

# Kvalitativna detekcija humanih papiloma virusa (HPV) kombinacijom metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) i reverzne hibridizacije

---

Kegalj, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:201232>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske**  
**dijagnostike**

**Karla Kegalj**

**KVALITATIVNA DETEKCIJA**  
**HUMANIH PAPILOMA VIRUSA (HPV)**  
**KOMBINACIJOM METODA LANČANE**  
**REAKCIJE POLIMERAZOM (PCR) I**  
**REVERZNE HIBRIDIZACIJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Karla Kegalj**

**KVALITATIVNA DETEKCIJA  
HUMANIH PAPILOMA VIRUSA (HPV)  
KOMBINACIJOM METODA LANČANE  
REAKCIJE POLIMERAZOM (PCR) I  
REVERZNE HIBRIDIZACIJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je napravljen u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva Odjela laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc. Saška Marczy

Rad ima 31 radni list, 6 tablica i 10 slika

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Saški Marczi za savjete i smjernice prilikom izrade ovog završnog rada, za stručnu pomoć, strpljenje i vrijeme te za odgovore na moja brojna pitanja.

Velika hvala mojoj obitelji i prijateljima na pomoći i velikoj potpori tijekom mog školovanja.

## SADRŽAJ

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                                                   | <b>1</b>  |
| 1.1. Humani papiloma virus.....                                                       | 1         |
| 1.2. Genom HPV-a.....                                                                 | 2         |
| 1.3. Značaj detekcije i genotipizacije HPV-a.....                                     | 3         |
| 1.4. Metode molekularne dijagnostike za detekciju infekcije HPV-om.....               | 4         |
| 1.5. Detekcija HPV-a metodom PCR i reverznom hibridizacijom.....                      | 6         |
| <b>2. CILJ RADA.....</b>                                                              | <b>8</b>  |
| <b>3. ISPITANICI I METODE.....</b>                                                    | <b>9</b>  |
| 3.1. Ustroj istraživanja.....                                                         | 9         |
| 3.2. Ispitanici.....                                                                  | 9         |
| 3.3. Uzorkovanje brisa vrata maternice.....                                           | 9         |
| 3.4. Metode.....                                                                      | 10        |
| 3.4.1. Izolacija DNA iz stanica epitela vrata maternice.....                          | 10        |
| 3.4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....                                        | 12        |
| 3.4.3. Agarozna gel elektroforeza.....                                                | 13        |
| 3.4.4. Reverzna hibridizacija.....                                                    | 14        |
| 3.4.5. Interpretacija rezultata.....                                                  | 16        |
| 3.5. Statistička obrada podataka.....                                                 | 18        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                              | <b>19</b> |
| 4.1. Raspodjela visokorizičnih i niskorizičnih tipova HPV-a u skupini ispitanika..... | 19        |
| 4.2. Prikaz rezultata HPV testiranja kroz tri godine.....                             | 21        |
| 4.3. Rezultati detekcije HPV-a s obzirom na uputne dijagnoze.....                     | 22        |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>                                                               | <b>25</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>6. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>7. LITERATURA.....</b> | <b>28</b> |
| <b>8. SAŽETAK.....</b>    | <b>30</b> |
| <b>9. SUMMARY.....</b>    | <b>31</b> |

## Popis kratica

1. AGCUS - atipične žljezdane stanice neodređenog značenja (engl. *atypical glandular cells of undetermined significance*)
2. ASCUS - atipične skvamozne stanice neodređenog značenja (engl. *atypical squamous cells of undetermined significance*)
3. CIN - cervikalna intraepitelna neoplazija
4. DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
5. HPV – humani papiloma virus (engl. *human papillomavirus*)
6. MALDI-TOF spektrometra masa (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*)
7. PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
8. RNA - Ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
9. SIL - skvamozna intraepitelna lezija (engl. *squamous intraepithelial lesion*)



