

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sara LISJAK

**DINAMIKA OKUŽB Z NE-VISOKORIZIČNIMI  
GENOTIPI ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV V  
SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sara LISJAK

**DINAMIKA OKUŽB Z NE-VISOKORIZIČNIMI GENOTIPI  
ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**DYNAMICS OF INFECTIONS WITH NON-HIGH-RISK  
GENOTYPES OF HUMAN PAPILOMAVIRUS IN SLOVENIA**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje, z dne 12. 5. 2015 je bil za mentorja magistrskega dela imenovan prof. dr. Mario Poljak, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Mentor: prof. dr. Mario Poljak dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Srečko KOREN, dr. med.

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

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:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Sara Lisjak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 578.7:616-006.5:577.2.083(043)=163.6
KG	virusi/človeški papilomavirusi/incidenca/prevalenca/ne-visokorizični genotipi HPV/diagnostične metode/molekularne tehnike/PCR
AV	LISJAK, Sara, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	POLJAK, Mario (mentor)/SEME, Katja (recenzentka)
KZ	SI-1000, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	DINAMIKA OKUŽB Z NE-VISOKORIZIČNIMI GENOTIPI ČLOVEŠKIH PAPILOMAVIRUSOV V SLOVENIJI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	X, 58 str., 13 pregl., 13 sl., 29 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	<p>Virusi iz družine <i>Papillomaviridae</i> ali papilomavirusi (PV) so zelo heterogena in široko razprostranjena skupina virusov DNA, ki povzročata različne benigne in maligne novotvorbe pri ljudeh in živalih. V humani medicini je najpomembnejša skupina PV, ki jo imenujemo človeški papilomavirusi (HPV; angl. human papillomaviruses). V naši raziskavi smo želeli določiti incidenco in prevalenco okužb z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV ter delež dolgotrajnih okužb z izbranimi genotipi, na reprezentativnem vzorcu slovenskih žensk. Z različnimi metodami za dokazovanje in genotipizacijo HPV DNA smo v 636 brisih materničnega vratu enakega števila žensk, pridobljenih v dveh krogih nacionalne raziskave, ki sta potekala v letih 2009/2010 in 2012/2014, določili izbrane genotipe HPV: HPV26, 40, 55, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 in IS39. Z uporabo testov Linear Array, INNO LiPA in GP5+/6+/68 PCR v kombinaciji s sekveniranjem smo 16 izbranih genotipov HPV v prvem krogu raziskave dokazali v 17/636 (2,7 %) in v drugem krogu v 14/636 (2,2 %) vzorcev. Od 14 vzorcev, v katerih smo dokazali HPV DNA 16-ih izbranih genotipov, je bila le ena okužba dolgotrajna in sicer okužba s HPV70. Incidenca okužb je variirala med 0,0-0,5 %, prevalenca okužb s posameznimi genotipi pa je tako v prvem, kot v drugem krogu variirala med 0,0-0,6 %. Največkrat smo dokazali okužbo z genotipom HPV70. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da sta incidenca in prevalenca okužb z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV v Sloveniji nizki in primerljivi v obeh krogih raziskave in s podobnimi raziskavami, ki so bile izvedene v tujini.</p>

### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Du2
- DC UDC 578.7:616-006.5:577.2.083(043)=163.6
- DX viruses/human papillomaviruses/incidence/prevalence/non-high-risk HPV genotypes/diagnostics/molecular techniques/PCR
- AU LISJAK, Sara
- AA POLJAK, Mario (supervisor)/SEME, Katja (reviewer)
- PP SI-1000, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
- PY 2016
- TI DYNAMICS OF INFECTIONS WITH NON-HIGH-RISK GENOTYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN SLOVENIA
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
- NO X, 58 p., 13 tab., 13 fig., 29 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Viruses from the *Papillomaviridae* family, also called papillomaviruses (PVs), are a very heterogeneous group of DNA viruses that cause different benign and malign tumours in humans and animals. However, the most important group of PVs in medicine are human papillomaviruses (HPVs). In our study, we estimated the incidence and prevalence of infection of selected 16 low-risk HPV genotypes as well as the percent of long-term infections on a representative sample of Slovenian women. We tested 636 samples of cervical swabs specimens that have been collected during two rounds of national screening for cervical cancer between the period 2009/2010 and 2012/2014 for the presence of the following genotypes: HPV26, 40, 55, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 and IS39. The specimens were tested with Linear Array Genotyping Test, INNO LiPA and GP5+/6+/68 PCR tests in combination with sequencing. Prevalence of 16 selected HPVs in the first screening round was 2,7 % (17/636) and in the second screening round 2,2 % (14/636), and only single infection was persistent, namely infection with HPV70. The incidence of infection varied from 0,0-0,5 %. The prevalence of infection in the first and second round varied from 0,0-0,6 %, The most prevalent genotype was HPV70. Our results indicate that the incidence and prevalence of infection with selected 16 low-risk HPV genotypes in Slovenia are low and comparable to the previously published data from similar studies.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b> .....	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>X</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1 ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI .....	3
2.1.1 Zgradba virusa .....	3
2.1.2 Struktura in organizacija genoma .....	4
2.1.3 Razmnoževanje in patogeneza .....	5
2.1.4 Taksonomija .....	7
2.1.5 Klinična slika .....	8
2.2 OPIS IZBRANIH 16 NE-VISOKORIZIČNIH GENOTIPOV HPV .....	10
2.2.1 Genotipi iz vrste <i>alfa 3</i> .....	10
2.2.2 Genotipi iz vrste <i>alfa 5</i> .....	10
2.2.3 Genotipi iz vrste <i>alfa 6</i> .....	11
2.2.4 Genotipi iz vrste <i>alfa 7</i> .....	11
2.2.5 Genotipi iz vrste <i>alfa 8</i> .....	11
2.2.6 Genotipi iz vrste <i>alfa 9</i> .....	12
2.2.7 Genotipi iz vrste <i>alfa 10</i> .....	12
2.2.8 Genotipi iz vrste <i>alfa 11</i> .....	12
2.2.9 Genotipi iz vrste <i>alfa 14</i> .....	12
2.3 DIAGNOSTIKA HPV .....	13
2.3.1 Tradicionalne metode dokazovanja okužb s HPV .....	13

<b>2.3.2 Molekularne metode dokazovanja okužb s HPV .....</b>	<b>13</b>
2.3.2.1 Testi za dokazovanje genotipov HPV brez opredelitve posameznih genotipov .....	14
2.3.2.2 Genotipizacijski testi .....	15
2.4 EPIDEMIOLOGIJA .....	19
<b>2.4.1 Okužbe s HPV v Sloveniji.....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>21</b>
3.1 MATERIAL.....	21
3.2 METODE.....	21
<b>3.2.1 Postopek osamitve virusne DNA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2 Določitev genotipov HPV z Linear Array .....</b>	<b>23</b>
3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo .....	23
3.2.2.2 Agarozna gelska elektroforeza .....	25
3.2.2.3 Detekcija genotipov HPV z Linear Array .....	26
<b>3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času za beta globin .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.4 Dokazovanje HPV DNA z začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68 .....</b>	<b>28</b>
3.2.4.1 Izvedba PCR.....	28
3.2.4.2 Čiščenje produkta PCR.....	30
3.2.4.3 Izvedba sekvenčne reakcije .....	31
3.2.4.4 Čiščenje produktov sekvenčne reakcije.....	32
3.2.4.5 Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja .....	33
<b>3.2.5 Določitev genotipov HPV z INNO LiPA .....</b>	<b>33</b>
3.2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo .....	33
3.2.5.2 Detekcija genotipov HPV z INNO LiPA .....	34
<b>3.2.6 Statistične metode.....</b>	<b>35</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
4.1 HPV DNA V BRISIH MATERNIČNEGA VRATU .....	36
4.2 DOKAZANI GENOTIPI HPV .....	38
<b>4.2.1 Genotipi iz vrste <i>alfa 3</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.2 Genotipi iz vrste <i>alfa 5</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.3 Genotipi iz vrste <i>alfa 6</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.4 Genotipi iz vrste <i>alfa 7</i> .....</b>	<b>40</b>

4.2.5 Genotipi iz vrste <i>alfa 8</i> .....	40
4.2.6 Genotipi iz vrste <i>alfa 9</i> .....	40
4.2.7 Genotipi iz vrste <i>alfa 10</i> .....	41
4.2.8 Genotipi iz vrste <i>alfa 11</i> .....	41
4.2.9 Genotipi iz vrste <i>alfa 14</i> .....	42
4.3 MEŠANE OKUŽBE IN DOLGOTRAJNOST OKUŽB.....	44
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>46</b>
5.1 PRIMERJAVA PREVALENC IZBRANIH 16 NE-VISOKORIZIČNIH GENOTIPOV HPV .....	46
5.1.1 Genotipi iz vrste <i>alfa 3</i> .....	47
5.1.2 Genotipi iz vrste <i>alfa 5</i> .....	48
5.1.3 Genotipi iz vrste <i>alfa 6</i> .....	49
5.1.4 Genotipi iz vrste <i>alfa 7</i> .....	49
5.1.5 Genotipi iz vrste <i>alfa 8</i> .....	50
5.1.6 Genotipi iz vrste <i>alfa 9</i> .....	50
5.1.7 Genotipi iz vrste <i>alfa 10</i> .....	50
5.1.8 Genotipi iz vrste <i>alfa 11</i> .....	51
5.1.9 Genotipi iz vrste <i>alfa 14</i> .....	51
5.2 MEŠANE OKUŽBE IN DOLGOTRAJNOST OKUŽB.....	52
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>53</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>54</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>55</b>
<b>ZAHVALA</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rodovi HPV, tkivni tropizem in najpogostejše bolezni, ki jih povzročajo (Kocjan in Poljak, 2011).....	9
Preglednica 2: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 450 bp velikega dela gena L1 HPV za reakcijo PCR.....	24
Preglednica 3: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo PCR pomnoževanja 450 bp velikega dela gena L1 HPV .....	24
Preglednica 4: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 268 bp velikega dela gena beta globin za reakcijo RT-PCR.....	27
Preglednica 5: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo pomnoževanja RT-PCR 268 bp velikega dela gena beta globin .....	28
Preglednica 6: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 150 bp velikega dela gena L1 HPV za reakcijo PCR.....	29
Preglednica 7: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo pomnoževanja PCR 150 bp velikega dela gena L1 HPV .....	30
Preglednica 8: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za izvedbo sekvenčne reakcije... 31	
Preglednica 9: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za sekvenčno reakcijo.....	32
Preglednica 10: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 65 bp velikega dela gena L1 HPV za reakcijo PCR.....	34
Preglednica 11: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo PCR pomnoževanja 65 bp velikega dela gena L1 HPV .....	34
Preglednica 12: Pregled števila dokazanih okužb s posameznimi genotipi HPV v prvem in drugem krogu raziskave, ter prevalence in incidence okužb s posameznimi genotipi v prvem in drugem krogu raziskave .....	37
Preglednica 13: Pregled žensk pri katerih smo dokazali okužbo z iskanimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV .....	44

## KAZALO SLIK

Slika 1: Posnetek virusa HPV z elektronskim mikroskopom (Abby in Vogel, 2006) .....	3
Slika 2: Shematski prikaz genoma HPV (Zekan in sod., 2011) .....	5
Slika 3: Filogenetsko drevo genotipov HPV z označenimi izbranimi genotipi (Ma in sod., 2014).....	8
Slika 4: Shema poteka dela.....	22
Slika 5: Fotografija elektroforeznega gela s produkti PCR za HPV in beta globin (kolona 15: HPV in beta globin pozitiven vzorec; koloni 2 in 10: HPV in beta globin negativna vzorca; ostale kolone: HPV negativni in beta globin pozitivni vzorci; kolona ML: molekularna lestvica).....	25
Slika 6: Fotografija pozitivnega rezultata pri detekciji genotipov HPV z detekcijskim kompletom Linear Array .....	26
Slika 7: Fotografija pozitivnega rezultata pri detekciji genotipov HPV z detekcijskim kompletom INNO LiPA .....	35
Slika 8: Grafični prikaz števila dokazanih okužb s posameznimi genotipi HPV v prvem in drugem krogu raziskave.....	36
Slika 9: Grafični prikaz prevalece okužb z izbranimi genotipi HPV iz vrste <i>alfa 3</i> .....	42
Slika 10: Grafični prikaz prevalece okužb z izbranimi genotipi HPV iz vrste <i>alfa 5</i> .....	42
Slika 11: Grafični prikaz prevalece okužb z izbranimi genotipi HPV iz vrste <i>alfa 6, 7, 8</i> in <i>9</i> .....	43
Slika 12: Grafični prikaz prevalece okužb z izbranimi genotipi HPV iz vrste <i>alfa 10, 11</i> in <i>14</i> .....	43
Slika 13: Grafični prikaz odstotka okužb z enim od iskanih 16 genotipov HPV in odstotka mešanih okužb .....	45

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat (angl. <i>adenosine triphosphate</i> )
bp	bazni par
Da	Dalton-enota za merjenje atomske oz. molekulske mase
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DP ZORA	državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb
EGF	epidermalni rastni faktor (angl. <i>epidermal growth factor</i> )
HPV	človeški papilomavirus (angl. <i>human papillomavirus</i> )
HSPG	heparan sulfatni proteoglikani
ISH	hibridizacija <i>in situ</i> (angl. <i>in situ hybridization</i> )
IZ	interval zaupanja
LCR	nekodirajoča regija (angl. <i>long control region</i> )
ori	mesto podvojevanja (angl. <i>origin of replication</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	trombocitni rastni faktor (angl. <i>platelet derived growth factor</i> )
PIL-NS	ploščatocelična intraepitelijska lezija nizke stopnje
PV	Papilomavirus
RFLP	metoda določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	obrati na minuto (angl. <i>rotations per minute</i> )
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time PCR</i> )

## 1 UVOD

Virusi iz družine *Papillomaviridae* ali papilomavirusi (PV) so zelo heterogena in široko razprostranjena skupina DNA (angl. *deoxyribonucleic acid*) virusov, ki povzročajo različne novotvorbe pri ljudeh in živalih. V humani medicini je najpomembnejša skupina PV, ki jo imenujemo človeški papilomavirusi (HPV, angl. human papillomavirus). Do sedaj je poznanih več kot 200 genotipov HPV, ki jih skupaj še z nekaterimi opičjimi virusi uvrščamo v 5 rodov (*alfa*, *beta*, *gama*, *mu* in *nu*). Posamezni rodovi HPV izkazujejo tropizem za določeno vrsto epitela. Za človeka je najpomembnejši rod *alfa*, kamor uvrščamo genotipe HPV, ki so povezani z nastankom številnih benignih in malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela. Visokorizični genotipi HPV (najpomembnejša sta HPV16 in HPV18) so odgovorni za nastanek več kot 99 % primerov raka materničnega vratu, 70–90 % raka zadnjika in nožnice, 40 % raka ženskega zunanega spolovila (vulve), 47 % raka penisa ter 25–30 % raka ustnega žrela. Nizkorizični genotipi HPV iz rodu *alfa* (najpomembnejša sta HPV6 in HPV11) pa so odgovorni za nastanek vseh primerov anogenitalnih bradavic in papilomov grla. V rod *alfa* uvrščamo tudi nekatere genotipe HPV, ki okužijo predvsem večskladni epitel kože in najpogosteje povzročajo navadne kožne bradavice in anogenitalne bradavice pri otrocih (Poljak in sod., 2014).

Okužba s HPV je pri necepljenih, spolno aktivnih moških in ženskah zelo pogosta. Približno 80 % moških in žensk se vsaj enkrat okuži s HPV. Večkrat so okužene mlajše kot starejše ženske. Prevalenca okužb je največja okoli 20. leta, nato pa se s starostjo zmanjšuje. Pri nas in še v nekaterih drugih državah opažamo ponoven dvig prevalence pri starejših ženskah (Ivanuš in Primic Žakelj, 2014; Smith, 2015).

Državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb (DP ZORA) je zasnovan tako, da vabilo na ginekološki pregled in odvzem brisa prejme vsaka ženska stara med 20 in 64 let, ki v zadnjih treh letih ni imela zabeleženega nobenega citološkega izvida v centralnem registru. Če sta dva zaporedna letna brisa negativna in pri ženski ni ginekoloških težav, s presejanjem nadaljujemo na 3 leta. V nacionalni raziskavi pogostosti 14 visokorizičnih genotipov HPV iz rodu *alfa*, v kateri je sodelovalo več kot 4.550 žensk v starosti 20 do 64 let, ki sodelujejo v organiziranem programu presejanja raka materničnega

vratu, končani novembra 2010, so ugotovili, da so okužbe s HPV najpogostejše pri ženskah starih od 20 do 24 let (26 %). Pogostost je visoka tudi pri ženskah starih od 25 do 29 let (20 %) in 30 do 34 let (14 %). V višjih starostnih skupinah pojavnost pade pod 8 %, najnižja pa je pri ženskah starih od 50 do 59 let (3,5 %) (Učakar in sod., 2012).

## 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V raziskavi smo želeli opredeliti stopnjo incidence in prevalence izbranih 16 genotipov HPV (HPV26, 40, 55, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 in IS39) v reprezentativnem vzorcu 636 žensk, ki so bile presejane za raka materničnega vratu.

Pričakovali smo, da bo med 16 izbranimi Genotipi HPV najbolj pogosto dokazana okužba z genotipom HPV55 in da je večina okužb z izbranimi genotipi HPV prehodna in se le pri majhnem deležu žensk razvije dolgotrajna okužba. Predvidevali smo, da bo incidenca okužbe s katerimi koli od izbranih 16 genotipov HPV zelo nizka (med 1–2 %).

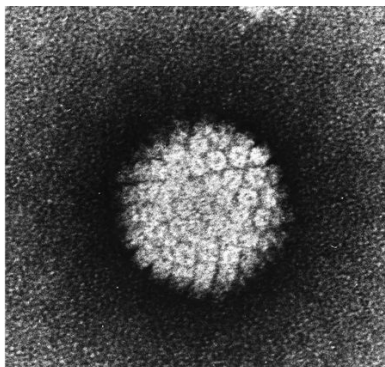
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ČLOVEŠKI PAPILOMAVIRUSI

Človeške papilomaviruse taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ki predstavlja izredno heterogeno skupino virusov. Za človeka klinično najbolj pomemben je rod *alfa*, ki ga sestavlja 14 virusnih vrst. V ta rod so uvrščeni genotipi HPV, ki so povezani z nastankom številnih benignih in malignih novotvorb ploščatoceličnega epitela. Približno 40 genotipov iz rodu *alfa* izkazuje tropizem za epitel sluznic. Glede na vrsto novotvorb, ki jih povzročajo, se delijo na visokorizične in nizkorizične genotipe HPV (Kocjan in Poljak, 2011).

#### 2.1.1 Zgradba virusa

HPV so majhni DNA virusi, brez ovojnice, ki v premeru merijo približno 55 nm (Poljak in sod., 2005). DNA je obdana z dvoplastno beljakovinsko sredico, ki jo imenujemo kapsida. Sestavljena je iz 72 morfoloških enot, kapsomer (Slika 1). Vsaka enota/kapsomera je sestavljena iz dveh tipov strukturnih beljakovin, velike (L1) in male (L2) plaščne beljakovine. Velika plaščna beljakovina ima molekulsko maso 54 kDa, mala pa 74–80 kDa. Kapsomera je sestavljena tako, da je 5 enot L1 povezanih z disulfidnimi mostički, 1 enota L2 pa je vstavljena aksialno, zato da oblikuje in vzdržuje strukturo (Kocjan in Poljak, 2011).



Slika 1: Posnetek virusa HPV z elektronskim mikroskopom (Abby in Vogel, 2006)

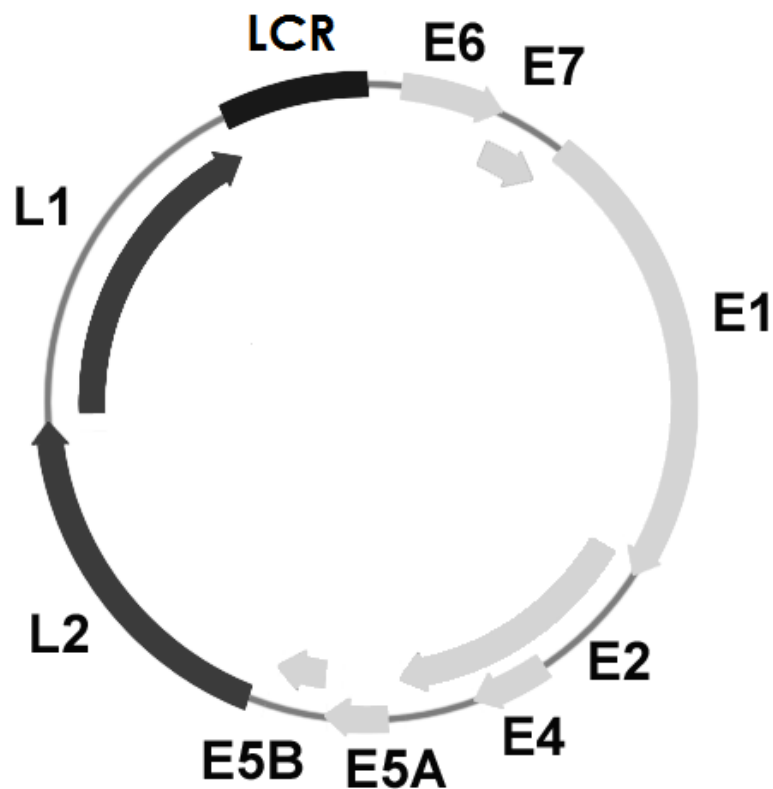
### 2.1.2 Struktura in organizacija genoma

Genom predstavlja zaprta, krožna, dvojnovijačna molekula DNA. Dolga je od 7.500 do 8.000 baznih parov (bp) in ima molekulsko maso  $5,2 \times 10^6$  Da. Genom sestavlja kodirajoče in nekodirajoče območje. Kodirajočo regijo delimo na zgodnje območje E (angl. *early*) in pozno območje L (angl. *late*) (Poljak in sod., 2005).

Območje E vsebuje zapise za uravnavanje podvojevanja virusne DNA in uravnavanje interakcije s celičnimi beljakovinami gostitelja. Do sedaj je poznanih šest različnih genov E, to so E1, E2, E4, E5, E6 in E7 (Slika 2). Najpomembnejši pri patogenezi raka sta beljakovini E6 in E7. Ti beljakovini vplivata na številne celične procese, ki lahko vodijo do maligne transformacije; spodbujata oziroma vzdržujeta celično delitev, zavirata zaščitno delovanje celičnih tumor zavirajočih beljakovin in inducirata celično nesmrtnost (Kocjan in Poljak, 2011). Transformirajoče lastnosti izraža tudi beljakovina E5. Spodbuja tirozin-kinazne receptorje celičnih rastnih dejavnikov EGF (angl. *epidermal growth factor*) in PDGF (angl. *platelet derived growth factor*) in s tem poviša nivo mitogenih dejavnikov. To vodi do višje frekvence celičnih delitev. Beljakovina E1 je pomembna za začetek pomnoževanja DNA in vzdrževanja HPV v obliki zunajkromosomskih krožnih delcev DNA, episomov. E1 se veže z beljakovino E2 v bližini mesta podvojevanja ori (angl. *origin of replication*) in deluje kot encim z ATP-azno in helikazno aktivnostjo. Beljakovina E2 uravnava podvojevanje, segregacijo in izražanje virusnega genoma. Uravnava tudi prepisovanje beljakovin E6 in E7. V visokih koncentracijah E2 zavira prepisovanje E6 in E7, v nizkih koncentracijah pa prepisovanje spodbuja. Beljakovina E4 se veže na citokeratine okuženih celic in tako povzroči njihov propad. Na ta način zrelim virusom omogoči lažje izstopanje iz gostiteljske celice (Kocjan in Poljak, 2011; Poljak in sod., 2005).

Območje L vsebuje zapis za strukturne beljakovine virusne kapside. Gen L1 je najbolj konservativna oz. ohranjena regija virusnega genoma in služi za klasifikacijo genotipov. Nosi zapis za veliko plaščno beljakovino, ki je najbolj imunogena virusna beljakovina. Je specifična za genotip, s katerim se gostitelj okuži. Gen L2 nosi zapis za malo plaščno beljakovino, ki s svojimi epitopi izzove humoralni imunski odziv (Kocjan in Poljak, 2011; Poljak in sod., 2005).

V genomu sta dve nekodirajoči območji: prvo predstavlja nekodirajoče območje LCR (angl. *long control region*), ki se nahaja med genoma L1 in E6 ter vsebuje zapise za podvojevanje in prepisovanje virusnega genoma. Drugo nekodirajoče območje je med genoma E5 in L2, vendar njegova funkcija še ni znana (Kocjan in Poljak, 2011).



Slika 2: Shematski prikaz genoma HPV (Zekan in sod., 2011)

### 2.1.3 Razmnoževanje in patogeneza

Virus v celice vstopi skozi poškodovani epitel kože ali sluznice, najpogosteje preko mikropoškodb. Pri vezavi virusa so ključni heparan sulfatni proteoglikani (HSPG). Beljakovina L1 se primarno veže na HSPG na bazalni membrani epiteljskih celic. V nadaljevanju pride do sekundarne vezave na receptorje HSPG na površini celic. To privede do konformacijskih sprememb, zaradi katerih se izpostavi N-terminalni del beljakovine L2,



ki ga kasneje cepi encim furin. Opisani dogodki pripeljejo do nadaljnjih konformacijskih sprememb, ki vodijo v endocitozo. Po vstopu v celico se virusni delci razgradijo v poznih endosomih in/ali lizosomih. Genom HPV se nato s pomočjo virusne beljakovine L2 prenese v jedro bazalnih celic. Okužba lahko naprej poteka kot produktivna ali nepopolna (abortivna) (Kocjan in Poljak, 2011).

V jedrih bazalnih celic je genom HPV v obliki episomov. Kmalu po okužbi se število kopij DNA poveča neodvisno od gostiteljskega celičnega cikla. Nato podvojevanje virusa sledi podvojevanju gostiteljske celice (pri eni celični delitvi nastane ena kopija virusnega genoma). Z dozorevanjem okuženih celic se povečuje tudi sposobnost razmnoževanja HPV v celici. Popolni virioni se sproščajo le iz popolnoma dozorelih epiteljskih celic (Kocjan in Poljak, 2011; Poljak in sod., 2005).

Najprej poteka sinteza beljakovin E1, E2, E6 in E7, da se v celici ustvarijo pogoji za pomnoževanje virusa. Zaradi vpliva beljakovin E6, E7 in delno E5 se celice suprabazalnega sloja delijo večkrat kot običajno, preden pridejo v višje sloje epitela. Ko celice pridejo v sloj stratum spinosum, naraste koncentracija beljakovin E1 in E2. Beljakovina E2 zaradi povečane koncentracije zavre delovanje beljakovin E6 in E7, kar ustavi delitev celic in omogoči njihovo diferenciacijo v keratinocite. Beljakovini E1 in E2 se nato vežeta na zaporedja DNA v območju LCR in sprožita mehanizme, ki so potrebni za podvojevanje virusne DNA. Predvideva se, da podvojevanje virusnega genoma poteka po načinu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle*). V celicah nastane na tisoče kopij virusnega genoma. Ko okuženi keratinociti dosežejo zgornji sloj epitela, sledi sinteza beljakovin, ki so potrebne za sestavljanje viriona in njegovega sproščanja iz celice. Znak produktivne okužbe je koilocitoza. To je citopatski učinek, ki se odraža v propadu celic in je histološko najbolj viden v zgornji tretjini epitela. Pri produktivnih okužbah nastajajo benigne spremembe (Kocjan in Poljak, 2011; Poljak in sod., 2005).

Poznamo tudi nepopolno oz. abortivno okužbo. V prvi fazi pride do okužbe bazalnih celic ploščatoceličnega epitela, drugo fazo pa predstavlja vključevanje virusne DNA v genom gostitelja. Do tega pride zelo redko, večinoma pri dolgotrajnih okužbah z določenimi visokorizičnimi genotipi HPV. Pri nastanku raka imajo pomembno vlogo tudi drugi karcinogeni dejavniki, kot na primer cigaretni dim, ter UV žarki. Vključevanje virusne

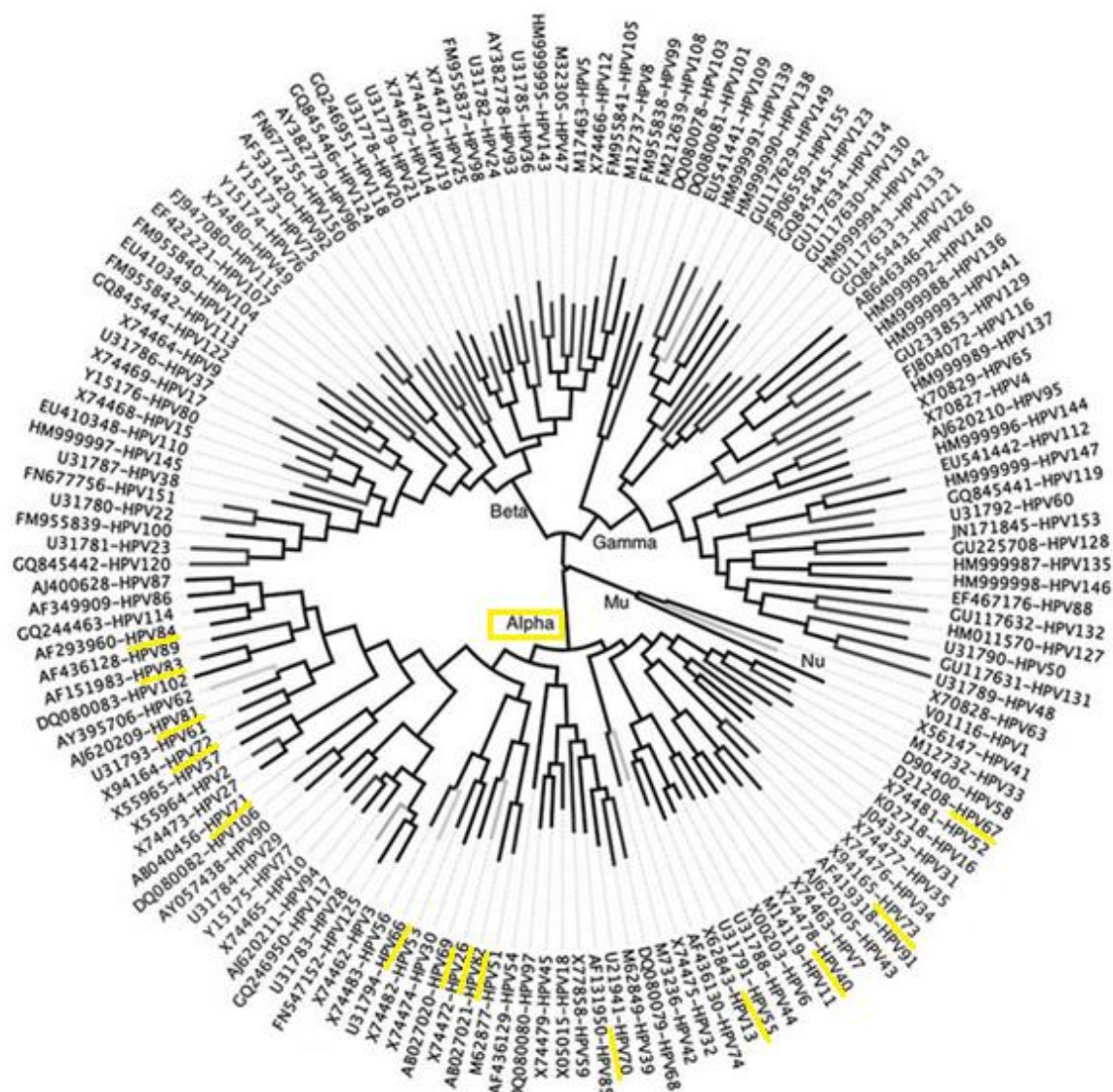
DNA v gostiteljev genom je ključen korak pri patogenezi HPV. HPV DNA se lahko vključi v različna mesta v gostiteljevem genomu. Vključi se skoraj vedno tako, da svoj genom prekine na mestu z zapisom za gen E2. To vodi v povečano oz. nekontrolirano sintezo beljakovin E6 in E7. Ti dve beljakovini se vežeta na tumor zavirajoči beljakovini p53 in pRB ter sodelujeta pri njuni razgradnji. To omogoča neovirano delitev celic s poškodovano DNA, kar lahko privede do maligne transformacije. Beljakovina E6 se lahko veže tudi na nekatere druge celične beljakovine in tako prepreči nespecifičen imunski odziv gostitelja. Najhujša posledica take okužbe je rak materničnega vratu (Kocjan in Poljak, 2011).

