahko bila posledica kontaminacije. Rezultata ročnih izolacij obeh vzorcev sta bila ob ponovljenem postopku ponovno pozitivna.

Vse tri vzorce smo opredelili kot HPV DNA nejasne (rezultati posameznih vzorcev so prikazani v tabeli, ki se nahaja v prilogi. Nejasni rezultati so označeni s sivo barvo).

Preglednica 3: Prikaz skladnosti rezultatov po ponovljenem pomnoževanju DNA in dokazovanju pomnoženih produktov ter po ponovljeni izolaciji

		<b>BioRobot EZ1/ Viral Card (Qiagen)</b>	
		pozitiven	negativen
<b>AmpliLute Media Extraction Kit (ROCHE)</b>	pozitiven	43 (29,9 %)	3 (2,1 %)
	negativen	0	98 (68 %)

Preglednica 4: Prikaz rezultatov treh neskladnih vzorcev po ponovljenem pomnoževanju DNA in dokazovanju pomnoženih produktov ter po ponovljeni izolaciji

Številka vzorca	Laboratorijska številka	Rezultat	
		AmpliLute Liquid Media Extraction Kit	BioRobot EZ1/Viral Card
9	4040	pozitiven (OD <sub>1A</sub> =0,26; OD <sub>1B</sub> =1,03)	negativen
66	5923	pozitiven (OD <sub>1A</sub> =1,339; OD <sub>1B</sub> =1,815; OD <sub>2</sub> = 1,633)	negativen
139	7612	pozitiven (OD <sub>1A</sub> =0,222; OD <sub>2</sub> =0,997)	negativen

OD<sub>1A</sub> - absorbanca po prvi izolaciji in detekciji DNA; OD<sub>1B</sub> - absorbanca prvega izolata po ponovljeni detekciji DNA;  
OD<sub>2</sub> - absorbanca po ponovljeni izolaciji in detekciji DNA

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 UVOD

Dokazovanje okužb materničnega vratu z visokorizičnimi genotipi HPV je izredno pomembno, saj so prav ti genotipi HPV odgovorni za nastanek invazivnega raka materničnega vratu.

Primarno se za molekularno dokazovanje okužb s HPV uporablja test hc2 (Digene corporation, Gaithersburg, ZDA), ki lahko daje tako lažno pozitivne kot tudi lažno negativne rezultate (Poljak in sod., 2002). Zato nejasne oz. mejne rezultate dobljene s to metodo v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa potrdijo s PCR po predhodni izolaciji DNA HPV (Seme in sod., 2006).

Standardna metoda, ki je v uporabi za izolacijo virusne DNA, je ročna metoda izolacije z diagnostičnim kompletom AmpliLute Media Extraction Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija). Poleg te metode imajo v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa na voljo tudi BioRobot EZ1 (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija), s katerim poteka avtomatska izolacija DNA.

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, ali lahko v postopku dokazovanja okužb s HPV s PCR ročno metodo izolacije DNA zamenjamo z avtomatsko metodo.

### 5.2 ANALIZA REZULTATOV

Izolacija DNA je bila uspešna tako z ročno kot tudi z avtomatsko izolacijo. Pri primerjavi rezultatov smo prišli do zaključka, da je učinkovitost obeh metod za izolacijo primerljiva, saj so se rezultati metod skladali kar v 97,9 %.

Pri šestih vzorcih, katerih rezultati po prvem PCR in detekciji niso bili skladni ter so bili skladni po ponovljenem PCR in detekciji, lahko sklepamo, da je bil pozitiven rezultat HPV DNA posledica kontaminacije med pomnoževanjem s PCR ali med dokazovanjem pomnoženih produktov.

Zaradi premajhne količine vzorcev, potrebne za ponovitev izolacije DNA z obema metodama, za tri neskladne vzorce ne moremo ugotoviti vzroka neskladnosti. Ta je lahko posledica kontaminacije vzorcev med izvedbo ročne oz. avtomatske izolacije DNA, ali je negativen rezultat po avtomatski izolaciji posledica manjše občutljivosti te metode.