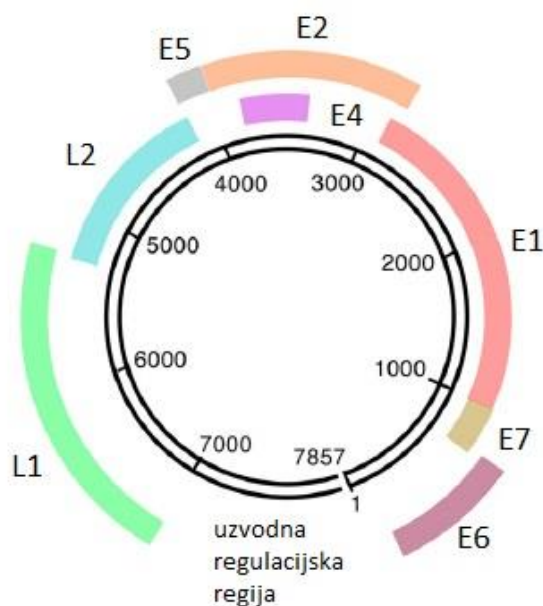
## 1. UVOD

### 1.1. Humani papiloma virus

Humani papiloma virus (HPV) spada u porodicu Papillomaviridae. Virusi porodice Papillomaviridae relativno su mali DNA virusi, nemaju lipidnu ovojnicu i promjera su od 45 do 55 nm. Zbog toga što ne sadrže lipidnu ovojnicu otporni su na djelovanje 70 % etanola, etera, kloroforma i drugih otapala. Humani papiloma virus (HPV) uzrokuje pojavu anogenitalnih bradavica ili čak neoplaziju vrata maternice. Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) je preinvazivna promjena za koju se danas zna da, iako se ne liječi, većinom se spontano povlači. CIN promjene se tijekom određenog vremena mogu razviti u karcinom *in situ*. Anogenitalne bradavice najčešće su prisutne u spolno aktivnih osoba i one mogu spontano nestati (1). Veliki problem u rješavanju infekcije HPV-om predstavlja činjenica da ne postoji specifični lijek. Od 2006. godine na tržištu su dostupna cjepiva protiv onkogenih tipova humanog papiloma virusa. Infekcija u organizam čovjeka ulazi kroz oštećene dijelove kože i sluznice, a neki se genotipovi HPV-a šire spolnim odnosom. Infekcije spolnog sustava humanim papiloma virusom danas se ubrajaju u spolno prenosive bolesti (2). Teži oblici infekcije HPV-om osim anogenitalnog su i karcinom pločastog epitela usne šupljine i orofaringealni karcinom koji su uzrokovani visokorizičnim tipom HPV-a. HPV virus uzrokuje i Heckovu bolest (fokalna epitelijalna hiperplazija) te se povezuje i s leukoplakijom (promjene mukoznih membrana sa zloćudnim potencijalom) (3). Analizom genoma otkriveno je više od 150 genotipova: onih koji mogu inficirati mukožu (oko 40 genotipova) i onih koji inficiraju kožu (oko 110 genotipova). Po svom onkogenom potencijalu mogu se klasificirati u dvije skupine. Prvu skupinu čine genotipovi niskog rizika (engl. *low risk HPV*), a drugu genotipovi visokog rizika (engl. *high risk HPV*). Najčešći niskorizični genotipovi HPV-a su 6 i 11. Skoro sve vrste benignih lezija, u koje se ubrajaju kondilomi i laringealni papilomi, uzrokovane su s ova dva tipa niskorizičnog HPV-a. Tipovi 16 i 18 su najčešći tipovi visokorizičnog HPV-a i uzrokuju 70 % karcinoma maternice. Izvješća iz različitih krajeva svijeta pokazuju kako je HPV 16 najučestaliji tip dok pojava ostalih učestalih genotipova HPV-a ovisi o geografskom položaju, demografskim kretanjima, kliničko-patološkim čimbenicima, a ovisi i o metodama detekcije (4). Genotipizacija HPV-a značajna je za otkrivanje visokorizičnih genotipova koji uzrokuju rak vrata maternice. Faktori koji povećavaju rizik infekcije od visokorizičnog tipa HPV-a su pušenje, koje uzrokuje orofaringealni karcinom, zatim oslabljeni imunitet, dugo korištenje oralnih kontraceptiva, loša oralna higijena i prekomjerna konzumacija alkohola (5).

## 1.2. Genom HPV-a

Genom HPV-a je kružna dvolančana DNA veličine oko 8000 pb dobro poznate strukture i organizacije gena. Dijeli se na tri područja: područje L (engl. *late*) koje kodira sintezu strukturnih proteina, područje E (engl. *early*) sa zapisima odgovornim za onkogeni učinak stanice i umnožavanje virusa te područje R (engl. *regulatory*) sa zapisima za regulacijske proteine koji upravljaju procesima umnožavanja virusa. Većina genotipova HPV-a ima šest različitih ranih gena: *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* i *E7*, koji kodiraju proteine potrebne za umnožavanje virusa (replikaciju i transkripciju virusne DNA). Međutim, kod genotipova visokog rizika, rani geni sudjeluju i u transformaciji zaraženih stanica. Geni *L1* i *L2* kodiraju strukturne proteine kapside virusnih čestica. DNA humanog papiloma virusa u početnim je stadijima cervikalnih lezija u stanici prisutna u ekstrakromosomskom, episomalnom, obliku. Za razliku od niskorizičnih genotipova, genom visokorizičnih tipova HPV-a ima sklonost ugradnji u genom stanice domaćina čovjeka. Prije ugradnje u genom ljudske stanice virusni genom se „otvori“ (lomi) u genu *E1* i/ili *E2*, dok *E6/E7* regije ostaju cjelovite. Gubitak funkcije gena *E2* rezultira nekontroliranom povećanom ekspresijom proteina *E6* i *E7* (6). U svim karcinomima vrata maternice nađena je povećana ekspresija virusnih proteina *E6* i *E7*. Proteini *E6* i *E7* HPV-a imaju značajnu ulogu u nastanku karcinoma vrata maternice, što je potvrđeno i *in vitro* pokusima imortalizacije stanica fibroblasta u kulturi nakon transfekcije s proteinima *E6* i *E7*. Nadalje, *in vitro* pokusi pokazuju da je za transformaciju stanica nužna suradnja ovih virusnih gena sa staničnim genima kao što je onkogen H-ras. Dokazano je da virusni protein *E6* ima sposobnost vezanja s različitim važnim regulacijskim proteinima stanice domaćina kao što je p53 (7). Vezanje *E6* s p53 dovodi do razgradnje p53 čime se gubi njegova uloga u kontroli gena koji kontroliraju zastoje u G1-fazi, pa se, dozvoljavanjem prolaza kroz stanični ciklus prije nego što je DNA popravljena, omogućava nakupljanje mutiranih gena. Protein *E7* HPV-a visokog rizika čini komplekse s proteinom Rb i u tom obliku ometa put djelovanja ovog proteina. Protein Rb se u interakciji s transkripcijskim čimbenikom E2F veže za promotore i blokira ekspresiju gena. Kada je Rb inaktiviran, na primjer kada čini kompleks s proteinom *E7*, stanice su sklonije ulasku i zaostajanju u S-fazi, što stimulira replikaciju DNA, a posredno i proliferaciju stanica.