#### 2.1.4 Taksonomija

HPV spadajo v družino *Papillomaviridae* in jih delimo v pet rodov *alfa*, *beta*, *gama*, *mu* in *nu*. Naprej jih delimo še na vrste in genotipe (Slika 3). Slednji predstavlja osnovno taksonomsko enoto. HPV razvrščamo v različne genotipe glede na skladnost njihovih nukleotidnih zaporedij. Kot nov Genotip HPV opredelimo vsak izolat, katerega zaporedje gena L1 se razlikuje za več kot 10 % od gena L1 vseh predhodno opredeljenih genotipov HPV. Če je neskladnost dveh zaporedij med 2 in 10 %, to opredelimo kot virusni podtip. Kadar pa je razlika manjša od 2 %, novi virus opredelimo kot podtipsko vrsto enakega genotipa HPV (Kocjan in Poljak, 2011).

Skladnost zaporedja L1 znotraj rodu je med 60 in 70 %, skladnost zaporedja znotraj vrste pa med 71 in 89 %. Trenutno je opredeljenih 205 genotipov HPV (junij 2015), ki jih razvrščamo v 49 virusnih vrst oz. 5 rodov (Bzhalava in sod., 2015).

Odkrivanje novih genotipov HPV spremlja Referenčni center za HPV (angl. *International Papillomavirus Reference Center*), ki deluje pod okriljem inštituta Karolinska (se. Karolinska Institutet) v Stockholmu na Švedskem. Za priznanje novega genotipa je treba določiti celotno nukleotidno zaporedje genoma in ga poslati v prej omenjen center, kjer mu glede na vrstni red osamitve določijo zaporedno številko (De Villiers in sod., 2004).



Slika 3: Filogenetsko drevo genotipov HPV z označenimi izbranimi genotipi (Ma in sod., 2014)

### 2.1.5 Klinična slika

HPV delimo v tri glavne skupine glede na mesto okužbe: kožne, sluznične in okužbe, povezane z redko avtosomno motnjo bradavičasta epidermodisplazija (epidermodysplasia verrucioformis). Kožne okužbe povzročajo predvsem genotipi iz rodu *beta* in nekateri genotipi iz rodu *gama*, *mu* in *nu*. Rod *alfa* vsebuje genotipe, ki povzročajo večino okužb sluznic in nekaj genotipov, ki povzročajo kožne okužbe (Cubie, 2013).

Okužbe s HPV lahko razdelimo tudi glede na to, v katerih predelih telesa pride do okužbe. Ločimo okužbe zunanega dela kože, anogenitalne in oralne okužbe. Okužbe so produktivne, subklinične ali latentne tako v koži kot v sluznicah (Cubie, 2013).

Približno 70 % HPV okužb spontano izzveni v prvem letu po okužbi, 90 % pa v dveh letih po okužbi. Pri ostalih se razvije dolgotrajna okužba. Pri okužbi z visokorizičnimi genotipi to pomeni povečano tveganje za napredovanje v maligne spremembe (Cubie, 2013). Medtem ko genotipi iz rodu *alfa* večinoma povzročajo prehodno okužbo, genotipi iz rodov *beta* in *gama* v koži ostanejo daljše obdobje, lahko tudi dosmrtno. Do okužb z genotipi *beta* in *gama* najverjetneje pride že v otroštvu (Kocjan in Poljak, 2011). V preglednici 1 so povzeti rodovi HPV in tkivni tropizmi, ter bolezni, ki jih povzročajo.

Preglednica 1: Rodovi HPV, tkivni tropizem in najpogostejše bolezni, ki jih povzročajo (Kocjan in Poljak, 2011)

Rod HPV	Tkivni tropizem	Bolezni
<i>alfa</i>	sluznica in koža	rak materničnega vratu, zadnjika, penisa, nožnice, vulve, ustnega dela žrela, anogenitalne bradavice, papilomi grla, fokalna epitelna hiperplazija ustne votline, papilomi ustne votline, navadne kožne bradavice, anogenitalne bradavice pri otrocih, ploščate kožne bradavice
<i>beta</i>	koža	benigne in maligne novotvorbe pri imunsko oslabljenih osebah in bolnikih z bradavičasto epidermodisplazijo
<i>gama</i>	koža	benigne novotvorbe, navadne kožne bradavice
<i>mu</i>	koža	benigne novotvorbe, navadne kožne bradavice, plantarne bradavice
<i>nu</i>	koža	benigne novotvorbe

## 2.2 OPIS IZBRANIH 16 NE-VISOKORIZIČNIH GENOTIPOV HPV

V raziskavi smo se osredotočili na 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV. To so HPV26, 40, 55, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 in IS39 (82sub). Izbrane genotipe HPV uvrščamo v 9 vrst rodu *alfa*.

### 2.2.1 Genotipi iz vrste *alfa 3*

V to vrsto uvrščamo genotipe HPV72, 81, 83 in 84.

HPV72 ima 7.988 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV61, saj izkazuje 83 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še en neodvisni izolat, ki izkazuje 87 % ujemanje.

HPV81 ima 8.070 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV62, saj izkazuje 81 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še en neodvisni izolat, ki izkazuje 99 % ujemanje.

HPV83 ima 8.104 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV102, saj izkazuje 82 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1.

HPV84 ima 7.948 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV114, saj izkazuje 84 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli tudi 82 % ujemanje s HPV86 in HPV87.

### 2.2.2 Genotipi iz vrste *alfa 5*

V to vrsto uvrščamo genotipe HPV26, 69, 82 in IS39.

HPV26 ima 7.855 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je HPV69, saj izkazuje 83 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še en neodvisni izolat, ki prav tako izkazuje 83 % ujemanje.

HPV69 ima 7.700 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV26, saj izkazuje 83 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še en neodvisni izolat, ki izkazuje 99 % ujemanje.

HPV82 ima 7.871 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV IS39, saj izkazuje 92 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še en neodvisni izolat, ki izkazuje 99 % ujemanje.

HPVIS39 ima 7.904 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV82, saj izkazuje 92 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli tudi 84 % ujemanje s HPV51.

### **2.2.3 Genotipi iz vrste *alfa 6***

V to vrsto uvrščamo genotip HPV66, ki je dolg 7.824 bp. Najbolj soroden je s HPV56, saj izkazuje 88 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še 10 neodvisnih izolatov, ki izkazujejo 98–99 % ujemanje.

### **2.2.4 Genotipi iz vrste *alfa 7***

V to vrsto uvrščamo genotip HPV70, ki je dolg 7.905 bp. Najbolj soroden je s HPV39, saj izkazuje 82 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli tudi 81 % ujemanje s HPV68 in 8 neodvisnih izolatov, ki izkazujejo 98–99% ujemanje.

### **2.2.5 Genotipi iz vrste *alfa 8***

V to vrsto uvrščamo genotip HPV40, ki je dolg 7.909 bp. Najbolj soroden je s HPV7, saj izkazuje 84 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli tudi 7 neodvisnih izolatov, ki izkazujejo 99 % ujemanje.

### **2.2.6 Genotipi iz vrste *alfa 9***

V to vrsto uvrščamo genotip HPV67, ki je dolg 7.801 bp. Najbolj soroden je s HPV33 in HPV58, saj izkazuje 81 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo prav tako našli 7 neodvisnih izolatov, ki izkazujejo 99 % ujemanje.

### **2.2.7 Genotipi iz vrste *alfa 10***

V to vrsto uvrščamo genotip HPV55, ki je dolg 7.822 bp. Najbolj soroden je s HPV44, saj izkazuje 93 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli tudi 83 % ujemanje s HPV74 in 81 % s HPV13. Našli smo tudi 8 neodvisnih izolatov, ki izkazujejo 99 % ujemanje.

### **2.2.8 Genotipi iz vrste *alfa 11***

V to vrsto uvrščamo genotipa HPV64 in HPV73.

HPV64 je najbolj soroden HPV34.

HPV73 ima 7.700 bp dolgo zaporedje DNA. Najbolj soroden je s HPV34, saj izkazuje 84 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli še en neodvisni izolat, ki izkazuje 99 % ujemanje.

### **2.2.9 Genotipi iz vrste *alfa 14***

V to vrsto uvrščamo genotip HPV71, ki je dolg 8.017 bp. Najbolj soroden je s HPV90, saj izkazuje 78 % ujemanje v nukleotidnem zaporedju gena L1. V genski banki smo našli tudi 77 % ujemanje s HPV106. Našli smo še 4 neodvisne izolate, ki izkazujejo 99 % ujemanje.

## 2.3 DIAGNOSTIKA HPV

Bris materničnega vratu predstavlja osnovni klinični vzorec za dokazovanje prisotnosti HPV iz rodu *alfa*. Bris odvezamo s posebno krtačko in ga v transportnem gojišču dostavimo v mikrobiološki laboratorij. Brise v transportnem gojišču lahko shranjujemo na sobni temperaturi do enega tedna. HPV lahko dokazujemo tudi v brisu nožnice, penisa, analnih ali perianalnih predelov. Testiramo lahko tudi tkivne vzorce novotvorb (Kocjan in Poljak, 2011).

### 2.3.1 Tradicionalne metode dokazovanja okužb s HPV

Med tradicionalne metode dokazovanja okužb s HPV spada opazovanje značilnih citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom, opazovanje virusnih delcev z elektronskim mikroskopom in dokazovanje specifičnih virusnih beljakovin z uporabo poliklonskih protiteles z imunohistokemično metodo (Eder, 2007). Metoda osamitve HPV v celični kulturi ni možna, saj se virus pomnožuje le v dokončno diferenciranih celicah ploščatoceličnega epitela (Kocjan in Poljak, 2011). Tradicionalne metode niso dovolj občutljive in z njimi ne moremo določiti genotipa HPV, zato se danes v diagnostiki večinoma uporabljajo le molekularne metode (Eder, 2007).

### 2.3.2 Molekularne metode dokazovanja okužb s HPV

Molekularne metode temeljijo na zaznavanju specifičnih zaporedij virusne nukleinske kisline. Delimo jih na metode brez predhodnega pomnoževanja nukleinskih kislin (hibridizacijske metode) in metode s predhodnim pomnoževanjem nukleinskih kislin (Poljak in sod., 2005). Molekularne metode pa lahko hkrati delimo še na genotipizacijske teste in teste za dokazovanje genotipov HPV brez opredelitev posameznih genotipov.



### 2.3.2.1 Testi za dokazovanje genotipov HPV brez opredelitve posameznih genotipov

#### Hibridizacijske metode

Hibridizacijske metode temeljijo na povezavi (hibridizaciji) med označenimi deli nukleinskih kislin oz. lovkami in tarčno DNA. Lovke so lahko označene z biotinom, dioksigeninom, fluorescentnimi barvili ali z radioaktivnimi označevalci (Poljak in sod., 2005).

Hibridizacija po Southernu je ena najbolj specifičnih in občutljivejših tehnik za odkrivanje okužb s HPV. Uporabljamo jo lahko tudi za ugotavljanje, ali je virusni genom v gostiteljski celici v obliki episoma ali je vključen v genom (Poljak in sod., 2005). Prva faza je osamitev in encimska razgradnja virusne nukleinske kisline. Temu sledi gelska elektroforeza, s katero nukleinsko kislino ločimo v fragmente glede na njihovo velikost. Tako ločene fragmente nato prenesemo na nitrocelulozno membrano in jih imobiliziramo. Na membrani izvedemo hibridizacijo s komplementarnimi označenimi lovkami. V primeru obarvanega hibrida lahko potrdimo DNA v preiskovanem vzorcu (Tsai in Cseke, 2004). Metoda je za rutinsko diagnostiko neprimerna, saj je zamudna, draga in neprimerna za obdelavo več vzorcev hkrati (Poljak in sod., 2005).

Hibridizacija *in situ* (ISH, angl. *in situ hybridization*) je metoda, pri kateri predhodna izolacija nukleinske kisline iz celic ni potrebna. ISH lahko izvajamo na tkivnih rezinah ali na citoloških vzorcih, saj reakcija poteka neposredno v jedru okuženih celic. Za izvedbo uporabljamo označene lovke DNA ali RNA (angl. *ribonucleic acid*), ki so komplementarne tarčnemu delu nukleinske kisline. Pozitivne rezultate zaznamo tako, da dodamo z encimom označena protitelesa in nato dodamo substrat (Mukay, 1996). Rezultat ovrednotimo z mikroskopom s fluorescenco. Ta je pozitiven, če v preparatu opazimo specifične precipitate znotraj celic. S to metodo lahko ugotovimo tudi, ali je DNA v obliki episoma ali je vključena v gostiteljev genom. Metoda je tehnično zahtevna in v primerjavi s PCR (angl. *polymerase chain reaction*) manj občutljiva, zato jo v rutinski diagnostiki redko uporabljamo (Poljak in Kocjan, 2010).

Hibridizacija *dot-blot* je metoda, pri kateri je DNA ali RNA vezana na nosilec (npr. nitroceluloza), na katerem izvedemo hibridizacijo s komplementarnimi označenimi

lovkami. Od hibridizacije po Southernu se razlikuje po tem, da pri tej tehniki predhodna izolacija in gelska elektroforeza nista potrebni. V primeru pozitivnega rezultata na membrani vidimo madež (Bergmans in Gaastra, 1988). Pomanjkljivosti te metode so lažno pozitivni rezultati in nizka občutljivost (Poljak in sod., 2005).

Najpomembnejši in najpogosteje uporabljen diagnostični test za dokazovanje HPV, ki temelji na hibridizacijski metodi, je test Hybrid Capture 2 HPV DNA, ki so ga leta 1997 razvili v podjetju Digene Corporation (Gaithersburg, MD, ZDA), trenutno pa ga proizvaja podjetje Qiagen (Hilden, Nemčija). Prvi korak je denaturacija dvojnoverižne DNA v enoverižno DNA, čemur sledi tekočinska hibridizacija z mešanico označenih lovk RNA. Običajno mešanica vsebuje en komplet lovk, ki prepozna ne-visokorizične in drugi komplet lovk, ki prepozna visokorizične genotipe HPV. Ko pride do nastanka hibridizacijskih kompleksov, se ti vežejo na poliklonska protitelesa, ki so vezana na sami površini vdolbinic mikrotitracijske ploščice. Hibride nato zaznamo s protitelesi proti hibridom DNA/RNA. Protitelesa so označena z alkalno fosfatazo, zato lahko po dodatku kemiluminiscentnega substrata merimo intenziteto svetlobe in tako določimo količino vezanih hibridov oz. količino HPV DNA v vzorcih. Večja kot je intenziteta svetlobe, več DNA imamo v vzorcu. Glavna pomanjkljivost tega testa je pomanjkanje interne kontrole in navzkrižna reaktivnost med mešanico lovk in nekaterimi genotipi HPV, ki jih test sicer ne dokazuje. Pomanjkljivost je tudi ta, da s tem testom ne moremo določiti posameznih genotipov HPV (Poljak in Kocjan, 2010; Poljak in sod., 2005).

### 2.3.2.2 Genotipizacijski testi

#### Verižna reakcija s polimerazo

Dokazovanje virusov s PCR temelji na pomnoževanju za virus značilnega majhnega odseka genoma. Reakcija poteka v treh korakih. Prvi korak je denaturacija dvojnoverižne DNA, ki poteka pri 95–100 °C. Sledi vezava začetnih oligonukleotidov pri temperaturi od 40-60 °C. Vsak začetni oligonukleotid je dolg približno 20 bp in je komplementaren eni od verig DNA. Začetne oligonukleotide moramo dodati v veliki količini, da se enoverižna DNA v drugem koraku ne poveže zopet s svojo komplementarno verigo, ampak z začetnimi oligonukleotidi. Tretji korak predstavlja podaljševanje DNA. Vezavi začetnih oligonukleotidov sledi sinteza komplementarne DNA pri temperaturi okoli 72 °C.