### 5.3 SKLEPI

- V raziskavi smo ugotovili, da je tako z ročno kot z avtomatsko metodo mogoče uspešno izolirati DNA HPV iz vzorcev materničnega vratu in tako dokazati okužbo s tem virusom z metodo PCR. Rezultati obeh metod so bili primerljivi, saj so se ujemali v 97,9 %.
- Avtomatska izolacija DNA je hitrejša od ročne izolacije, poleg tega poteka v aparatu zaradi česar se zmanjša možnost kontaminacije vzorca zaradi človeškega faktorja.
- Rezultati naše raziskave so pokazali, da je v postopku dokazovanja okužb s HPV s PCR standardno ročno metodo izolacije z AmpliLute Media Extraction Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) le-to mogoče zamenjati z avtomatsko metodo z BioRobotom EZ1 s pomočjo diagnostičnega kompleta EZ1 Viral Mini Kit (QiagenGmbH, Hilden, Nemčija).

## 6 POVZETEK

Humani papiloma virusi (HPV) okužijo ploščate epitelijske celice in tako povzročijo različne oblike okužb. Najpomembnejša je dolgotrajna okužba ploščatih celic materničnega vratu z visoko rizičnimi genotipi HPV, saj lahko vodi v nastanek raka materničnega vratu.

Dokazovanje okužb s HPV v prvi stopnji poteka z metodo hc2 (Digene Corporation, Gaithersburg, ZDA), ki lahko daje lažno pozitivne oz. lažno negativne rezultate. Zato se v Laboratoriju za molekularno diagnostiko in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani poleg te metode za potrditev mejnih oz. nejasnih rezultatov dobljenih s hc2 uporablja tudi dokazovanje okužb s PCR s predhodno izolacijo DNA HPV.

Namen primerjave dveh metod je bil ugotoviti, ali je v postopku dokazovanja okužb s HPV s PCR mogoče standardno ročno metodo izolacije DNA zamenjati z avtomatsko metodo. V raziskavo smo vključili 144 vzorcev materničnega vratu, iz katerih smo z obema metodama sočasno izolirali DNA.

Ugotovili smo, da sta obe metodi za izolacijo DNA primerljivi. Zaradi večje hitrosti izolacije in manjše možnosti kontaminacije vzorca s strani laboratorijskega osebja bo avtomatska metoda izolacije uspešno nadomestila standardno ročno metodo.



## 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
- Barnard P., McMillan N.A.J. 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- $\alpha$ . *Virology*, 259: 305-313
- Baseman J.G., Koutsky L.A. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32: 16-24
- Bernard H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32, 1: 1-6
- Blachon S., Demeret C. 2003. The regulatory E2 proteins of human papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*, 85: 813-819
- Brehm A., Miska E.A., McCance D.J., Reid J.L., Bannister A.J., Kouzarides T. 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391: 597-601
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2004. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 23<sup>rd</sup> ed. New York, McGraw-Hill Companies: 818 str.
- Brown D.R., Schroeder J.M., Bryan J.T., Stoler M.H., Fife K.H. 1999. Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 10: 3316-3322
- Burchell A.N., Winer R.L., de Sanjose S., Franco E.L. 2006. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24, Suppl. 3: 52-61

- Chang Y.E., Laimins L.A. 2000. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *Journal of Virology*, 74, 9: 4174-4182
- Clower R.V., Hu Y., Melendy T. 2006. Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology*, 348: 13-18
- Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S.F. 1999. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase  $\alpha$ /primase. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 5: 2696-2705
- Cripe T.P., Haugen T.H., Turk J.P., Tabatabai F., Schmid P.G., III, Dürst M., Gissman L., Roman A., Turek L.P. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 *trans*-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO Journal*, 6, 12: 3745-3753
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27
- Dillner J. 1999. The serological response to papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology*, 9, 6: 423-430
- Edmonds C., Vousden K.H. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *Journal of Virology*, 63, 6: 2650-2656
- Ferenczy A., Coutlee F., Franco E., Hankins C. 2003. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *Canadian Medical Association Journal*, 169: 431-434
- Foster S.A., Demers G.W., Etscheid B.G., Galloway D.A. 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their

ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *Journal of Virology*, 68, 9: 5698-5705