Slika 1. Genom HPV tipa 16 (prilagođeno prema 8) funkcije gena: *L1* i *L2* - proteini kapside virusne čestice; *E1* – regulacija episomalne replikacije virusne DNA; *E2* – regulacija transkripcije i replikacije virusne DNA; *E4* – oslobađanje virusnih čestica; *E5* – stimulacija stanične proliferacije; *E6* – deregulacija kontrole staničnog ciklusa inaktivacijom/razgradnjom p53; *E7* - deregulacija staničnog ciklusa inaktivacijom proteina Rb

### 1.3. Značaj detekcije i genotipizacije HPV-a

Rak vrata maternice je po učestalosti četvrti karcinom u ženskoj populaciji u svijetu. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*) Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*) od raka vrata maternice godišnje oboli 528.000 žena (podaci za 2012. godinu). Većina (85 %) javlja se u slabije razvijenim dijelovima svijeta (9). U Hrvatskoj je incidencija raka vrata maternice (15,3/100.000) najviša u dobi od 30. do 34. godine života, a odnos između karcinoma *in situ* i invazivnog raka vrata maternice je u 2013. godini bio 1:1 (10). Detekcija i genotipizacija HPV-a značajna je za otkrivanje visokorizičnih genotipova koji uzrokuju rak vrata maternice. Danas je detekcija visokorizičnog HPV-a uvrštena u probir za rak vrata maternice i to kroz tri modela (11):

1. Test probira za žene s graničnim citološkim nalazom prisustva atipičnih skvamoznih stanica neodređenog značenja (ASCUS, engl. *atypical squamous cells of undetermined significance*), atipičih žljezdanih stanica (AGC, engl. *atypical glandular cells*) i skvamoznih intraepitelnih lezija (SIL) koje će trebati daljnje praćenje.
2. Primarni test probira – samostalno ili u kombinaciji s Papa-testom za ranu detekciju prekursora raka vrata maternice.
3. Test praćenja nakon ekscizijskog liječenja SIL-a visokog stupnja.

Dokazano je da pozitivan HPV test nakon liječenja CIN-a (cervikalna intraepitelna neoplazija) ima veću osjetljivost u usporedbi s ponovljenom citologijom i iz tog razloga HPV test uveden je u protokole praćenja nakon liječenja CIN-a te se preporučuje dvostruko testiranje Papa-testom i HPV testom šest mjeseci nakon zahvata. Rastuća saznanja o vezi HPV infekcije i raka vrata maternice dovela su do stvaranja profilaktičkih cjepiva s ciljem primarne prevencije bolesti. Danas se koristi nekoliko komercijalnih cjepiva koja uključuju različite HPV tipove. Poznata su dvovalentna (protiv HPV-a 16 i 18), četverovalentna (protiv HPV-a 6, 11, 16, 18) te 9-valentna (protiv HPV-a 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58) cjepiva (12). Genotipizacija HPV-a ima važnu ulogu u detekciji displazija i pomaže u smanjenju broja lažno pozitivnih rezultata Papa-testa. Žene starije od 30 godina s negativnim nalazom HPV-a imaju mnogo manje šanse za razvoj raka vrata maternice te s negativnim nalazom Papa-testa i HPV testa ne moraju biti testirane sljedećih 5 godina (13).

#### **1.4. Metode molekularne dijagnostike za detekciju infekcije HPV-om**

Kultivacija HPV-a u staničnim kulturama *in vitro* nije moguća pa se za detekciju infekcije HPV-om koriste metode molekularne dijagnostike. U početku su za detekciju HPV-a korištene tehnike Southern hibridizacijske analize te *in situ* hibridizacija i dot-blot hibridizacija pomoću radioaktivno obilježenih proba. Navedene tehnike bile su niske osjetljivosti, zahtijevale su veće količine pročišćene DNA, a i same procedure su zahtijevale više vremena (6). Danas se molekularna dijagnostika i analiza HPV-a sastoji od kvalitativnih testova za detekciju DNA HPV-a, genotipizacijskih testova i sekvencioniranja virusne DNA.

Kvalitativni testovi većinom omogućavaju detekciju visokorizičnih genotipova HPV-a, samo neki testovi omogućavaju i detekciju niskorizičnih genotipova. Za test je važno da je validiran za kliničku upotrebu, standardiziran i visoko reproducibilan (14). Za rutinsku dijagnostiku primjenjuju se kvalitativni testovi za detekciju HPV DNA koji se temelje na

različitim tehnikama detekcije. Dvije najzastupljenije metode detekcije genoma HPV-a su hibridizacija s amplifikacijom signala npr. hibridizacijski test Digene HPV Test (Qiagen) i testovi amplifikacije nukleinskih kiselina npr. Amplicor HPV Test (Roche Molecular Diagnostics). Digene HPV Test može dokazati HPV DNA jednog ili više visokorizični HPV-a, a za razliku od većine kvalitativnih testova ima mogućnost detekcije i niskorizičnih genotipova. Test se temelji na metodi tekućinske kromatografije primjenom smjese specifičnih RNA proba i enzimskoj amplifikaciji signala. Amplicor HPV Test temelji se na kombinaciji PCR-a uz uporabu specifičnih početnica i hibridizacije nukleinskih kiselina. Ovim testom može se dokazati prisutnost jednog ili više visokorizičnih tipova HPV-a. Dostupnost komercijalnih standardiziranih testova omogućila je genotipizaciju HPV-a kao rutinsku metodu. Najčešće korišten genotipizacijski test je Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics) koji omogućava detekciju 37 genotipova HPV-a. Neke od metoda za detekciju i genotipizaciju HPV-a prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1.: Metode za detekciju i genotipizaciju HPV-a. Uz neke od metoda naveden je naziv komercijalnog testa.