Temperaturno stabilni encim polimeraza dodaja nukleotide, ki so komplementarni tistim na enovijačni verigi DNA, kar privede do ponovnega nastanka dvojnovijačne DNA. Število verig DNA se z vsako ponovitvijo temperaturnega cikla podvoji (Schochetman in sod., 1988).

Za reakcijo lahko izberemo med dvema vrstama začetnih oligonukleotidov. Poznamo genotipsko in skupinsko značilne začetne oligonukleotide. Genotipsko značilni začetni oligonukleotidi so zelo specifični in učinkoviti, vendar ta metoda ni uporabna za določanje genotipov v velikem številu vzorcev, saj moramo za dokaz več različnih genotipov HPV izvesti več reakcij PCR. Metode s skupinsko značilnimi oligonukleotidi so uporabnejše, saj omogočajo pomnoževanje velikega števila genotipov HPV v eni reakciji PCR. Največkrat se uporabljajo skupinsko značilni oligonukleotidi PGMY09/PGMY11, GP5+/GP6+ in SPF10. Ti pomnožujejo 150, 450 oz. 65 bp dolg odsek DNA gena L1 (Poljak in sod., 2005).

Za preverjanje specifičnosti pridelkov PCR po vsaki reakciji lahko uporabimo agarozno gelsko elektroforezo, metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*), encimsko oligonukleotidni test, hibridizacijski metodi (reverzni *dot-blot*-RDB in reverzni *line-blot*-RLB) in neposredno določanje nukleotidnega zaporedja (Poljak in sod., 2005).

Agarozna gelska elektroforeza je najučinkovitejši način za ločevanje odsekov DNA glede na velikost. Ločujemo lahko fragmente od 100 bp do 25 kbp. Fosfatna hrbtenica DNA je negativno nabita, zato DNA v električnem polju potuje proti pozitivni elektrodi. Ko DNA potuje, se fragmenti ločujejo glede na velikost. Manjši kot je fragment, večjo razdaljo bo prepotoval. Za določanje velikosti fragmentov si pomagamo s primerjavo s standardi, ki jih ločujemo v istih pogojih. Pomanjkljivost te metode je nizka specifičnost in občutljivost (Lee in sod., 2012).

RFLP je metoda, pri kateri DNA razgradimo z restrikcijskimi encimi. Pri tem nastane mešanica fragmentov DNA, ki je specifična za določen Genotip HPV, dobljene vzorce pa primerjamo s standardi. Večje, kot je število restrikcijskih endonukleaz, večja je zanesljivost metode. Ker je metoda dolgotrajna in zahtevna, potrebuje visoke koncentracije

pridelka PCR in zaznava le polimorfizme, ki vplivajo na vezavna mesta restrikcijskih encimov, se le redko uporablja (Rasmussen, 2012).

Z encimsko oligonukleotidnim testom dokazujemo pridelek PCR s specifičnimi lovkami, ki so vezane na mikrotitrski ploščici. Po dodatku z encimom označenih protiteles, odčitamo rezultat hibridizacije spektrofotometrično (Carcillo in sod., 1994; Poljak in sod., 2005).

Reverzni *dot-blot* se izvaja po običajnem protokolu za *dot-blot*, le da na najlonsko membrano nanašamo pridelek PCR ne pa izolirane DNA. Temu sledi hibridizacija z genotipsko specifičnimi lovkami. V procesu hibridizacije se genotipsko značilne lovke vežejo na komplementarni odsek HPV DNA. Reverzni line-blot je metoda, ki prav tako temelji na hibridizaciji z genotipsko značilnimi lovkami, vendar so v tem primeru lovke na nitrocelulozno membrano nanesene v obliki trakov. S to metodo lahko opredelimo več genotipov hkrati (Poljak in sod., 2005).

Razvili so tudi komercialno dostopne teste, ki temeljijo na reverzni line-blot metodi. Dva od teh sta Linear Array Genotyping test (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ) in INNO LiPA HPV Genotyping Extra (INNO LiPA, Fujirebio NV, Gent, Belgija).

Linear Array test je eden najpogosteje uporabljenih genotipizacijskih testov HPV. Z njim lahko identificiramo 37 genotipov HPV, ki jih uvrščamo v vrsto *alfa* (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, 89). Temelji na pomnoževanju 450 bp dolge regije gena L1, s skupinsko značilnimi začetnimi oligonukleotidi MY09/MY11 (PGMY09/PGMY11) in HMB01, ter 268 bp dolgo regijo človeškega gena beta globina. Po končani PCR reakciji je treba dodati denaturacijski reagent, da se dvojnovijačna DNA razklene (Poljak in Kocjan, 2010; Poljak in sod., 2005).

Na površini reakcijskih trakov je vezanih 37 HPV značilnih oligonukleotidnih lovk in dve beta globin značilni oligonukleotidni lovki. Tarčna DNA se veže z lovkami, hibride pa zaznamo s pomočjo vidnega obarvanja (Poljak in Kocjan, 2010; Poljak in sod., 2005).

Test INNO-LiPA HPV je test, s katerim lahko identificiramo 28 genotipov HPV (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 82). Test temelji na enakem principu kot Linear Array test, le da pri tem testu pomnožujemo 65 bp dolgo zaporedje znotraj gena L1 (Poljak in Kocjan, 2010; Poljak in sod., 2005).

Metoda določanja nukleotidnega zaporedja nam omogoča natančno in dokončno opredelitev genotipa HPV. Zaznamo lahko tudi mutacije, določimo podtipske različice HPV in opredelimo nove genotipe (Poljak in sod., 2005). Poznamo več metod za neposredno določanje nukleotidnega zaporedja. Najpogosteje uporabljene so različice, ki temeljijo na metodi prekinitve verige DNA, ki jo je leta 1977 razvil Frederic Sanger. Sekvenciranje po Sangerju temelji na sintezi verige DNA z dodajanjem deoksinukleotidov in diodeoksinukleotidov. Dideoksinukleotidom manjka OH skupina na sladkorju, zato ti ne morejo tvoriti fosfodiesterske vezi z naslednjim oligonukleotidom v verigi. Tako se sinteza novonastale DNA zaustavi in na ta način dobimo fragmente DNA različnih velikosti. Analiziranje in sestavljanje fragmentov po velikosti je sprva potekalo z gelsko elektorforezo, danes pa to poteka avtomatsko. Dideoskinukleotidi so označeni s fluorescentnimi barvili, zato lahko reakcija poteka hkrati z vsemi štirimi dideoksinukleotidi v eni mešanici (Prober in sod., 1987).

Pri mešanih okužbah moramo pridelke PCR najprej vklonirati v plazmidne vektorje, jih razmnožiti v ustreznih bakterijskih sistemih in šele nato iz osamljene plazmidne DNA določiti nukleotidno zaporedje. Tehnika za določanje mešanih okužb je tehnično zahtevna, draga in zamudna, zato se v rutinske namene večinoma ne uporablja (Poljak in sod., 2005).

#### Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

PCR v realnem času (RT-PCR, angl. *real time PCR*) je nadgradnja klasične reakcije PCR, kjer pomnoževanje tarčne DNA in določanje specifičnosti produktov PCR z uporabo fluorescentno označenih lovk poteka hkrati. Reakcija omogoča natančno kvantifikacijo nukleinskih kislin tudi v primeru nizke začetne koncentracije DNA v vzorcu. RT-PCR spremlja količino produkta, proizvedenega v vsakem temperaturnem ciklu pomnoževanja tako, da meri fluorescentni signal, ki med reakcijo narašča sorazmerno s količino nastalih produktov. Vrednost Ct (angl. *threshold cycle*) predstavlja zaporedno številko cikla, pri

katerem sproščena fluorescenca prekorači za tisti produkt določeno mejno fluorescenčno vrednost. Na podlagi dosežene vrednosti Ct tako ocenimo koncentracijo DNA v preiskovanem vzorcu. (Fraga in sod., 2008).

#### Metode, ki temeljijo na dokazovanju mRNA

Za diagnostične namene so najpomembnejši prepisi mRNA, ki kodirajo virusni beljakovini E6 in E7. Dokazovanje virusne mRNA je možno z reverzno transkripcijo (RT-PCR) ali s pomnoževanjem, posredovanim s prepisovanjem RNA (NASBA, angl. *nucleic acid sequence-based amplification*). V primerjavi s testi, kjer dokazujemo prisotnost HPV DNA, naj bi imeli testi za dokazovanje HPV mRNA večjo specifičnost za odkrivanje predrakavih sprememb (Poljak in Kocjan, 2010).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIJA

V splošni populaciji žensk je pogostost pojavljanja okužb z genotipi HPV iz rodu *alfa* ocenjena na približno 5-40 % in je odvisna od starosti. V petih letih po začetku spolnega življenja je vsaj polovica žensk okužena z vsaj enim genotipom iz rodu *alfa*. Pogostost okužb s HPV je najvišja pri ženskah, ki so mlajše od 30 let in so spolno aktivne (20–40 %). Nato pogostost okužb pade pod 10 %, saj pride do prehoda v prikrito okužbo ali pa okužbe izginejo. V starostnem obdobju od 40 do 45 let pride do pojava drugega vrha pogostosti okužbe s HPV. Pri moških je pogostost okužbe z genotipi HPV iz rodu *alfa* podobna kot pri ženskah. V prvih dveh letih po začetku spolnega življenja vsaj polovica moških pride v stik z najmanj enim genotipom HPV iz rodu *alfa*. Večina okužb (80 %) s HPV spontano izzveni v roku enega leta po okužbi (Kocjan in Poljak, 2011).

### 2.4.1 Okužbe s HPV v Sloveniji

V presečni raziskavi, ki je bila izvedena v letu 2009/2010, je bila prvič v Sloveniji ocenjena prevalenca tako visokorizičnih kot ne-visokorizičnih genotipov HPV pri ženskah starih od 20 do 64 let. Prevalenca okužb z vsaj enim od genotipov HPV je bila 12,9 % in z

vsaj enim od ne-visokorizičnih genotipov 10,0 %, brez sočasne okužbe z visokorizičnim pa 4,0 % (Poljak in sod., 2011; Učakar in sod., 2012; Učakar in sod., 2014). Vse ženske, ki so sodelovale v zgoraj omenjeni raziskavi, so bile po treh letih ponovno povabljene k sodelovanju. Tako bo mogoče ugotoviti delež dolgotrajnih okužb z visokorizičnimi genotipi HPV in incidenco okužb z visokorizičnimi genotipi HPV.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

V raziskavo je bilo vključenih 636 brisov materničnega vratu, ki so bili odvzeti ženskam starim od 20 do 64 let (vsaki ženski je bil odvzet en bris). Jemanje brisov je potekalo v okviru drugega kroga nacionalne raziskave, ki je potekala v letih 2012/2013. V raziskavi so sodelovale ženske, ki se udeležujejo organiziranega programa presejanja raka materničnega vratu (DP ZORA). Vzorci so bili v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa dostavljeni v transportnem gojišču ThinPrep® PreservCyt® (ThinPrep®) (Hologic Inc., Marlborough, ZDA).

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Postopek osamitve virusne DNA

Za osamitev virusne DNA iz prejetih vzorcev smo uporabili kemikalije iz kompleta QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

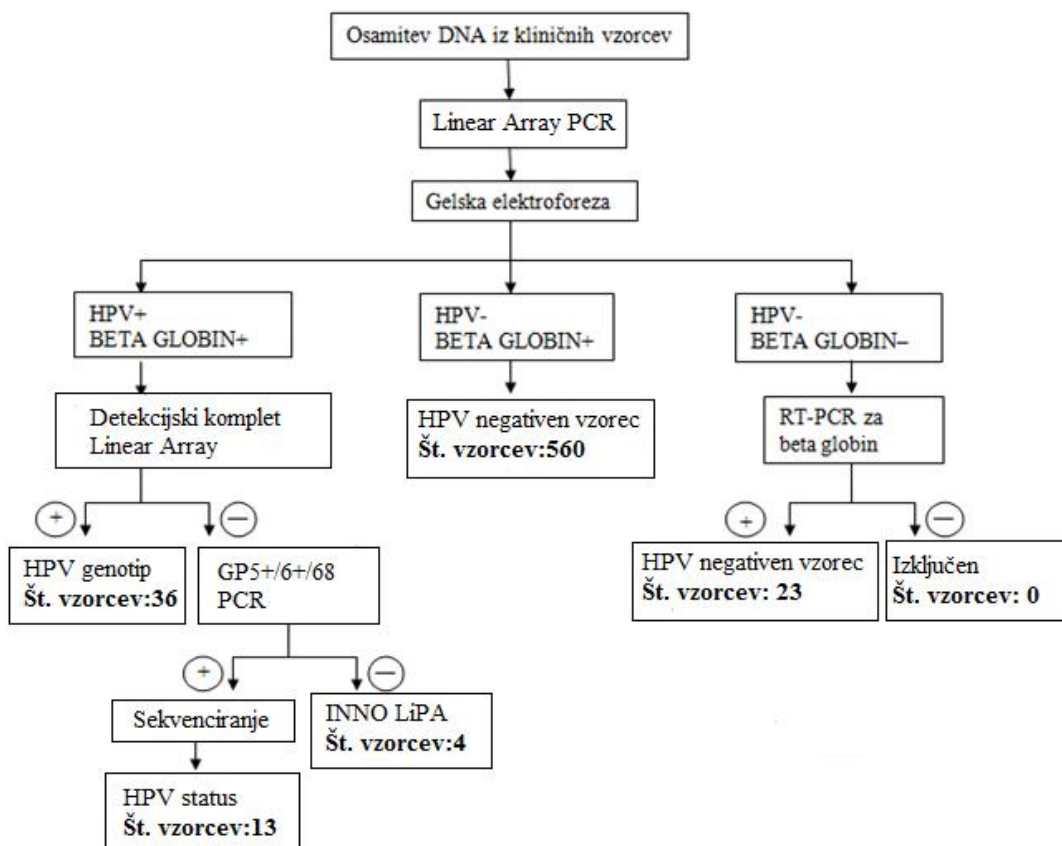
Vzorci smo najprej centrifugirali v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5.424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) 20 minut pri 11.766 obratih na minuto (rpm, angl. *rotations per minute*). Po končani centrifugi smo supernatant odlili in za nadaljnje postopke uporabili nastalo usedlino. Dodali smo 200 µl PBS pufra in vsebino premešali na mešalu Top Mix FB15024 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemčija). V nove reakcijske epruvetke smo nato zmešali 20 µl proteinaze K, bris in 200 µl ALT pufra. Vse skupaj smo ponovno premešali na mešalu. Sledila je desetminutna inkubacija vzorcev v termobloku Thermomixer Comfort (Eppendorf) pri 56 °C. Po končani inkubaciji smo vsebino na kratko centrifugirali. V vsak vzorec smo dodali 200 µl etanola, nato smo vsebino 10 sekund mešali na mešalu in na kratko centrifugirali. Celotno vsebino reakcijskih epruvetk smo prenesli v zbiralne epruvetke s koloncami. Sledilo je centrifugiranje, 1 minuto pri 8.000 rpm. Po končani centrifugi smo kolonice prenesli v nove zbiralne epruvetke, dodali



500 µl spiralnega pufru AW1 in centrifugirali 1 minuto na 8.000 rpm. Kolonice smo zopet prenesli v nove zbiralne epruvetke in dodali 500 µl spiralnega pufru AW2. Temu je sledila triminutna centrifuga na 14.000 rpm. Kolonice v novih zbiralnih epruvetkah smo centrifugirali eno minuto na 14.000 rpm. Kolonice smo nato prestavili v nove reakcijske epruvetke in dodali 100 µl elucijskega pufru AE. Sledila je minutna inkubacija na sobni temperaturi in centrifugiranje, 1 minuto na 8.000 rpm. Po končani centrifugi smo kolonice zavrgli, osamljeno DNA pa do uporabe shranili v hladilniku na 4 °C.

Koncentracijo izolirane DNA smo določili z napravo NanoDrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, Velika Britanija). NanoDrop omogoča spektrofotometrične meritve, s katerimi dobimo podatke o količini nukleinskih kislin v vzorcu v ng/µl.

Po osamitvi DNA iz kliničnih vzorcev smo delo nadaljevali, kot je prikazano po naslednji shemi (Slika 4).