Franco E.L., Villa L.L., Sobrinho J.P., Prado J.M., Rousseau M.C., Desy M., Rohan T.E. 1999. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *Journal of Infectious Diseases*, 180, 5: 1415-1423

Frattini M., Laimins L.A. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 12398-12402

Frazer I.H. 1996. Immunology of papillomavirus infection. *Current Opinion in Immunology*, 8: 484-491

Funk J.O., Waga S., Harry J.B., Espling E., Stillman B., Galloway D.A. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & Development*, 11: 2090-2100

Grassmann K., Rapp B., Maschek H., Petry K.U., Iftner T. 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *Journal of Virology*, 70, 4: 2339-2349

Gravitt P.E., Peyton C.L., Wheeler C.M., Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman M.H., Scott D.R., Apple R.J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 38, 1: 357-361

Guimarães Gonçalves M.A., Donadi E.A. 2004. Immune cellular response to HPV: Current concepts. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, 8, 1: 1-9

- 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
- Hubbert N.L., Sedman S.A., Schiller J.T. 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *Journal of Virology*, 66, 10: 6237-6241
- Hughes F.J., Romanos M.A. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acid Research*, 25: 5817-5823
- Jacobs M.V., Snijders P.J.F., van den Brule A.J.C., Helmerhorst T.J.M., Meijer C.J.L.M., Walboomers J.M.M. 1997. A general primer GP5+/GP6+-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3: 791-795
- 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
- Jewers R.J., Hildebrandt P., Ludlow J.W., Kell B., McCance D.J. 1992. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *Journal of Virology*, 66, 3: 1329-1335
- Jones D.L., Alani R.M., Mūnger K. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Development*, 11: 2101-2111
- Jones S.B. 1999. Cancer in the developing world: a call to action. *British Medical Journal*, 319: 505-508

- Josefsson A., Livak K., Gyllensten U. 1999. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3: 490-496
- Kessis T.D., Slebos R.J., Nelson W.G., Kastan M.B., Plunkett B.S., Han S.M., Lorincz A.T., Hedrick L., Cho K.R. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3988-3992
- Kirnbauer R., Hubbert N.L., Wheeler C.M., Becker T.M., Lowy D.R., Schiller J.T. 1994. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in the majority of women infected with human papillomavirus type 16. *Journal of the National Cancer Institute*, 86, 7: 494-499
- Klaassen C.H.W., Prinsen C.F.M., de Valk H.A., Horrevorts A.M., Jeunink M.A.F., Thunnissen F.B.J.M. 2004. DNA microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5: 2152-2160
- Kleiter B., van Doorn L.J., ter Schegget J., Schrauwen L., van Krimpen K., Burger M., ter Harmsel B., Quint W. 1998. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomavirus. *American Journal of Pathology*, 153, 6: 1731-1739
- Klingelhutz A.J., Foster S.A., McDougal J.K. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380, 6569: 79-82
- Koutsky L.A., Harper D.M. 2006. Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine*, 24, Suppl. 3: 114-121
- Kumar V., Schneider N.R., Hagler H.K. (eds.). 2005. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 1525 str.

- Kuypers J.M., Critchlow C.W., Gravitt P.E., Vernon D.A., Sayer J.B., Manos M.M., Kiviat N.B. 1993. Comparison of dot filter hybridization, southern transfer hybridization, and polymerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 4: 1003-1006
- Lee S.S., Glaunsinger B., Mantovani F., Banks L., Javier T. 2000. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *Journal of Virology*, 74, 20: 9680-9693
- Levi J.E., Fernanded S., Tateno A.F., Motta E., Lima L.P., Eluf-Neto J., Pannuti C.S. 2004. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecologic Oncology*, 92: 225-231
- Liu Y., Chen J.J., Gao Q., Dalal S., Hong Y., Mansur C.P., Band V., Androphy E.J. 1999. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, 73, 9: 7297-7307
- Longworth M.S., Laimins L.A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 2: 367-372
- Lörincz A.T. 1996. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 22: 629-636
- McIntyre M.C., Ruesch M.N., Laimins L.A. 1996. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*, 215: 73-82
- Melchers W.J.G., Bakkens J.M.J.E., Wang J., de Wilde P.C.M., Boonstra H., Quint W.G.V., Hanselaar A.G.J.M. 1999. Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types. *American Journal of Pathology*, 155, 5: 1473-1478