|                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hibridizacija nukleinskih kiselina                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Southern blot</li> <li>• <i>In situ</i> hibridizacija</li> <li>• Dot-blot hibridizacija</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Amplifikacija signala                                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hibridizacija ciljane DNA HPV-a obilježenim RNA probama (Hybrid Capture 2, Digene)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Amplifikacija nukleinskih kiselina<br>(PCR + postamplifikacijska detekcija DNA HPV-a) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-RFLP<br/>Amplificirana DNA razgrađuje se restriktivnim enzimima. Fragmenti DNA razdvajaju se gel elektroforezom.</li> <li>• Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. <i>real-time PCR</i>)<br/>Uporabom fluorokroma amplifikacija se prati u stvarnom vremenu, a višestrukim (engl. <i>multiplex</i>) reakcijama omogućena je detekcija više tipova HPV-a u jednoj PCR tubici.<br/>(COBAS 4800 HPV test, Roche; INNO-LiPA, Innogenetics)</li> <li>• Metoda mikročipova (engl. <i>microarray</i>)<br/>PCR produkt se hibridizira na čip, hibridizirani signali se prikazuju pomoću čip skenera.<br/>(PapilloCheck, Greiner Bio One; CLART human papillomavirus 2, Genomica)</li> <li>• Sekvencioniranje genoma HPV-a</li> </ul> |

### 1.5. Detekcija HPV-a metodom PCR i reverznom hibridizacijom

Genom HPV-a, kao i većine virusa, nije dovoljno velik niti ga ima u dovoljnoj količini da bi se mogao izravno detektirati pa se zato radi lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). Metodom PCR-a umnaža se dio DNA iz malog broja kopija na nekoliko tisuća i nekoliko milijuna kopija. Početni korak PCR je denaturacija DNA na visokoj temperaturi (94-96 °C), nakon toga razgrađena DNA hibridizira s oligonukleotidnim početnicama i u ovom koraku temperatura se smanjuje na 55-65 °C. DNA se zatim sintetizira

uz pomoć Taq DNA-polimeraze na temperaturi od 72 °C. Ovaj se ciklus ponavlja 20 - 40 puta (2). Nakon što je DNA umnožena metodom PCR-a koristi se reverzna hibridizacija kako bi se mogla prikazati DNA. Najmanji broj kopija virusne DNA koji je moguće dokazati testom HPV Easy - screening je  $10^3$ , što ujedno predstavlja i najmanji titar virusne DNA od kliničkog značaja. Reverzna hibridizacija temelji se na hibridizaciji specifičnih DNA proba koje se nalaze na nitroceluloznim trakicama. Prvi korak je denaturacija PCR produkta i vezanje jednolančanih odsječaka DNA s oligonukleotidnim probama koje su imobilizirane na nitroceluloznim trakicama s virusnom DNA. Produkti PCR-a za koje se oligonukleotidne početnice nisu vezale s komplementarnošću od 100 % ispiru se. Na PCR produkte vezan je biotin pa hibridizacijom PCR produkta i oligonukleotidnih početnica nastaje biotinizirani hibrid. Taj biotinizirani hibrid prikazuje se uz pomoć konjugacijskog spoja enzima alkalne fosfataze i streptavidina koji specifično veže biotin. Dodatkom supstrata dolazi do obojenja dijela trakice na kojem se nalazi hibridni kompleks PCR produkt-oligonukleotidna proba. Uz pomoć sheme za očitavanje i interpretaciju rezultata očitavaju se rezultati testiranja (14).

## **2. CILJ RADA**

Analiza rezultata molekularne dijagnostike HPV-a učinjene u dijagnostičkom programu KBC-a Osijek u periodu 2014. - 2016. godine metodom kombinacije PCR-a i reverzne hibridizacije.



### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. Ustroj istraživanja**

Istraživanje je ustrojeno kao retrospektivna studija (15).

#### **3.2. Ispitanici**

Ispitivana skupina sastojala se od 448 ispitanika kojima je molekularna dijagnostika genitalne infekcije HPV-om učinjena u rutinskom dijagnostičkom programu u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek u periodu od 2014. do 2016. godine. Pacijenti nisu aktivno sudjelovali u istraživanju te istraživanje nije zahtijevalo nove kontakte prema ispitanicima. Uzorci brisa vrata maternice bili su popraćeni liječničkom uputnicom i pri dolasku u laboratorij dobili su jedinstvenu oznaku. Svi podaci su anonimnog i agregiranog karaktera. U istraživanju su korišteni podaci iz elektronske baze podataka Laboratorija za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek. Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

#### **3.3. Uzorkovanje brisa vrata maternice**

Uzorkovanje brisa vrata maternice obavljano je u ginekološkim ordinacijama. Uzorci su uzimani Rovers Cervex Brush (Rovers Medical Devies) koja se rotira 5 puta u smjeru kazaljke na satu. Četkica mora biti dovoljno duboko kako bi kraća vlakna mogla doticati ektocerviks. Odmah nakon uzimanja uzorka četkica se uroni u transportni medij ThinPrep PreservCyt (Hologic, SAD) gurajući četkicu na dno bočice kako bi se dovoljno razdvojili dijelovi četkice. Važno je nakon ispiranja četkice dobro zatvoriti bočicu kako ne bi došlo do prolijevanja medija prilikom transporta. Prikupljeni se uzorci transportiraju u laboratorij gdje dobiju jedinstvenu oznaku te se čuvaju na sobnoj temperaturi do izolacije DNA. Postupak izolacije DNA izvodi se unutar tjedan dana od primitka uzorka.