Slika 4: Shema poteka dela

Vzorci smo najprej pomnožili z Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ) in specifične PCR produkte preverili z gelsko elektroforezo. Nato smo glede na pridobljene rezultate nadaljevali našo analizo vzorca.

Če je bil produkt pozitiven za HPV in beta globin, smo analizo nadaljevali z detekcijskim kompletom Linear Array. Na ta način smo določili, Genotip HPV. Če s kompletom Linear Array nismo dobili rezultata smo analizo nadaljevali tako, da smo z vzorci najprej naredili GP5+/6+/68 PCR. V primeru pozitivnega rezultata smo analizo nadaljevali s sekvenciranjem, v primeru negativnega rezultata pa smo vzorce analizirali s testom INNO-LiPA (Fujirebio NV, Gent, Belgija).

Če je bil vzorec negativen za beta globin in za HPV, smo vzorec dodatno analizirali z RT-PCR za dokaz beta globina. Če je bil RT-PCR za beta globin pozitiven, smo vzorec opredelili kot HPV negativen.

V primeru, ko je bil vzorec na gelu pozitiven za beta globin in negativen za HPV, smo vzorec opredelili kot HPV negativen

### **3.2.2 Določitev genotipov HPV z Linear Array**

#### **3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo**

Za izvajanje PCR reakcije smo uporabljali kemikalije iz kompleta Linear Array Genotyping kit. Za detekcijo HPV se uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na 450 bp dolgo zaporedje znotraj ohranjene regije genoma L1 HPV. S to mešanico začetnih oligonukleotidov lahko pomnožimo 37 različnih genotipov HPV (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, 89). Poleg začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na zaporedja genotipov HPV, mešanica vsebuje tudi začetne oligonukleotide, ki nalegajo na 268 bp dolgo zaporedje človeškega gena za beta globin, ki predstavlja interno kontrolo testa.

Za vsak vzorec smo v reakcijsko epruvetko odpipetirali 25 µl reakcijske mešanice in 25 µl izolirane HPV DNA. Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilu proizvajalca, kot je prikazano v preglednici 2.

Po končani PCR reakciji smo v vsako reakcijsko epruvetko dodali 50  $\mu$ l denaturacijskega pufra. Reakcijsko mešanico smo shranili na 4 °C do nadaljnje uporabe.

Preglednica 2: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 450 bp velikega dela gena L1 HPV za reakcijo PCR

<b>Kemikalije</b>	<b>Volumen za 1 vzorec (<math>\mu</math>l)</b>
HPV Master Mix	20,6
HPV Mg 2+	4,4
skupni volumen reakcijske mešanice ( $\mu$ l)	25
HPV DNA	25
skupni reakcijski volumen	50

Pomnoževanje smo izvedli v aparaturi GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, ZDA). Program, ki smo ga uporabili, je opisan v preglednici 3.

Preglednica 3: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo PCR pomnoževanja 450 bp velikega dela gena L1 HPV

<b>Temperatura</b>	<b>Čas trajanja</b>	<b>Število ponovitev</b>	<b>Faza pomnoževanja</b>
50 °C	2 minuti	1	aktivacija
95 °C	9 minut	1	denaturacija
95 °C	30 sekund	40	pomnoževanje
55 °C	1 minuta		
72 °C	1 minuta		
72 °C	5 minut	1	podaljševanje
72 °C	$\infty$	1	hlajenje

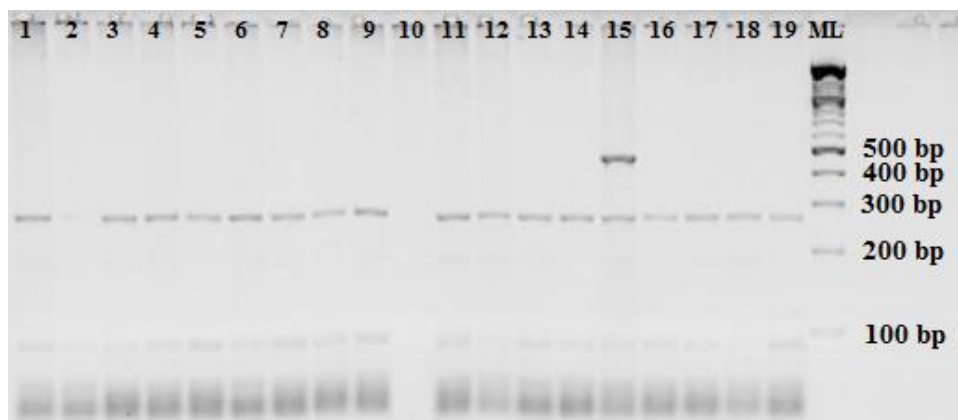
Prisotnost HPV DNA v vzorcu smo preverili z gelsko elektroforezo.

### 3.2.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Za izvedbo gelske elektroforeze smo pripravili agarozni gel tako, da smo stehtali 1 g agaroze in dodali 50 ml 1x pufra TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, Elchrom Scientific, Švica). Po segrevanju smo dodali 5  $\mu$ l barvila Gel Star (Lonza, Rockland, ZDA). Mešanico smo vlili v prej pripravljeno banjico. Ko se je gel strdil, je bil pripravljen za uporabo.

V prvo luknjico gela smo vedno nanesti 6,4  $\mu$ l molekularne lestvice (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija), ki v lestvici po 100 bp označuje velikost delcev, prepotovanih v gelu. V vsako naslednjo luknjico smo odpipetirali 10  $\mu$ l vzorca, zmešanega s 3  $\mu$ l barvila 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA) za usedanje DNA v jamico.

Elektroforeza je potekala 25 minut na sobni temperaturi in napetosti 250 V. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali z napravo BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael). Analizo gela smo izvedli s primerjavo velikosti produktov z velikostjo molekularne lestvice. Na gelu smo dobili produkte dveh velikosti. Produkt PCR beta globina je velik 268 bp, produkti HPV pa okoli 450 bp (Slika 5).

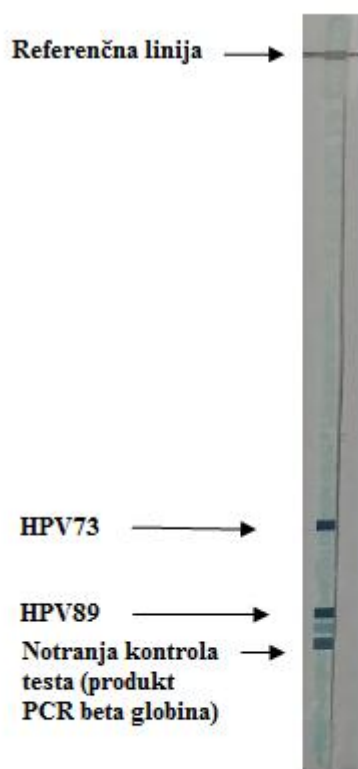


Slika 5: Fotografija elektroforeznega gela s produkti PCR za HPV in beta globin (kolona 15: HPV in beta globin pozitiven vzorec; koloni 2 in 10: HPV in beta globin negativna vzorca; ostale kolone: HPV negativni in beta globin pozitivni vzorci; kolona ML: molekularna lestvica)

Če smo pri analizi gela ugotovili, da je vzorec pozitiven za HPV, smo analizo nadaljevali z detekcijskim kompletom Linear Array. Na ta način smo določili, kateri Genotip HPV je prisoten v vzorcu in vzorec opredelili kot HPV pozitiven. Če je bil vzorec negativen za beta globin in za HPV, smo vzorec dodatno analizirali z RT-PCR za dokaz beta globina. Če je bil RT-PCR za beta globin pozitiven, smo vzorec opredelili kot HPV negativen. V primeru, ko je bil vzorec na gelu pozitiven za beta globin in negativen za HPV, smo vzorec opredelili kot HPV negativen (slika 4).

### 3.2.2.3 Detekcija genotipov HPV z Linear Array

Za vzorce, ki smo jih opredelili kot HPV pozitivne, smo z detekcijskim kompletom Linear Array določili posamezne genotipe HPV na aparaturi ProfiBlot™ T48 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica) (Slika 6).



Slika 6: Fotografija pozitivnega rezultata pri detekciji genotipov HPV z detekcijskim kompletom Linear Array

### 3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času za beta globin

Za dokaz prisotnosti gena za beta globin smo uporabili kemikalije iz kompleta LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Pri tem testu se za detekcijo uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na 268 bp dolgo zaporedje gena človeškega proteina beta globin, s čimer preverimo uspešnost izolacije DNA. Z RT-PCR smo testirali vzorce, ki so bili na gelu negativni za HPV in beta globin.

Za vsak vzorec smo v reakcijsko epruvetko odpipetirali 20 µl reakcijske mešanice in 5 µl izolirane HPV DNA. Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilu proizvajalca, kot je prikazano v preglednici 4.

V reakcijo smo poleg vzorcev vključili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Kot negativno kontrolo smo dodali 5 µl vode, kot pozitivno kontrolo pa vzorec, ki je vseboval beta globin. Vzorec smo označili kot beta globin pozitiven v primeru, ko je bila točka tališča med 88 in 89 °C.

Preglednica 4: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 268 bp velikega dela gena beta globin za reakcijo RT-PCR

<b>Kemikalije</b>	<b>Volumen za 1 vzorec (µl)</b>
FastStart Reaction Mix SYBR Green I	2,5
MgCl <sub>2</sub>	3
začetni oligonukleotid PC04	0,25
začetni oligonukleotid GH20	0,25
H <sub>2</sub> O	14
volumen reakcijske mešanice	20
HPV DNA	5
skupni reakcijski volumen	25

Za pomnoževanje smo uporabili računalniško voden sistem LightCycler Instrument tip 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Izbrali smo program pomnoževanja, ki je opisan v preglednici 5.

Preglednica 5: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo pomnoževanja RT-PCR 268 bp velikega dela gena beta globin

Temperatura	Čas trajanja	Število ponovitev	Faza podvojevanja
95 °C	10 minut	1	aktivacija/denaturacija
95 °C	15 sekund	45	pomnoževanje
67 °C	4 sekund		
72 °C	10 sekund		
72 °C	30 sekund	1	analiza talilne krivulje
40 °C	30 sekund	1	hlajenje

### 3.2.4 Dokazovanje HPV DNA z začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68

#### 3.2.4.1 Izvedba PCR

Za vzorce, ki so bili na gelski elektroforezi pozitivni na HPV, vendar s testom Linear Array nismo dobili podatka o genotipu, smo za dokončno potrditev prisotnosti HPV testirali še s tretjim testom. Za dokazovanje klinično najpomembnejših HPV iz rodu *alfa* smo uporabili PCR s skupinsko-značilnimi začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68.

Za dokazovanje klinično najpomembnejših HPV iz rodu *alfa* smo uporabili PCR s skupinsko-značilnimi začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68. S temi začetnimi oligonukleotidi dokazujemo 140–150 bp velik del gena L1. Dokažemo lahko 40 različnih genotipov HPV; HPV6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89, 90, 91.

Za izvedbo testa smo uporabili kemikalije iz komercialno dostopnega kompleta HotStarTaqPlus PCR (Qiagen). Za vsak vzorec smo v sterilno reakcijsko epruvetko

odpipetirali 20 µl reakcijske mešanice in 5 µl izolirane HPV DNA. Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilu proizvajalca, kot je prikazano v preglednici 6.

Preglednica 6: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 150 bp velikega dela gena L1 HPV za reakcijo PCR

<b>Kemikalije</b>	<b>Volumen za 1 vzorec (µl)</b>
dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dUTP)	0,5
10x CoralLoad PCR Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
mešanica začetnih oligonukleotidov: GP5+ (40 µM) GP68 (2 µM)	0,625
začetni oligonukleotid GP6+	0,5
Uracil-DNA Glycosylase	1
HotStarTaq DNA Polymerase	0,125
H <sub>2</sub> O	12,25
volumen reakcijske mešanice	20
HPV DNA	5
skupni reakcijski volumen	25

Pomnoževanje smo izvedli v aparaturi GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Program, ki smo ga uporabili, je opisan v preglednici 7.



Preglednica 7: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo pomnoževanja PCR 150 bp velikega dela gena L1 HPV

Temperatura	Čas trajanja	Število ponovitev	Faza podvojevanja
25 °C	10 minut	1	dekontaminacija
95 °C	5 minut	1	aktivacija/denaturacija
94 °C	1 minuta	21	pomnoževanje
50 °C	2 minuti		
72 °C	1,5 minute		
94 °C	1 minuta	29	
40 °C	2 minuti		
72 °C	1,5 minute		
72 °C	4 minute	1	podaljševanje
4 °C	∞	1	hlajenje

V primeru pozitivnega rezultata smo za določitev genotipa HPV uporabili metodo neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja.

#### 3.2.4.2 Čiščenje produkta PCR

Za izvedbo sekvenčne analize je potrebno produkte PCR najprej očistiti. Za odstranitev nevgrajenih nukleotidov, encimov, začetnih oligonukleotidov, nespecifičnih pridelkov PCR, soli in ostalih nečistoč smo uporabili komercialno dostopni komplet kemikalij QIAquick purification kit (Qiagen), po navodilu proizvajalca. V sterilno reakcijsko epruvetko smo dali 19 µl produkta PCR, kar je predstavljalo 1 volumsko enoto, in dodali 5 volumskih enot puфра PB. Celotno mešanico smo prenesli na ločevalno mikrokolono s silikatno membrano, vloženo v zbiralno epruvetko. Sledilo je centrifugiranje, 1 minuto na 13.000 rpm. V tem postopku so se nečistoče izločile skozi membrano, DNA pa je ostala vezana. Nato smo dodali 750 µl puфра PE in centrifugirali 1 minuto na 13.000 rpm. Kolono smo po centrifugiranju prenesli v novo epruvetko in ponovili centrifugiranje. Nato smo jo prenesli v novo sterilno reakcijsko epruvetko in dodali 25 µl elucijskega puфра EB. Po

minutni inkubaciji pri sobni temperaturi in minutni centrifugi na 13.000 rpm smo kolone zavrgli, očiščene produkte PCR pa shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do nadaljnje uporabe.

#### 3.2.4.3 Izvedba sekvenčne reakcije

Za izvedbo sekvenčne analize smo uporabili kemikalije iz komercialno dostopnega kompleta Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied BioSystems). Za vsak produkt PCR smo pripravili dve sekvenčni reakciji: ena je vsebovala GP5+/68+ začetne oligonukleotide, druga pa GP6+ začetne oligonukleotide.

Za vsak vzorec smo v sterilno reakcijsko epruvetko odpipetirali reakcijsko mešanico in HPV DNA. Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilu proizvajalca, kot je prikazano v preglednici 8.

Preglednica 8: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za izvedbo sekvenčne reakcije

<b>Kemikalije</b>	<b>Volumen za 1 vzorec (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
začetni oligonukleotidi	0,65
5x BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer	2
reakcijska mešanica BigDye Terminator v3.1	0,5
DNA	1,5
H <sub>2</sub> O	5,35
skupni reakcijski volumen	10

Sekvenčno reakcijo smo izvedli z aparaturo GenAmp PCR System 2700 (Applied BioSystems) po protokolu, ki je opisan v preglednici 9.

Preglednica 9: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za sekvenčno reakcijo

Temperatura	Čas trajanja	Število ponovitev	Faza podvojevanja
96 °C	1 minuta	1	aktivacija
95 °C	10 sekund	15	encimska reakcija
50 °C	5 sekund		
96 °C	75 sekund		
96 °C	10 sekund	5	
50 °C	5 sekund		
60 °C	2 sekundi		
8 °C	∞	1	hlajenje

#### 3.2.4.4 Čiščenje produktov sekvenčne reakcije

Čiščenje produktov sekvenčne reakcije smo izvedli s pomočjo kemikalij iz komercialno dostopnega kompleta DyeEx™ 20 Spin kit (Qiagen). Postopek odstranjevanja nevgrajenih dideoksinukleotidov temelji na gelski kromatografiji, kjer molekule ločujemo glede na njihovo molekulsko maso.