- Mohr I.J., Clark R., Androphy E.J., MacPherson P., Botchan M.R. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250: 1694-1699
- Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L.J. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 32, 1: 43-51
- Monsonogo J., Bohbot J.M., Pollini G., Krawec C., Vincent C., Merignargues I., Haroun F., Sednaoui P., Monfort L., Dachez R., Syrjänen K. 2005. Performance of the Roche AMPLICOR Human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecologic Oncology*, 99: 160-168
- Monsonogo J. 2005. HPV infections and cervical cancer prevention. Priorities and new directions. *Gynecologic Oncology*, 96: 830-839
- Moscicki A.B. 2005. Impact of HPV infection in adolescent populations. *Journal of Adolescent Health*, 37: S3-S9
- Münger K., Werness B.A., Dyson N., Phelps W.C., Harlow E., Howley P.M. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO Journal*, 8, 13: 4099-4105
- Muñoz 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, 6: 518-527
- Muñoz N., Castellsagué X., Berrington de González A., Gissmann L. 2006. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, 3: 1-10
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002. *Medical microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. Missouri, Mosby, Inc: 458-463

- Nanda K., McCrory D.C., Myers E.R., Bastian L.A., Hasselblad V., Hickey J.D., Matchar D.B. 2000. Accuracy of the Papanicolaou test in the screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 132: 810-819
- Nguyen H.H., Broker T.R., Chow L.T., Alvarez R.D., Vu H.L., Andrasi J., Brewer L.R., Jin G., Mestecky J. 2005. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 96, 2: 452-461
- Pecorelli S., Favalli G., Zigliani L., Odicino F. 2003. Cancer in women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 82: 369-379
- Poljak M. 2007. Štirivalentno cepivo proti okužbi s HPV končno v EU. *ISIS: glasilo Zdravniške zbornice Slovenije*, 16, 1: 44-45
- Poljak M., Marin I.J., Seme K., Vince A. 2002. Hybrid Capture II HPV Test detect at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *Journal of Clinical Virology*, 25: S89-S97
- Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C.J., Ho G.Y.F., Klein R.S., Burk R.D. 1997. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 6: 1304-1310
- Richardson H., Kelsall G., Tellier P., Voyer H., Abrahamowicz M., Ferenczy A., Coutlée F., Franco E.L. 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in the female university students. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12: 485-490
- Ronco L.V., Karpova A.Y., Vidal M., Howley P.M. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & Development*, 12: 2061-2072



- Rosenstierne M.W., Vinther J., Hansen C.N., Prydsøe M., Norrild B. 2003. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology*, 84: 2909-2920
- 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
- Silins I., Avall-Lundqvist E., Tadesse A., Jansen K.U., Stendhal U., Lenner P., Zumbach K., Pawlita M., Dillner J., Frankendal B. 2002. Evaluation of Ab response to HPV as prognostic markers in cervical cancer patients. *Gynecologic Oncology*, 85: 333-338
- Sillman F.H., Sentovich S., Shaffer D. 1997. Ano-geital neoplasia in renal transplant patients. *Annals of Transplantation*, 2: 59-66
- Smith E.M., Johnson S.R., Ritchie J.M., Feddersen D., Wang D., Turek L.P., Haugen T.H. 2004. Persistent HPV infection in postmenopausal age women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 87: 131-137
- Smotkin D., Wettstein F.O. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 13: 4680-4684
- Stanley M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24, 1: 16-22
- Stanley M.A. 2001. Immunobiology of papillomavirus infections. *Journal of Reproductive Immunology*, 52: 45-59
- Steger G., Corbach S. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of Virology*, 71, 1: 50-58