Slika 2. Pribor i materijal za uzimanje brisa vrata maternice (fotografirala Karla Kegalj)

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Izolacija DNA iz stanica epitela vrata maternice

Izolacija DNA rađena je pomoću High Pure PCR Template Preparation kita (Roche Diagnostics, Njemačka) prema uputama proizvođača. DNA se izolira iz epitelnih stanica vrata maternice koje su pohranjene u ThinPrep PreservCyt otopini.

**Materijal:** High Pure PCR Template Preparation kit, 2-propanol, apsolutni etanol, redestilirana H<sub>2</sub>O

**Laboratorijska oprema:** mikrocentrifuga, grijač/tresilica, mikropipete volumena do 10, 100, 200 i 1000 µL, sterilni nekorišteni nastavci, sterilne nekorištene tubice volumena 2,0 i 0,5 mL

#### Protokol izolacije DNA

U obrazac za popis testova upisuje se datum korištenja testa i broj potrošenih testova. Sve bočice s uzorcima brisa vrata maternice prethodno su označene. Neposredno prije izolacije DNA potrebno ih je promućkati.

1. Iz bočice ThinPrep PreservCyt odvojiti 1 mL uzorka te uzorak centrifugirati 10 minuta na 2000 okretaja po minuti na sobnoj temperaturi. Nakon centrifuge odliti supernatant.

2. Dodati 200  $\mu\text{L}$  redestilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  binding pufera i 40  $\mu\text{L}$  radne otopine Proteinaze K, vorteksirati i inkubirati 10 minuta na + 70  $^{\circ}\text{C}$ .
3. Dodati 100  $\mu\text{L}$  2-propanola, dobro promiješati i staviti u Filter tubicu koja se nalazi na Collection tubici. Centrifugirati 1 minutu na 8000 x g, odbaciti Collection tubicu i Filter tubicu staviti na novu Collection tubicu.
4. U Filter tubicu dodati 500  $\mu\text{L}$  radne otopine Inhibitor Removal pufera i centrifugirati 1 minutu na 8000 x g. Filter tubicu nakon centrifugiranja staviti na novu Collection tubicu.
5. Dodati 500  $\mu\text{L}$  radne otopine Wash pufera u Filter tubicu i opet centrifugirati, staviti novu Collection tubicu.
6. Ponovno dodati 500  $\mu\text{L}$  radne otopine Wash pufera i centrifugirati 1 min na 8000 xg, odbaciti tekućinu iz Collection tubice i Filter tubicu staviti na istu Collection tubicu.
7. Centrifugirati 10 sekundi maksimalnom brzinom od 13000 x g te odbaciti Collection tubicu.
8. Filter tubicu staviti u novu čistu tubicu od 2 mL i dodati 210  $\mu\text{L}$  zagrijanog Elution pufera, centrifugirati 1 min na 8000 x g.
9. Uzorke DNA iz tubice od 2 mL prebaciti u obilježenu tubicu s navojem te uzorke DNA skladištiti na - 20  $^{\circ}\text{C}$ .



Slika 3. Materijal i pribor pripremljeni za izolaciju DNA iz stanica epitela vrata maternice (fotografirala Karla Kegalj)

### 3.4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR amplifikacija provedena je pomoću HPV Easy komercijalnog seta prema uputama proizvođača. Komercijalni set sadrži mješavinu biotinom obilježenim oligonukleotidnih početnica za umnožavanje najčešćih HPV genotipova. Najučestaliji HPV genotipovi mogu biti niskog ili visokog rizika za razvoj cervikalnih intraepitelnih neoplazija (CIN) i tumora grlića maternice. Mješavina početnica sadrži i oligonukleotide za umnožavanje odsjeka humanog gena za glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) u svrhu unutrašnje kontrole procesa izolacije i umnožavanja DNA. Umnožavanje DNA odvija se u PCR uređaju koji daje rezultate unutar 1 h i 15 min.

**Materijal:** HPV Easy komercijalni set (GenID, Njemačka), Hot start Taq DNA polimeraza (Euroclone, Italija), PCR pufer konc 10X,  $MgCl_2$ , PCR grade  $H_2O$ , uzorci DNA ispitanika

**Laboratorijska oprema:** PCR uređaj Veriti (Applied Biosciences), PCR kabinet za sterilni rad (Aura PCR, Bioair Euroclone), PCR tubice volumena 200  $\mu L$ , short-spin centrifuga, mikropipete volumena do 2,5  $\mu L$ , 10  $\mu L$ , 100  $\mu L$  i 1000  $\mu L$ , sterilni nekorišteni filter nastavci, zamrzivač (-20 °C).

**Postupak:** U ohlađenoj reakcijskoj tubici pripremi se reakcijska smjesa. PCR reakcijska smjesa sastojala se od: HPV Easy-PN-Mix-a (15  $\mu L$ ), PCR pufera bez  $Mg^{2+}$  konačne koncentracije 1X,  $MgCl_2$  konačne koncentracije 2,5 mM, Taq DNA polimeraze (1,0 U) i  $H_2O$  (nadopunjeno do 25  $\mu L$ ). Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 25  $\mu L$ . Smjesa se nježno promiješa i spusti (spin down). Po 20  $\mu L$  reakcijske smjese prenese se u PCR tubice. U reakcijske tubice tada se stavlja po 5  $\mu L$  uzorka DNA. Zajedno s uzorcima uvijek su vožene negativna kontrola (kalup DNA zamijenjen s vodom) i pozitivna kontrola (kontrolna DNA GAPD iz komercijalnog seta).