Najprej smo pripravili mikrokolone tako, da smo njihovo vsebino premešali na mešalu, jim odlomili spodnji del in jih vstavili v zbiralne epruvetke. Sledilo je centrifugiranje pri 3.000 rpm 3 minute. Mikrokolone smo prenesli v sterilne 1,5 ml reakcijske epruvetke, na sredino nastalega gela nanесли celoten volumen produkta sekvenčne reakcije in centrifugirali 3 minute na 3.000 rpm. Eluirani DNA smo dodali 25 µl denaturacijske raztopine Hi-Di™ Formamide (Applied BioSystems), ki oslabi vodikove vezi med nukleotidi. Vsebinsko epruvetke smo premešali na mešalu in jo prenesli v reakcijske epruvetke za PCR. Vsebinsko smo denaturirali pri 95 °C v aparaturi GenAmp PCR System 2700 (Applied BioSystems). Po denaturaciji smo reakcijske epruvetke prestavili v hladilni blok na -20 °C.

#### 3.2.4.5 Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja

Reakcijske epruvetke smo prenesli v stojala, ki smo jih vstavili v aparaturo 3500 Dx Genetic Analyzer (Applied BioSystems), ki omogoča avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja in pripadajočih elektroferogramov.

Za analizo in primerjavo dobljenega nukleotidnega zaporedja z zaporedji, ki so že v bazi podatkov, smo uporabili spletni program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Bazo podatkov predstavlja genska banka BLAST-NCBI (National Center for Biotechnology Information). Za določitev genotipa je moralo biti ujemanje nukleotidnega zaporedja vzorca z referenčnimi izolati višje od 90 %.

### 3.2.5 Določitev genotipov HPV z INNO LiPA

Vzorci, ki so bili po PCR reakciji s skupinsko-značilnimi začetnimi oligonukleotidi GP5+/6+/68 negativni, smo analizirali s testom INNO LiPA.

#### 3.2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo

Za izvajanje PCR reakcije smo uporabljali kemikalije iz kompleta INNO LiPA Genotyping Extra. Za detekcijo HPV se uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na 65 bp dolgo zaporedje znotraj ohranjene regije genoma L1 HPV. S to mešanico začetnih oligonukleotidov lahko pomnožimo 28 različnih genotipov HPV (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 82). Poleg začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na zaporedja genotipov HPV, mešanica vsebuje tudi začetne oligonukleotide, ki nalegajo na 268 bp dolgo zaporedje človeškega gena za beta globin, ki predstavlja interno kontrolo testa.

Za vsak vzorec smo v reakcijsko epruvetko odpipetirali 20 µl reakcijske mešanice in 5 µl izolirane HPV DNA. Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilu proizvajalca, kot je prikazano v preglednici 10.

Preglednica 10: Vsebina posamezne reakcijske mešanice za pomnoževanje 65 bp velikega dela gena L1 HPV za reakcijo PCR

<b>Kemikalije</b>	<b>Volumen za 1 vzorec (μl)</b>
AMP Mix	18,85
ENZ Mix	1,15
skupni volumen reakcijske mešanice (μl)	20
HPV DNA	5
skupni reakcijski volumen	25

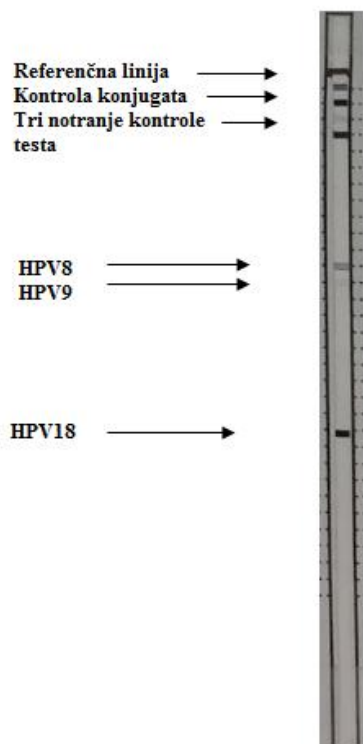
Pomnoževanje smo izvedli v aparaturi GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, ZDA). Program, ki smo ga uporabili, je opisan v preglednici 11.

Preglednica 11: Uporabljeni program temperaturnih ciklov za reakcijo PCR pomnoževanja 65 bp velikega dela gena L1 HPV

<b>Temperatura</b>	<b>Čas trajanja</b>	<b>Število ponovitev</b>	<b>Faza pomnoževanja</b>
37 °C	10 minut	1	dekontaminacija
94 °C	9 minut	1	aktivacija/denaturacija
94 °C	30 sekund	40	pomnoževanje
52 °C	45 sekund		
72 °C	45 sekund		
72 °C	5 minut	1	podaljševanje
4 °C	∞	1	hlajenje

### 3.2.5.2 Detekcija genotipov HPV z INNO LiPA

Z detekcijskim kompletom INNO LiPA smo določili posamezne genotipe HPV na aparaturi ProfiBlot™ T48 ( Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica) (Slika 7).



Slika 7: Fotografija pozitivnega rezultata pri detekciji genotipov HPV z detekcijskim kompletom INNO LiPA

### 3.2.6 Statistične metode

Prevalenco okužb v prvem in drugem krogu smo izračunali tako, da smo delili število dokazanih okužb z določenim genotipom s številom vseh testiranih žensk.

Incidenco okužb v drugem krogu smo izračunali tako, da smo delili število na novo dokazanih okužb z določenim genotipom s številom vseh testiranih žensk.

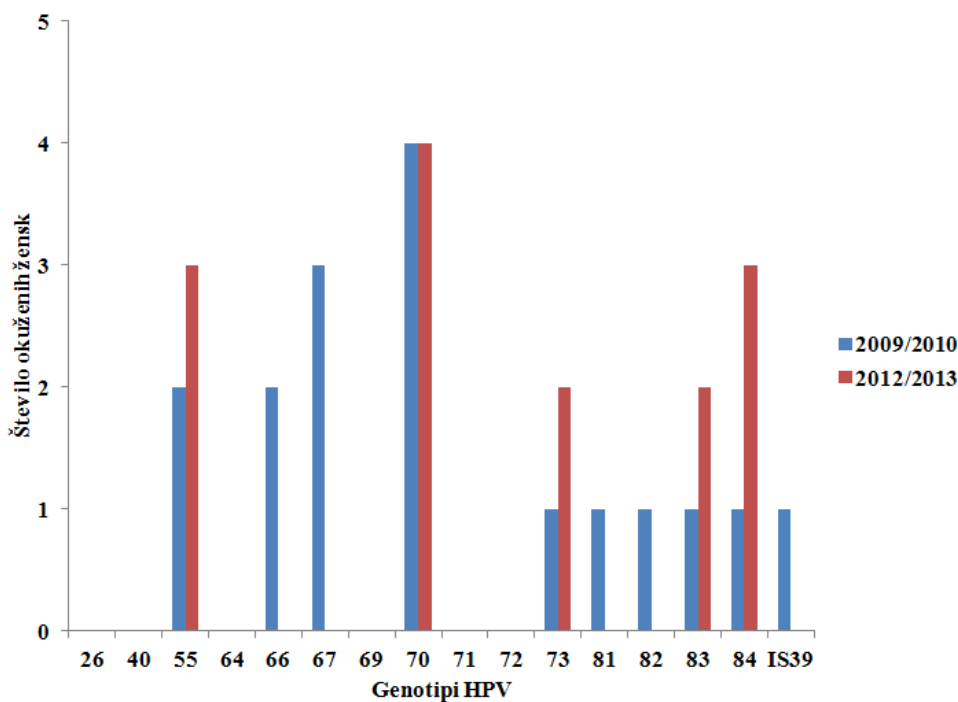
Pripadajoče 95 % intervale zaupanja (IZ) smo izračunali s pomočjo programa R verzija 3.1.3 (Free Software Foundation, Boston, MA, USA).

## 4 REZULTATI

### 4.1 HPV DNA V BRISIH MATERNIČNEGA VRATU

DNA smo določili v vseh 636 izoliranih vzorcih. Najnižja izmerjena koncentracija DNA v vzorcih je bila 0,1 µg/µl, najvišja pa 469,8 µg/µl. V vseh vzorcih smo uspešno dokazali 268 bp dolg produkt gena za človeški beta globin.

DNA 16 izbranih ne-visokorizičnih genotipov HPV smo dokazali v 14 brisih materničnega vratu od 636 vzorcev, skupno odvzetih istemu številu žensk (Slika 8, Preglednica 12). Prevalenca okužb z iskanimi genotipi HPV je znašala 2,2 % (95 % IZ: 1,3–3,8 %). Rezultate drugega kroga smo primerjali z rezultati prvega kroga raziskave, ki je potekala v letu 2009/2010 in ugotovili, da je incidenca okužb z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV znašala 2,0 % (95 % IZ: 1,1–3,5 %). Prevalenca okužbe z 16 izbranimi ne-visokorizičnimi genotipi HPV pa je v prvem krogu raziskave znašala 2,7 %; 95 % IZ: 1,6–4,3 % (17/636 vzorcev).



Slika 8: Grafični prikaz števila dokazanih okužb s posameznimi genotipi HPV v prvem in drugem krogu raziskave

Preglednica 12: Pregled števila dokazanih okužb s posameznimi genotipi HPV v prvem in drugem krogu raziskave, ter prevalence in incidence okužb s posameznimi genotipi v prvem in drugem krogu raziskave

Genotip HPV	Št. okuženih žensk v prvem krogu raziskave	Prevalenca okužb 2009/2010 (%)	Št. okuženih žensk v drugem krogu raziskave	Prevalenca okužb 2012/2013 (%)	Incidenca okužb (%)
26	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
55	2	0,3	3	0,5	0,5
64	0	0	0	0,0	0,0
66	2	0,3	0	0,0	0,0
67	3	0,5	0	0,0	0,0
69	0	0	0	0,0	0,0
70	4	0,6	4	0,6	0,5
71	0	0	0	0,0	0,0
72	0	0	0	0,0	0,0
73	1	0,2	2	0,3	0,3
81	1	0,2	0	0,0	0,0
82	1	0,2	0	0,0	0,0
83	1	0,2	2	0,3	0,3
84	1	0,2	3	0,5	0,5
IS39	1	0,2	0	0	0
<b>SKUPAJ</b>	<b>17</b>	<b>2,7</b>	<b>14</b>	<b>2,2</b>	<b>2,0</b>



## 4.2 DOKAZANI GENOTIPI HPV

### 4.2.1 Genotipi iz vrste *alfa 3*

#### **HPV72**

Okužb s tem genotipom nismo dokazali v nobenem od 636 testiranih vzorcev, tako v prvem kot tudi ne v drugem krogu (Slika 9).

#### **HPV81**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, ki je poleg HPV81 vseboval še HPV31. V drugem krogu tega genotipa nismo našli (Slika 9).

Prevalenca okužbe s tem genotipom je v prvem krogu enaka 0,2 % (95 % IZ: 0,0–1,0 %) .

#### **HPV83**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, ki je poleg HPV83 vseboval še HPV70 in 51. V drugem krogu smo genotip dokazali v dveh vzorcih (Slika 9). Eden od vzorcev je vseboval samo HPV83. V drugem vzorcu smo poleg HPV83 dokazali še HPV89. Nobena od okužb ni bila dolgotrajna.

Incidenca okužbe s tem genotipom je 0,3 % (95 % IZ: 0,0–1,2 %), prevalenca je v prvem krogu enaka 0,2 % (95 % IZ: 0,0–1,0 %), v drugem pa 0,3 % (95 % IZ: 0,0–1,2 %).

#### **HPV84**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu. Poleg HPV84 je vseboval še HPV45 in 53. V drugem krogu smo genotip dokazali v treh vzorcih (Slika 9). Eden od vzorcev je vseboval samo HPV84. V drugem vzorcu smo poleg HPV84 dokazali še HPV31 in 51, v tretjem pa smo poleg HPV84 dokazali še HPV61. Nobena od teh okužb ni dolgotrajna.

Incidenca okužbe s tem genotipom je 0,5 % (95 % IZ: 0,1–1,0 %), prevalenca je v prvem krogu enaka 0,2 % (95 % IZ: 0,0–1,0 %), v drugem pa 0,5 % (95 % IZ: 0,1–1,0 %).

#### **4.2.2 Genotipi iz vrste *alfa 5***

##### **HPV26**

Okužb s tem genotipom nismo dokazali v nobenem od 636 testiranih vzorcev, tako v prvem kot tudi ne v drugem krogu (Slika 10).

##### **HPV69**

Okužb s tem genotipom nismo dokazali v nobenem od 636 testiranih vzorcev, tako v prvem kot tudi ne v drugem krogu (Slika 10).

##### **HPV82**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, ki je vseboval samo HPV82. V drugem krogu tega genotipa nismo našli (Slika 10).

Prevalenca okužbe z genotipom je v prvem krogu enaka 0,2 % (95 % IZ: 0,0–1,0 %).

##### **HPVIS39 (82sub)**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, ki je poleg HPVIS39 vseboval še HPV6, 16 in 67. V drugem krogu tega genotipa nismo našli (Slika 10).

Prevalenca okužbe z genotipom je v prvem krogu enaka 0,2 % (95 % IZ: 0,0–1,0 %).

#### **4.2.3 Genotipi iz vrste *alfa 6***

##### **HPV66**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v dveh vzorcih. Eden od vzorcev je vseboval samo HPV66, v drugem pa smo poleg HPV66 dokazali še HPV18, 31, 39, 59, in 73. V drugem krogu tega genotipa nismo našli (Slika 11).

Prevalenca okužbe s tem genotipom je v prvem krogu enaka 0,3 % (95 % IZ: 0,0–1,2 %).

#### **4.2.4 Genotipi iz vrste *alfa 7***

##### **HPV70**

Ta genotip smo tako v prvem kot v drugem krogu dokazali v štirih vzorcih (Slika 11). V prvem krogu sta dva od vzorcev vsebovala samo HPV70, en vzorec je poleg HPV70 vseboval še HPV39 in 89, drugi pa HPV51 in 83. V drugem krogu sta prav tako dva od štirih vzorcev vsebovala samo HPV70. V enem vzorcu smo poleg HPV70 dokazali tudi HPV62, v drugem vzorcu pa smo poleg HPV70 dokazali še HPV16 in 59. Ena od teh okužb je bila dolgotrajna, saj smo pri isti ženski dokazali HPV70 v vzorcih iz prvega in drugega kroga.

Incidenca okužbe s tem genotipom je 0,5 % (95 % IZ: 0,1–1,0 %), prevalenca je tako v prvem kot v drugem krogu enaka 0,6 % (95 % IZ: 0,2–1,7 %).

#### **4.2.5 Genotipi iz vrste *alfa 8***

##### **HPV40**

Okužb s tem genotipom nismo dokazali v nobenem od 636 testiranih vzorcev, tako v prvem kot tudi ne v drugem krogu (Slika 11).

#### **4.2.6 Genotipi iz vrste *alfa 9***

##### **HPV67**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v treh vzorcih (Slika 11). Dva od vzorcev sta vsebovala samo HPV67, eden pa je poleg HPV67 vseboval še HPV6, 16 in IS39. V drugem krogu tega genotipa nismo našli.

Prevalenca okužbe s tem genotipom je v prvem krogu enaka 0,5 % (95 % IZ: 0,1–1,0 %).

#### **4.2.7 Genotipi iz vrste *alfa 10***

##### **HPV55**

Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v dveh vzorcih. Eden od vzorcev je poleg HPV55 vseboval še HPV53, drugi pa HPV16. V drugem krogu smo ta genotip dokazali v treh vzorcih (Slika 12). Eden od vzorcev je poleg HPV55 vseboval še HPV62, v drugem vzorcu smo dokazali še HPV13, 32, 42 in 74, v tretjem vzorcu pa HPV16 in 59. Nobena od teh okužb ni dolgotrajna.

Incidenca okužbe s tem genotipom je 0,5 % (95 % IZ: 0,1–1,0 %), prevalenca je v prvem krogu enaka 0,3 % (95 % IZ: 0,0–1,2 %), v drugem pa 0,5 % (95 % IZ: 0,1–1,0 %).

#### **4.2.8 Genotipi iz vrste *alfa 11***

##### **HPV64**

Okužb s tem genotipom nismo dokazali v nobenem od 636 testiranih vzorcev, tako v prvem kot tudi ne v drugem krogu (Slika 12).