- Stern P.L. 2005. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *Journal of Clinical Virology*, 32: 72-81
- Stevens M.P., Rudland E., Garland S.M., Tabrizi S.N. 2006. Assessment of MagNA Pure LC Extraction System for Detection of Human Papillomavirus (HPV) DNA in PreservCyt Samples by Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY HPV Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 7: 2428-2433
- Thain A., Jenkins O., Clarke A.R., Gaston K. 1996. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *Journal of Virology*, 70, 10: 7233-7235
- Tommasino M., Adamczewski J.P., Carlotti F., Barth C.F., Manetti R., Cantorni M., Cavalieri F., Hunt T., Crawford L. 1993. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*, 8, 1: 195-202
- Trottier H., Franco E.L. 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24, 1: 4-15
- Tucker R.A., Unger E.R., Holloway B.P., Swan D.C. 2001. Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Molecular Diagnosis*, 6, 1: 39-47
- Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kumer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189: 12-19
- Wang J., Sampath A., Raychandhuri P., Bagchi S. 2001. Both R band E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*, 20: 4740-4749

Zerfass-Thome K., Zwerschke W., Mannhardt B., Tindle R., Botz J.W., Jansen-Durr P. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13, 11: 2323-2330

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

Zimmermann H., Degenkolbe R., Bernard H.U., O'Connor M.J. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *Journal of Virology*, 73, 8: 6209-6219

## ZAHVALA

Zahvalo za pomoč pri izdelavi diplomske naloge dolgujem mnogim.

Najprej bi se rada zahvalila svojemu mentorju prof. dr. Mariu Poljaku, ker mi je omogočil delo v svojem laboratoriju in mi s predlogi pomagal pri izdelavi pisnega izdelka. Zahvalila bi se tudi prof. dr. Katji Seme za temeljito opravljeno recenzijo diplomske naloge.

K nastajanju diplomske naloge so veliko pripomogli tudi zaposleni v Laboratoriju za molekularno biologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa, ki so me v laboratorij lepo sprejeli in mi z nasveti pomagali pri izvedbi raziskovalnega dela. Posebej bi se zahvalila Kristini Fujs Komloš, ki me je uvedla v raziskovalno delo in mi pomagala pri analizi dobljenih rezultatov.

Zahvalila bi se Barbari Škrbina, ki je z lektoriranjem pripomogla k slovnični ustreznosti diplomske naloge.

Nazadnje bi se rada zahvalila svoji družini, ki mi že celo življenje stoji ob strani, me podpira in verjame vame.

Najlepša hvala vsem!

## PRILOGE

### Priloga A: Pregled rezultatov po izolaciji z ročno in avtomatsko metodo

Številka vzorca	Laboratorijska številka	Rezultat	
		AmpliLute Liquid Media Extraction Kit	BioRobot EZ1/Viral Card
1	3999	negativen	negativen
2	4019	negativen	negativen
3	4020	pozitiven	pozitiven
4	4022	pozitiven	pozitiven
5	4026	negativen	negativen
6	4031	negativen	negativen
7	4035	negativen	negativen
8	4039	pozitiven	pozitiven
9	4040	pozitiven	negativen
10	4047	negativen	negativen
11	4048	negativen	negativen
12	4049	negativen	negativen
13	4059	pozitiven	pozitiven
14	4071	negativen	negativen
15	4117	negativen	negativen
16	4138	pozitiven	pozitiven
17	4172	negativen	negativen
18	4218	negativen	negativen
19	4251	pozitiven	pozitiven
20	4292	pozitiven	pozitiven
21	4293	negativen	negativen
22	4302	negativen	negativen
23	4319	negativen	negativen
24	4382	negativen	negativen
25	4399	negativen	negativen
26	4401	pozitiven	pozitiven
27	4409	negativen	negativen
28	4436	negativen	negativen
29	4437	pozitiven	pozitiven
30	4462	pozitiven	pozitiven
31	4472	pozitiven	pozitiven
32	4565	pozitiven	pozitiven
33	4674	negativen	negativen
34	4676	negativen	negativen
35	4680	negativen	negativen

se nadaljuje

nadaljevanje Priloga A: Pregled rezultatov po izolaciji z ročno in avtomatsko metodo