Tablica 2: Uvjeti PCR reakcije

| Broj ciklusa | Temperatura (°C) | Trajanje (min) |
|--------------|------------------|----------------|
| 1            | 95               | 03:00          |
| 10           | 96               | 00:10          |
|              | 60               | 00:20          |
| 26           | 95               | 00:10          |
|              | 55               | 00:15          |
|              | 72               | 00:15          |
| 1            | 72               | 03:00          |
| 1            | 8                | HOLD           |

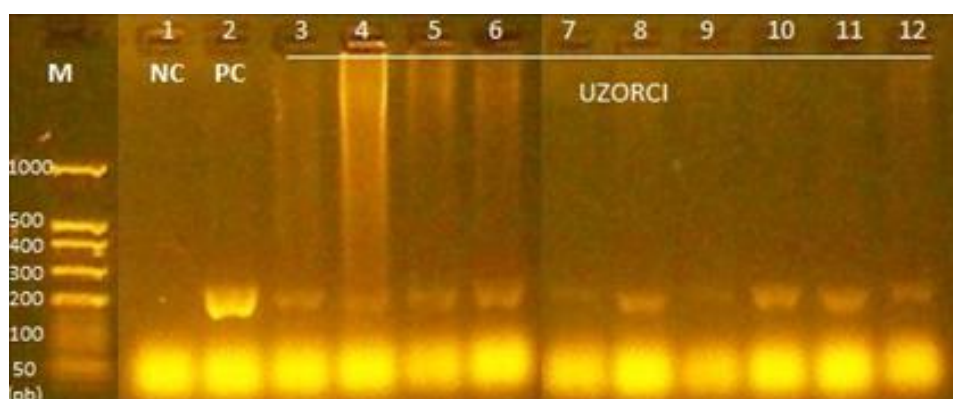
### 3.4.3. Agarozna gel elektroforeza

PCR produkte možemo provjeriti elektroforezom u agaroznom gelu. Agarozna gel-elektroforeza je korisna i jednostavna te brza metoda. Agarozni gelovi koriste se za razdvajanje dvolančanih DNA molekula od 300 do 1000 ili više parova nukleotida. Veličina odsječaka DNA se određuje pomoću standarda koji je smjesa odsječaka poznate veličine, a DNA se vizualizira dodatkom boje koja fluorescira pod UV svjetlom.

**Materijal:** Agaroz (Roche Diagnostics), DNA marker (Olerup), 1xTAE pufer, GelRed boja za bojanje nukleinskih kiselina (Olerup)

**Laboratorijska oprema:** Jedinica za elektroforezu Vari-Gel (Scie-Plas), power supply PowerPac Basic (Biorad), UV transiluminator s digitalnom kamerom (ImageQuant), vaga (Mettler Toledo), mikrovalna pećnica, staklena okrugla tikvica volumena 250 mL, staklena čašica (10 mL), menzura (250 mL), mikropipeta volumena do 10  $\mu$ L, sterilni nekoristeni nastavci volumena 10  $\mu$ L

**Postupak:** Otapanjem agaroze u 1xTAE puferu pripremi se 2 % agaroz. Grijati u mikrovalnoj pećnici dok se agaroz potpuno ne otopi. U vrući gel doda se GelRed boja za bojanje nukleinskih kiselina. Gel se pažljivo ohladi, no ne previše, te se izlije u pripremljenu kadu. Stavi se „češalj“ te se ostavi da se potpuno ohladi i skrutne. Izvadi se češalj te se u rupice nanosi po 5  $\mu$ L uzorka. Elektroforeza se vozi pri određenim vrijednostima struje i napona namještene na *power supplyu*. PCR produkti razdvojeni gel elektroforezom prikazu se pomoću UV transiluminatora te se gel fotografira (Slika 4).



Slika 4. Umnoženi fragment HPV-DNA veličine je otprilike 180 pb dok amplifikacijom kontrolne DNA (GAPDH) nastaje fragment veličine 174 pb

### 3.4.4. Reverzna hibridizacija

Reverzna hibridizacija umnožene virusne DNA na specifične oligonukleotidne probe vezane na nitroceluloznim trakicama omogućava identifikaciju najučestalijih genotipova HPV-a visokog i niskog rizika.

**Materijal:** ploča sa 12 inkubacijskih kadica, biotinom obilježeni PCR produkti dobiveni amplifikacijom virusnih sljedova, biotinom obilježeni PCR produkti humanog gena za GAPDH, nitrocelulozne trakice presvučene s HPV probama, denaturacijska otopina, hibridizacijski pufer, otopina za ispiranje (Stringent wash), sredstvo za ispiranje (Rinse), otopina konjugata, pufer za pripremu konjugacijske otopine, supstrat

**Laboratorijska oprema:** termomikser (Eppendorf), vortex miješalica, vodena kupelj, multiknalna mikropipeta volumena 300  $\mu$ L, mikropipete volumena do 20, 200 i 1000  $\mu$ L, filter nastavci, kivete s čepom volumena 15 mL, pinceta, Pasteur pipeta, papirnati ubrusi

**Postupak:** Potrebno je pripremiti radne otopine, hibridizacijski pufer i otopinu za ispiranje (Stringent) tako što ih zagrijemo na 47 °C. Sredstvo za ispiranje (Rinse) zagrijemo u kupelji i razrijedimo s deioniziranom vodom u omjeru 1:5 (1 dio Rinse u 4 dijela H<sub>2</sub>O).