##### **HPV73**

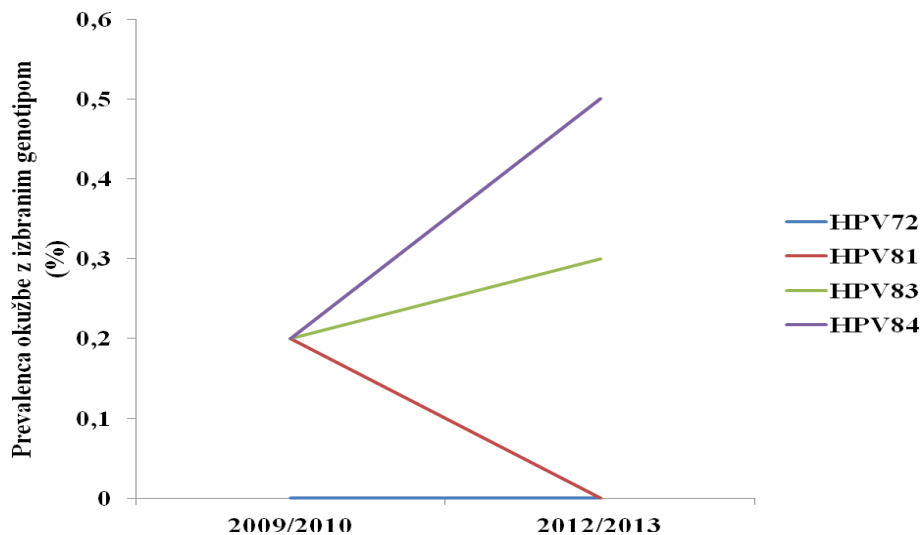
Ta genotip smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, ki je poleg HPV73 vseboval še HPV18, 31, 39, 59 in 66. V drugem krogu smo ta genotip dokazali v dveh vzorcih (Slika 12). Eden od vzorcev je vseboval samo HPV73, drugi vzorec pa je poleg HPV73 vseboval še HPV89. Nobena od teh okužb ni dolgotrajna.

Incidenca okužbe s tem genotipom je 0,3 % (95 % IZ: 0,0–1,2 %), prevalenca je v prvem krogu enaka 0,2 % (95 % IZ: 0,0–1,0 %), v drugem pa 0,3 % (95 % IZ: 0,0–1,2 %).

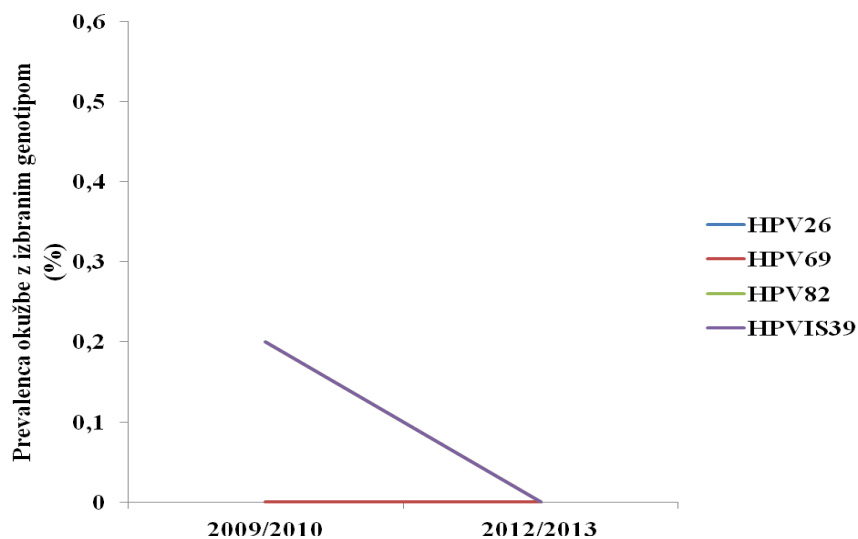
#### 4.2.9 Genotipi iz vrste *alfa 14*

##### HPV71

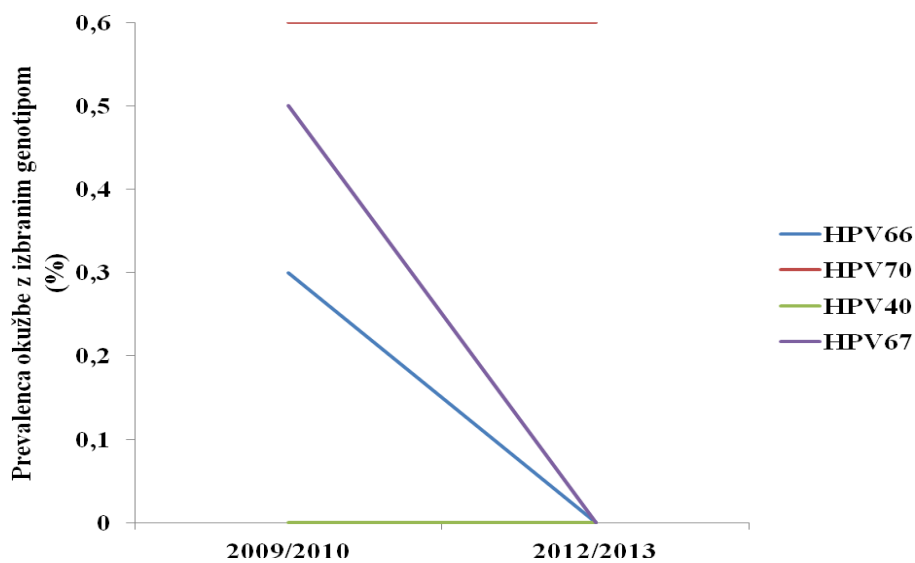
Okužb s tem genotipom nismo dokazali v nobenem od 636 testiranih vzorcev, tako v prvem kot tudi ne v drugem krogu (Slika 12).



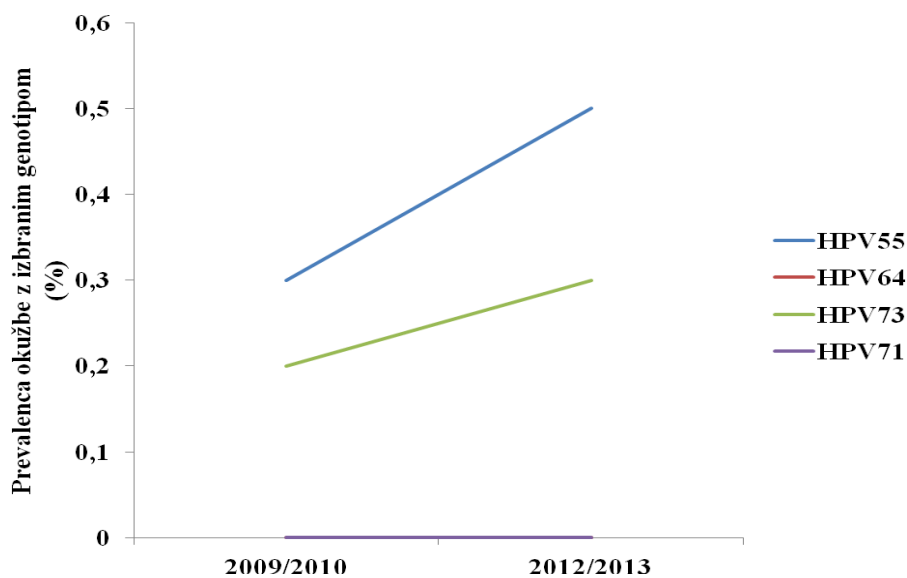
Slika 9: Grafični prikaz prevalence okužb z izbranimi genotipi HPV iz vrste *alfa 3*



Slika 10: Grafični prikaz prevalence okužb z izbranimi genotipi HPV iz vrste *alfa 5*



Slika 11: Grafični prikaz prevalenca okužbe z izbranimi genotipi HPV iz vrste *alfa* 6, 7, 8 in 9



Slika 12: Grafični prikaz prevalenca okužbe z izbranimi genotipi HPV iz vrste *alfa* 10, 11 in 14

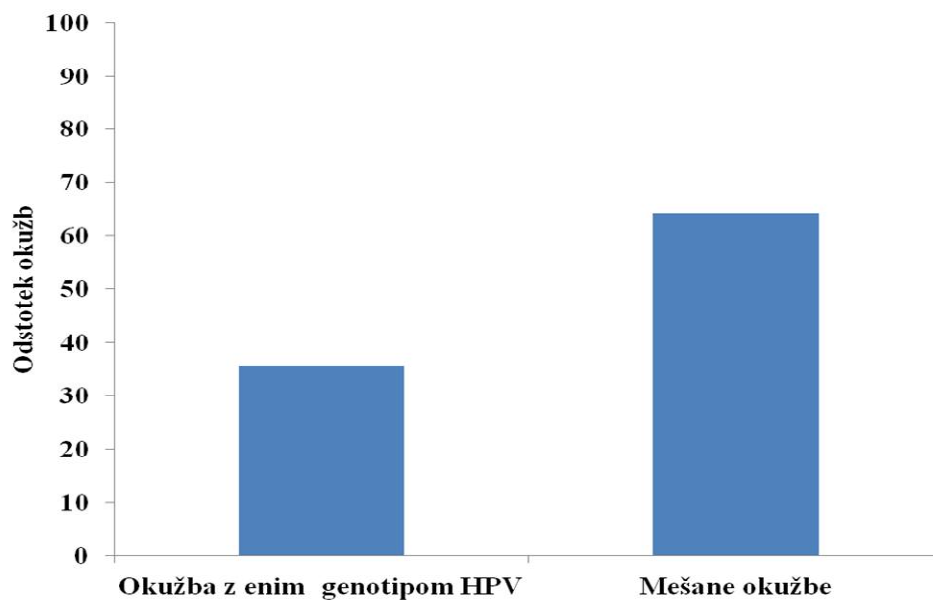
#### 4.3 MEŠANE OKUŽBE IN DOLGOTRAJNOST OKUŽB

V raziskavi smo okužbo z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV dokazali v 14 od 636 testiranih brisov materničnega vratu. Od tega smo pri petih ženskah našli samo en genotip, pri devetih ženskah pa smo dokazali sočasno okužbo z več genotipi (dva do pet genotipov) (Preglednica 13, Slika 13).

Dolgotrajna okužba z izbranimi ne-visokorizičnimi genotipi HPV je bila v naši raziskavi redka, saj smo samo pri eni ženski dokazali dolgotrajno okužbo, ki jo je povzročal HPV70.

Preglednica 13: Pregled žensk pri katerih smo dokazali okužbo z iskanimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV

Šifra preiskovanke	Dokazani genotipi HPV
6350	HPV55 in 62
9004	HPV55, 16 in 59
19006	HPV55, 13, 32, 42 in 74
5062	HPV70
21034	HPV70
11011	HPV70 in 62
10102	HPV70, 16 in 59
6163	HPV73
19055	HPV73 in 89
11105	HPV83
1424	HPV83 in 89
17073	HPV84
19010	HPV 84 in 61
9099	HPV84, 31 in 51



Slika 13: Grafični prikaz odstotka okužb z enim od iskanih 16 genotipov HPV in odstotka mešanih okužb



## 5 RAZPRAVA

### 5.1 PRIMERJAVA PREVALENC IZBRANIH 16 NE-VISOKORIZIČNIH GENOTIPOV HPV

Izbranih 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV smo dokazali v prvem krogu v 2,7 %, v drugem krogu pa v 2,2 % testiranih vzorcev, kar nakazuje na nizko prevalenco okužbe s 16 izbranimi ne-visokorizičnimi genotipi HPV. Incidenca okužb z izbranimi genotipi pa je znašala 2,0 %. Tako incidenca kot prevalenca izbranih 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV sta pričakovano nizki. S tem smo potrdili zastavljeno hipotezo.

Rezultate smo primerjali z rezultati prvega kroga presečne raziskave, ki je bila izvedena v Sloveniji v letu 2009/2010 (Učakar in sod., 2014), rezultati presejalnega testiranja, ki so ga med letoma 2011 in 2012 izvedli na Tajskem (testirali so 5.906 žensk, starih med 20 in 70 let) (Kantathavorn in sod., 2015), rezultati presejalnega testiranja, ki so ga med letoma 1993 in 2003 izvedli v 11 izbranih državah: Nigerija, Indija, Vietnam, Tajska, Koreja, Kolumbija, Argentina, Čile, Nizozemska, Italija in Španija (testirali so 15.613 žensk, starih med 15 in 74 let) (Clifford in sod., 2005), rezultati presejalnega testiranja, ki so ga med letoma 2008 in 2009 izvedli v Kanadi (testirali so 5.711 žensk starih med 14 in 69 let) (Jiang in sod., 2011), rezultati presejalnega testiranja, ki so ga leta 2008 izvedli v Italiji (testirali so 299 žensk, starih med 18 in 63 let) (Ripabelli in sod., 2010) in rezultati presejalnega testiranja, ki so ga med letoma 2005 in 2008 izvedli v Avstraliji (testirali so 2620 žensk, starih med 18 in 60 let) (Tabrizi in sod., 2014).

Pri primerjavi rezultatov z omenjenimi študijami moramo upoštevati, da raziskave niso bile izvedene v enakih pogojih. Razlikujejo se po starostnih skupinah žensk, ki so sodelovale v raziskavi, v metodologiji in časovnih obdobjih, v katerih so bile izvedene. Kljub temu lahko naredimo določene vzporednice z našo raziskavo.

Najpogosteje smo dokazali HPV70 (4/636; 0,6 %), kar se ne ujema z našo hipotezo, saj smo pričakovali, da bomo najpogosteje dokazali HPV55 (3/636; 0,5 %). V raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so izmed izbranih 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV največkrat dokazali HPV81 (Clifford in sod., 2005), medtem ko je bil na Tajskem najpogosteje

dokazan ne-visokorizični genotip HPV72 (Kantathavorn in sod., 2015), v Kanadi, Italiji in Avstraliji pa HPV66 (Jiang in sod., 2011; Ripabelli in sod., 2010; Tabrizi in sod., 2014)

### **5.1.1 Genotipi iz vrste *alfa 3***

#### **HPV72**

HPV72 nismo dokazali v nobenem vzorcu, tako v prvem kot v drugem krogu. Dokazana prevalenca HPV72 je na Tajskem 2,5 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,2 % (Clifford in sod., 2005), v Kanadi so dokazali 0,7 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji pa 0,4 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014). Podobno kot v naši študiji, v Italiji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010; Učakar in sod., 2014).

#### **HPV81**

HPV81 smo v prvem krogu dokazali samo v enem vzorcu, v drugem krogu pa tega genotipa nismo našli, prevalenca je zato v prvem krogu 0,2 %. Dokazana prevalenca HPV81 je na Tajskem 0,4 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,6 % (Clifford in sod., 2005), v Kanadi 0,7 % (Jiang in sod., 2011), v Italiji 1,0 % (Ripabelli in sod., 2010), v Avstraliji pa so dokazali 1,7 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014).

#### **HPV83**

HPV83 smo v prvem krogu dokazali v vzorcu ene ženske, v drugem krogu pa v vzorcih dveh drugih žensk. Prevalenca v prvem krogu znaša 0,2 %, v drugem pa je rahlo višja 0,3 %. Dokazana prevalenca HPV83 je na Tajskem in v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, 0,1 % (Kantathavorn in sod., 2015; Clifford in sod., 2005), v Kanadi so dokazali 0,7 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji pa 1,3 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014). V Italiji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010).

## **HPV84**

HPV84 smo v prvem krogu dokazali v vzorcu ene ženske, v drugem krogu pa v vzorcih treh drugih žensk. Prevalenca se je v treh letih skoraj trikrat povečala iz 0,2 % na 0,5 %. Dokazana prevalenca HPV84 je na Tajskem 1,1 % (Kantathavorn in sod., 2015), v Kanadi so dokazali 0,4 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji 2,8 % (Tabrizi in sod., 2014), v Italiji pa 3,0 % pogostost okužbe s tem genotipom (Ripabelli in sod., 2010).

### **5.1.2 Genotipi iz vrste *alfa 5***

## **HPV26**

HPV26 nismo dokazali v nobenem vzorcu, tako v prvem kot v drugem krogu. Dokazana prevalenca HPV26 je v Kanadi 0,07 % (Jiang in sod., 2011), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah in v Avstraliji, so dokazali 0,04 % (Clifford in sod., 2005; Tabrizi in sod., 2014), na Tajskem pa so dokazali še nižjo, 0,02 % pogostost okužbe s tem genotipom (Kantathavorn in sod., 2015). V Italiji tega genotipa tako kot pri nas niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010; Učakar in sod., 2014).