Številka vzorca	Laboratorijska številka	Rezultat	
		AmpliLute Liquid Media Extraction Kit	BioRobot EZ1/Viral Card
36	4684	negativen	negativen
37	4685	negativen	negativen
38	4694	negativen	negativen
39	4711	negativen	negativen
40	4712	pozitiven	pozitiven
41	4713	pozitiven	pozitiven
42	4714	pozitiven	pozitiven
43	4771	negativen	negativen
44	4880	negativen	negativen
45	4978	negativen	negativen
46	4985	pozitiven	pozitiven
47	5019	negativen	negativen
48	5081	negativen	negativen
49	5104	negativen	negativen
50	5108	negativen	negativen
51	5190	negativen	negativen
52	5214	negativen	negativen
53	5215	negativen	negativen
54	5242	negativen	negativen
55	5314	negativen	negativen
56	5330	negativen	negativen
57	5491	negativen	negativen
58	5526	negativen	negativen
59	5745	pozitiven	pozitiven
60	5747	pozitiven	pozitiven
61	5750	negativen	negativen
62	5754	pozitiven	pozitiven
63	5772	negativen	negativen
64	5787	negativen	negativen
65	5921	negativen	negativen
66	5923	pozitiven	negativen
67	5968	negativen	negativen
68	5992	negativen	negativen
69	5994	negativen	negativen
70	6017	negativen	negativen
71	6030	pozitiven	pozitiven

se nadaljuje

nadaljevanje Priloga A: Pregled rezultatov po izolaciji z ročno in avtomatsko metodo

Številka vzorca	Laboratorijska številka	Rezultat	
		AmpliLute Liquid Media Extraction Kit	BioRobot EZ1/Viral Card
72	6031	pozitiven	pozitiven
73	6032	pozitiven	pozitiven
74	6034	pozitiven	pozitiven
75	6036	negativen	negativen
76	6057	negativen	negativen
77	6090	pozitiven	pozitiven
78	6103	negativen	negativen
79	6118	negativen	negativen
80	6119	negativen	negativen
81	6123	pozitiven	pozitiven
82	6247	negativen	negativen
83	6266	negativen	negativen
84	6293	negativen	negativen
85	6323	negativen	negativen
86	6325	negativen	negativen
87	6327	negativen	negativen
88	6328	pozitiven	pozitiven
89	6338	negativen	negativen
90	6354	pozitiven	pozitiven
91	6355	negativen	negativen
92	6360	negativen	negativen
93	6361	pozitiven	pozitiven
94	6362	negativen	negativen
95	6363	pozitiven	pozitiven
96	6369	pozitiven	pozitiven
97	6372	pozitiven	pozitiven
98	6376	negativen	negativen
99	6409	negativen	negativen
100	6414	pozitiven	pozitiven
101	6556	negativen	negativen
102	6580	negativen	negativen
103	6628	negativen	negativen
104	6640	negativen	negativen
105	6674	pozitiven	pozitiven
106	6680	negativen	negativen
107	6697	negativen	negativen

se nadaljuje

nadaljevanje Priloga A: Pregled rezultatov po izolaciji z ročno in avtomatsko metodo

Številka vzorca	Laboratorijska številka	Rezultat	
		AmpliLute Liquid Media Extraction Kit	BioRobot EZ1/Viral Card
108	6733	negativen	negativen
109	6848	negativen	negativen
110	6852	negativen	negativen
111	6853	pozitiven	pozitiven
112	6863	negativen	negativen
113	6867	negativen	negativen
114	6868	negativen	negativen
115	6923	negativen	negativen
116	6925	negativen	negativen
117	6956	negativen	negativen
118	7005	negativen	negativen
119	7006	pozitiven	pozitiven
120	7010	pozitiven	pozitiven
121	7011	negativen	negativen
122	7048	negativen	negativen
123	7064	negativen	negativen
124	7068	negativen	negativen
125	7071	pozitiven	pozitiven
126	7160	pozitiven	pozitiven
127	7189	negativen	negativen
128	7192	negativen	negativen
129	7220	pozitiven	pozitiven
130	7271	negativen	negativen
131	7273	negativen	negativen
132	7277	pozitiven	pozitiven
133	7280	pozitiven	pozitiven
134	7302	negativen	negativen
135	7346	pozitiven	pozitiven
136	7370	negativen	negativen
137	7581	negativen	negativen
138	7589	negativen	negativen
139	7612	pozitiven	negativen
140	7640	negativen	negativen
141	7686	negativen	negativen
142	7758	negativen	negativen
143	8212	negativen	negativen
144	8236	negativen	negativen