1. Označiti inkubacijske kadice brojem uzorka onim redoslijedom kojim namjeravamo testirati uzorke.
2. Pipetirati 20  $\mu$ L denaturacijske otopine u jažicu na vrhu svake inkubacijske kadice.
3. Pipetirati 20  $\mu$ L PCR amplikona u kadicu koja je obilježena brojem uzorka koji testiramo, dobro promiješati pipetom i inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi. Štopericu pokrenuti odmah nakon što dodamo PCR uzorak u 1. kadicu.
4. Pipetirati 1 mL zagrijane, prethodno promiješane otopine hibridizacijskog pufera u svaku kadicu. Pipetirati tako da denaturirani PCR produkt isperemo iz jažice s vrha kadice i rasporedimo cijelom dužinom kadice.
5. U kadice dodati nitrocelulozne trakice. Trakice moraju cijele biti prekrivene tekućinom.
6. Inkubirati ploču s kadicama 30 min na 47 °C u termomikseru na 400 rpm.
7. Nakon inkubacije ukloniti tekućinu iz kadice pazeći da trakice ostanu u kadici.
8. Isprati trakice tako da se u svaku kadicu doda 1 mL zagrijane otopine za intenzivno ispiranje (Stringent) i ploču, zatim inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi uz lagano tapkanje ploče. Ovaj postupak ponoviti 2 puta.

9. Izbaciti tekućinu i dodati 1 mL zagrijane otopine za intenzivno ispiranje (Stringent) u svaku kadicu i inkubirati 15 minuta na 47 °C u Termomikser miješalici na 400 rpm.
10. Za vrijeme inkubacije razrijediti koncentriranu otopinu konjugata s konjugacijskim puferom u omjeru 1:100.
11. Nakon inkubacije ukloniti tekućinu iz kadica i dodati 1 mL razrijeđenog sredstva za ispiranje. Postupak ponoviti 2 puta i prije sljedećeg koraka ostatak tekućine koji se zadržao u kadicama pokupiti pipetom.
12. Dodati 1 mL razrijeđene konjugacijske otopine u svaku inkubacijsku kadicu i inkubirati 30 min na horizontalnoj miješalici na temperaturi od 22 °C.
13. Ukloniti konjugacijsku otopinu i isprati kadice dodavanjem 1 mL razrijeđenog sredstva za ispiranje (Rinse). Postupak ispiranja ponoviti 3 puta.
14. U kadice dodati 1 mL supstrata i inkubirati u mješalici na 400 rpm 10-20 minuta ovisno o intenzitetu razvoja boje. Reakciju zaustaviti ispiranjem sa 1 mL destilirane vode. Postupak ispiranja ponoviti 2 puta.
15. Izvaditi trakice pomoću pincete i osušiti ih na papirnatim ručnicima te analizirati pomoću liste za ocjenjivanje. Trakice spremiti zaštićene od svjetlosti.

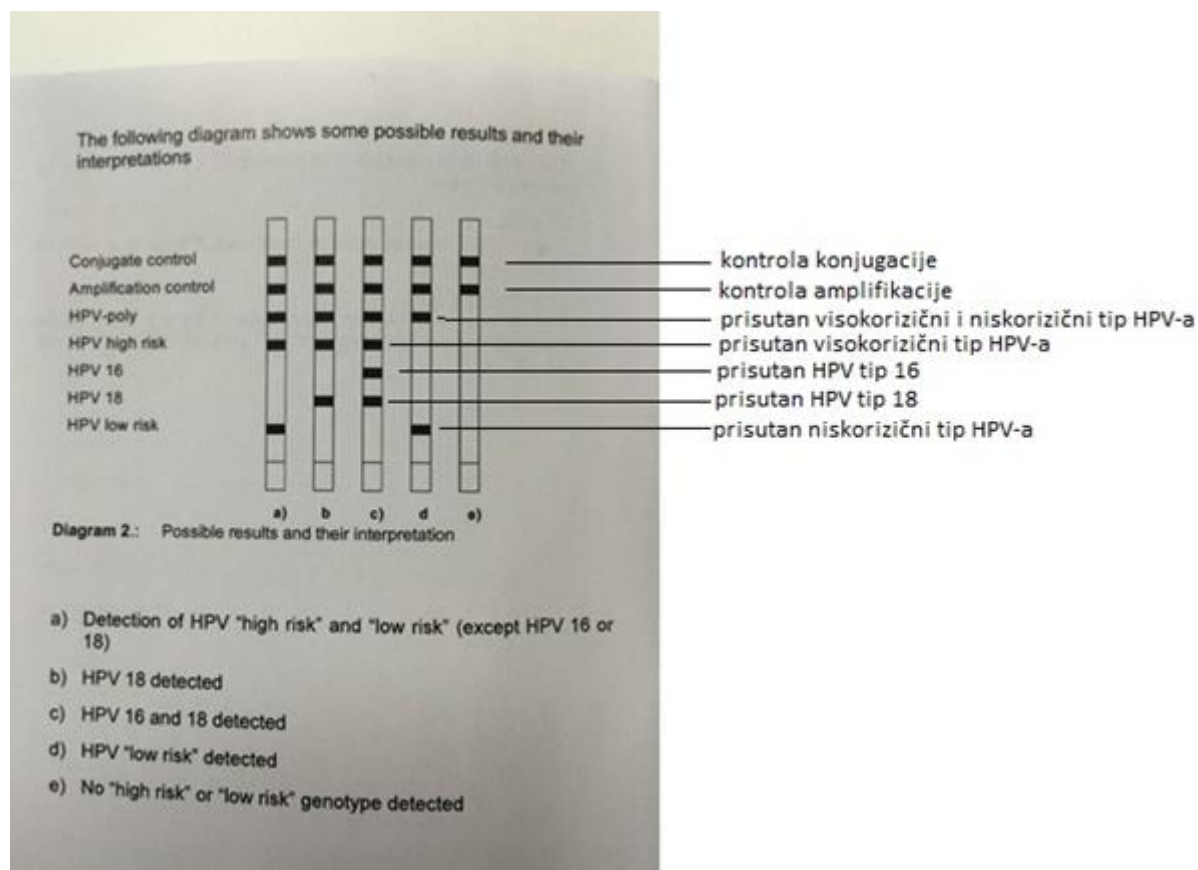


Slika 5. Rezultati HPV testa na nitroceluloznim trakicama (fotografirala Karla Kegalj)