## **HPV69**

HPV69 sicer v vzorcih, vključenih v drugi del raziskave nismo dokazali, vendar so v raziskavi, ki je potekala v Sloveniji v letu 2009/2010 (celoten prvi krog raziskave), okužbo dokazali v enem od 1.000 testiranih vzorcev, kar pomeni 0,1 % prevalenco (Učakar in sod., 2014). Dokazana prevalenca HPV69 je na Tajskem 0,02 % (Kantathavorn in sod., 2015), v Kanadi so dokazali 0,3 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji pa 0,04 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014). V Italiji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010).

## **HPV82**

HPV82 smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, v drugem krogu pa tega genotipa nismo našli, prevalenca je zato v prvem krogu znašala 0,2 %. Dokazana prevalenca HPV82 je v Kanadi 0,2 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji 0,7 % (Tabrizi in sod., 2014), v Italiji

0,3 % (Ripabelli in sod., 2010), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, pa so dokazali 0,07 % pogostost okužbe s tem genotipom (Clifford in sod., 2005).

### **HPVIS39 (82sub)**

HPVIS39 smo v prvem krogu dokazali v enem vzorcu, v drugem krogu pa tega genotipa nismo našli, prevalenca je zato v prvem krogu znašala 0,2 %. Dokazana prevalenca HPVIS39 je na Tajskem 0,1 % (Kantathavorn in sod., 2015), v Avstraliji pa 0,3 % (Tabrizi in sod., 2014). V Italiji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010).

## **5.1.3 Genotipi iz vrste *alfa 6***

### **HPV66**

HPV66 smo v prvem krogu dokazali v dveh vzorcih, v drugem krogu pa tega genotipa nismo našli, prevalenca je zato v prvem krogu znašala 0,3 %. Dokazana prevalenca HPV66 je na Tajskem 0,8 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,4 % (Clifford in sod., 2005), v Kanadi 1,9 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji pa 2,5 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014). V Italiji je bila okužba s tem genotipom najvišja in je znašala 4,3 % (Ripabelli in sod., 2010).

## **5.1.4 Genotipi iz vrste *alfa 7***

### **HPV70**

HPV70 smo v prvem in v drugem krogu dokazali v štirih vzorcih. Ena od teh okužb je bila dolgotrajna, saj smo jo našli v brisu materničnega vratu odvzetem isti ženski tako v prvem kot v drugem krogu raziskave. Prevalenca okužbe s tem genotipom je 0,6 %. Dokazana prevalenca HPV70 je na Tajskem 1,0 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,4 % (Clifford in sod., 2005), v Kanadi so dokazali 1,1 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji so dokazali 1,8 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014), medtem ko v Italiji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010).

### **5.1.5 Genotipi iz vrste *alfa 8***

#### **HPV40**

HPV40 sicer v vzorcih, vključenih v drugi del raziskave, nismo dokazali, vendar so v raziskavi, ki je potekala v Sloveniji v letu 2009/2010 (celoten prvi krog raziskave), okužbo dokazali v dveh od 1.000 testiranih vzorcev, kar pomeni 0,2 % prevalenco okužb s tem genotipom (Učakar in sod., 2014). Dokazana prevalenca HPV40 je na Tajskem 0,1 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,3 % (Clifford in sod., 2005), v Kanadi so dokazali 0,5 % (Jiang in sod., 2011), v Italiji in Avstraliji pa rahlo višjo, 0,7 % pogostost okužb s tem genotipom (Ripabelli in sod., 2010; Tabrizi in sod., 2014).

### **5.1.6 Genotipi iz vrste *alfa 9***

#### **HPV67**

HPV67 smo v prvem krogu dokazali v treh vzorcih, v drugem krogu pa tega genotipa nismo našli, prevalenca je zato v prvem krogu znaša 0,5 %. Dokazana prevalenca HPV67 je na Tajskem 0,1 % (Kantathavorn in sod., 2015), v Kanadi so dokazali 1,3 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji 0,9 % pogostost okužb s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014), medtem ko v Italiji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010).

### **5.1.7 Genotipi iz vrste *alfa 10***

#### **HPV55**

HPV55 smo v prvem krogu dokazali v vzorcih dveh žensk, v drugem krogu pa v vzorcih treh drugih žensk. Vidimo lahko, da se je prevalenca v treh letih povečala iz 0,3 % na 0,5 %. Dokazana prevalenca HPV55 je na Tajskem 0,4 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,06 % (Clifford in sod., 2005), v Italiji so dokazali 0,7 % (Ripabelli in sod., 2010), v Avstraliji pa 1,5 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014).

### **5.1.8 Genotipi iz vrste *alfa 11***

#### **HPV64**

HPV64 sicer v vzorcih, vključenih v drugi del raziskave, nismo dokazali, vendar so v raziskavi, ki je potekala v Sloveniji v letu 2009/2010 (celoten prvi krog raziskave), okužbo dokazali v osmih od 1.000 testiranih vzorcev, kar pomeni 0,8 % prevalenco tega genotipa (Učakar in sod., 2014). Dokazana prevalenca HPV64 je na Tajskem 0,03 % (Kantathavorn in sod., 2015), medtem ko v Italiji in Avstraliji tega genotipa niso dokazali (Ripabelli in sod., 2010; Tabrizi in sod., 2014).

#### **HPV73**

HPV73 smo v prvem krogu dokazali v vzorcu ene ženske, v drugem krogu pa v vzorcih dveh drugih žensk. Prevalenca se je v treh letih povečala iz 0,2 % na 0,3 %. Dokazana prevalenca HPV73 je na Tajskem 0,2 % (Kantathavorn in sod., 2015), v Kanadi so dokazali 0,5 % (Jiang in sod., 2011), v Italiji 3,3 % (Ripabelli in sod., 2010), v Avstraliji pa 2,1 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014).

### **5.1.9 Genotipi iz vrste *alfa 14***

#### **HPV71**

HPV71 sicer v vzorcih, vključenih v drugi del raziskave, nismo dokazali, vendar so v raziskavi, ki je potekala v Sloveniji v letu 2009/2010 (celoten prvi krog raziskave), okužbo dokazali v enem od 1.000 testiranih vzorcev, kar pomeni 0,1 % prevalenco okužbe s tem genotipom (Učakar in sod., 2014). Dokazana prevalenca HPV71 je na Tajskem 1,0 % (Kantathavorn in sod., 2015), v raziskavi, ki je potekala v 11 državah, so dokazali 0,01 % (Clifford in sod., 2005), v Kanadi 0,02 % (Jiang in sod., 2011), v Avstraliji pa 0,9 % pogostost okužbe s tem genotipom (Tabrizi in sod., 2014).

## 5.2 MEŠANE OKUŽBE IN DOLGOTRAJNOST OKUŽB

V raziskavi smo dokazali, da je okužba s genotipi HPV največkrat mešana, saj je bilo kar 64,3 % okužb mešanih, medtem ko smo v 35,7 % okužb dokazali prisotnost samo enega izmed 16 iskanih ne-visokorizičnih genotipov HPV.

V raziskavi smo ugotovili, da je okužba s 16 izbranimi ne-visokorizičnimi genotipi HPV največkrat kratkotrajna, saj smo izmed 636 preiskovank samo pri eni dokazali okužbo z istim genotipom v obeh krogih raziskave. Od 14 okužb z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV, ki smo jih dokazali, predstavljajo dolgotrajne okužbe 7,1 % vseh okužb.

## 6 SKLEPI

- Glede na dobljene rezultate za izbranih 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV lahko potrdimo hipotezo o nizki incidenci, saj je incidenca okužbe za vse preiskovane genotipe HPV variirala med 0,0 in 0,5 %.
- Prevalenca okužb s posameznimi izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV je v Sloveniji zelo nizka in znaša od 0,0 do 0,6 %.
- Izmed izbranih 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV, je pri slovenskih ženskah najpogostejša okužba s HPV 70.
- Več kot polovica žensk pri katerih smo dokazali okužbo z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV, je bila okužena z več kot enim genotipom HPV.
- Okužbe z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV so pri slovenskih ženskah večinoma prehodne, dolgotrajnih je manj kot 10 %.
- Prevalenca okužb z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV v Sloveniji je primerljiva s podobnimi študijami iz drugih držav.



## 7 POVZETEK

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti incidenco in prevalenco okužb z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV, ugotoviti delež dolgotrajnih okužb ter primerjati dobljene podatke s podatki iz prvega kroga raziskave in z ostalimi podobnimi študijami.

V magistrski nalogi smo želeli z različnimi metodami za dokazovanje HPV DNA določiti okužbo s HPV na 636 vzorcih brisov materničnega vratu. Za določitev izbranih 16 genotipov HPV smo uporabili različne genotipizacijske metode. Z uporabo testa Linear Array smo dokazali izbrane genotipe v 14/636 (2,2 %) vzorcih materničnega vratu.

Iz pridobljenih podatkov smo izračunali incidenco in prevalenco okužb z izbranimi 16 genotipi HPV. V skladu z našo hipotezo, sta bili tako incidenca kot prevalenca okužbe z izbranimi 16 ne-visokorizičnimi genotipi HPV nizki.

Glede na primerjavo s podobnimi študijami, ki so jih izvedli v drugih državah, smo ugotovili, da sta incidenca in prevalenca izbranih 16 ne-visokorizičnih genotipov HPV v Sloveniji primerljivi.

Dolgotrajnost okužb je nizka, saj smo dolgotrajno okužbo dokazali le v enem od 14 vzorcev, ki so bili pozitivni na izbrane genotipe HPV.

## 8 VIRI

- Abby J. Vogel M.S. 2006. Common thickener may block HPV infections. Rockville Pike, National Institutes of Health: 1 str.  
<http://nihprod.cit.nih.gov/researchmatters/august2006/08112006hpv.htm>
- Bergmans H. W., Gaastra W. 1988. Dot-Blot hybridization method. *Methods in Molecular Biology*, 4: 385–390
- Bzhalava D., Eklund C., Dillner J. 2015. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476: 341–344
- Carcillo J. A., Parise R. A., Romkes-Sparks M. 1994. Comparison of the enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay to the <sup>32</sup>P-labeled PCR/Southern blotting technique in quantitative analysis of human and rat mRNA. *Genome Research*, 3: 292–297
- Clifford G. M., Gallus S., Herrero R., Muñoz N., Snijders P. J. F., Vaccarella S., Anh P. T. H., Ferreccio C., Hieu N. T., Matos E., Molano M., Rajkumar R., Ronco G., de Sanjosé S., Shin H. R., Sukvirach S., Thomas J. O., Tunsakul S., Meijer C. J. L. M., Franceschi S., IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. 2005. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 366: 991–998
- Cubie A. H. 2013. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 445: 21–34
- De Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17–27
- Eder K. 2007. Humani virusi papiloma in rak materničnega vratu. V: Izzivi družinske medicine: zbornik seminarjev študentov Medicinske fakultete Univerze v Mariboru 4. letnik 2007/2008. Babič M., Colarič D., Eder K., Elbl T., Kompolšek T., Murko

- A., Špilak M. (ur.). Maribor, Združenje zdravnikov družinske medicine – SZD: 187–193
- Fraga D., Meulia T., Fenster S. 2008. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, Unit 10.3: 10.3.1–10.3.34
- Ivanuš U., Primic Žakelj M. 2014. Pomen izvida testa v kolposkopski ambulanti. V: Zbornik: Obnovitveni kolposkopski tečaj s poudarkom na praktičnih veščinah. Marec 2014. Smrkolj Š. (ur.). Ljubljana, Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD, Onkološki inštitut: 48–69
- Jiang Y., Brassard P., Severini A., Goleski V., Santos M., Leamon A., Chatwood S., Lys C., Johnson G., Wong T., Kotaska A., Kandola K., Mao Y. 2011. Type-specific prevalence of human papillomavirus infection among women in the Northwest Territories, Canada. *Journal of Infection and Public Health*, 4: 219–227
- Kantathavorn N., Mahidol C., Sritana N., Sricharunrat T., Phoolcharoen N., Auewarakul C., Teerayathanakul N., Taepisitpong C., Saeloo S., Sornsamdang G., Udomchaiprasertkul W., Krongthong W., Arnamwong A. 2015. Genotypic distribution of human papillomavirus (HPV) and cervical cytology findings in 5906 Thai women undergoing cervical cancer screening programs. *Infectious Agents and Cancer*, 10: 7, doi: 10.1186/s13027-015-0001-5: 9 str.
- Kocjan B. J., Poljak M. 2011. Papilomavirusi. V: *Medicinska virologija*. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 41–60
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualised Experiments*, 62: 3791–3923
- Ma Y., Madupu R., Karaoz R., Nossa C. W., Yang L., Yooseph S., Yachinski P. S., Brodie W. L., Nelson K. E., Pei Z. 2014. Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. *Journal of Virology*, 88: 4786–4797

- Mukai Y. 1996. *In situ* hybridization. V: Plant chromosomes: laboratory methods. Fukui K., Nakayama S. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 155–167
- Poljak M., Kocjan B. J. 2010. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Reviews*, 8, 10: 1139–1162
- Poljak M., Kocjan B., Oštrbenk A. 2014. Okužbe s HPV. V: Zbornik: Obnovitveni kolposkopski tečaj s poudarkom na praktičnih veščinah. Marec 2014. Smrkolj Š. (ur.). Ljubljana, Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD, Onkološki inštitut: 7–26
- Poljak M., Kocjan B. J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B. 2005. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*, 2: 60–72
- Prober J. M., Trainor G. L., Dam R. J., Hobbs F. W., Robertson C. W., Zagursky R. J., Cocuzza A. J., Jensen M. A., Baumeister K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238, 4825: 336–341
- Rasmussen H. B. 2012. Restriction fragment length polymorphism analysis of pcr-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. V: Gel electrophoresis – principles and basics. Magdeldin S. (ed.). Rijeka, InTech: 315–334
- Ripabelli G., Grasso G. M., Del Riccio I., Tamburro M., Sammarco M. L. 2010. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, Central Italy. *Cancer Epidemiology*, 34: 162–167
- Schochetman G., Chin-Yih O., Jones K. W. 1988. Polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*, 158: 1154–1157
- Smith L. 2015. Human papillomavirus (HPV): causes, symptoms and treatments. East Sussex, Medical News Today: 3 str.  
<http://www.medicalnewstoday.com/articles/246670.php> (junij, 2015)

Tabrizi S. N., Brotherton J. M. L., Stevens M. P., Condon J. R., McIntyre P., Smith D., Garland S. M. 2014. HPV genotype prevalence in Australian women undergoing routine cervical screening by cytology status prior to implementation of an HPV vaccination program. *Journal of Clinical Virology*, 60: 250–256

Tsai C. J., Cseke L. J. 2004. Southern blot hybridization. V: *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. Cseke L. J., Kaufman P. B., Podila G. K., Tsai C. J. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 85–103

Učakar V., Poljak M., Klavs I. 2012. Pre-vaccination prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in slovenian women: A cervical cancer screening based study. *Vaccine*, 30: 116–120

Učakar V., Poljak M., Oštrbenk A., Klavs I. 2014. Pre-vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus types among 1000 slovenian women in cervical cancer screening. *Journal of Medical Virology*, 86: 1772–1779

Zekan J., Sirotkovic-Skerlev M., Skerlev M. 2011. Oncogenic aspects of HPV infections of the female genital tract. V: *Biochemistry, genetics and molecular biology »DNA replication-current advances«*. Seligmann H. (ed.). Rijeka, InTech: 596–612

## **ZAHVALA**

Zahvalila bi se mentorju prof. dr. Mariu Poljak za usmerjanje in strokovne nasvete, ki so mi olajšali pot do magistrskega dela, še posebej bi se rada zahvalila svoji delovni mentorici Anji Oštrbenk za potrpežljivost in pomoč, ki mi jo je nudila tekom praktičnega dela in pisanjem same naloge.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Katji Seme in prof. dr. Srečku Koren, ter drugim zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki so mi omogočili opravljanje raziskave v njihovem zavodu za namene praktičnega dela magistrske naloge.