### 3.4.5. Interpretacija rezultata

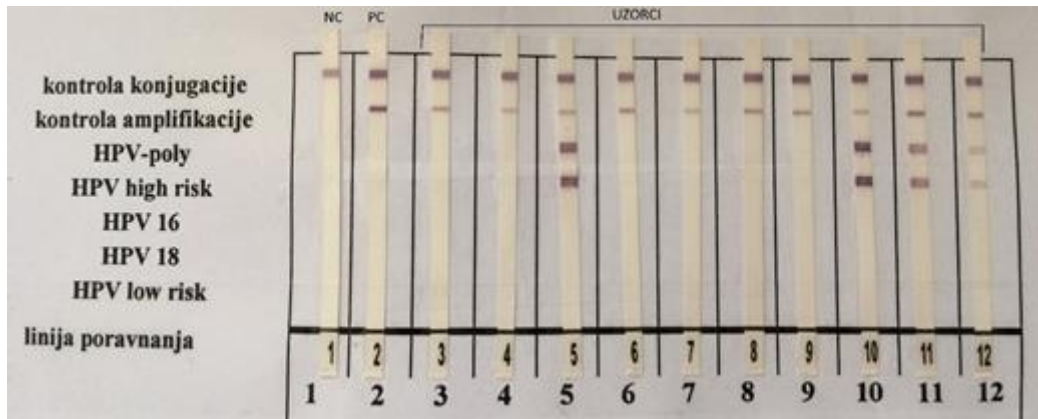
Rezultati postupka reverzne hibridizacije očitavaju se i interpretiraju pomoću sheme priložene u komercijalnom setu HPV Easy-Screening (Slika 6).



Slika 6. Shema za očitavanje i interpretaciju rezultata genotipizacije HPV-a

Svaki uzorak mora imati potpuno razvijenu kontrolu konjugacije, a ukoliko ona nije prisutna, uzorak možemo smatrati lažno negativnim i treba ponoviti testiranje. Svaki uzorak mora imati razvijenu i kontrolu amplifikacije. Ona predstavlja kontrolu izolacije i amplifikacije DNA. Jačina signala kontrole amplifikacije može varirati u ovisnosti o koncentraciji i humane DNA i HPV-DNA u uzorku. U slučaju visoke koncentracije HPV-DNA u uzorku jačina signala kontrole amplifikacije može biti slabija. Razvijena HPV-poly zona trakice označava prisustvo bilo kojeg genotipa HPV u uzorku. Prisutnost razvijene HPV *high risk* zone označava uzorak pozitivan za neki od visokorizičnih tipova HPV-a (HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 97). Pozitivna zona HPV 16 znači prisutnost genotipa HPV-a 16 u uzorku, a zona HPV 18 prisutnost HPV-a 18. Razvijena HPV *low risk* zona ukazuje da je uzorak pozitivan na neki od niskorizičnih genotipova (HPV 6, 11, 40, 42, 44, 54).





Slika 7. Primjer rezultata kvalitativne detekcije HPV-a u jednom setu uzoraka (trakice 3-12). Negativna kontrola – trakica 1; pozitivna kontrola – 2; HPV nije prisutan u uzorcima – trakica 3, 4, 6, 7, 8, 9; u uzorcima prisutan neki od visokorizičnih tipova – trakice 5, 10, 11, 1

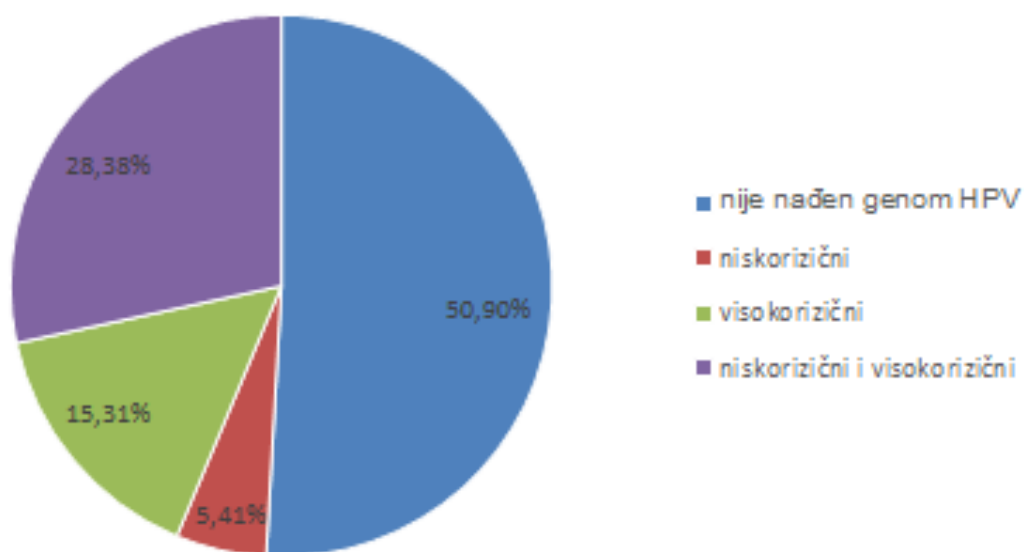
### **3.5. Statistička obrada podataka**

Rezultati dobiveni kvalitativnom detekcijom HPV-a u uzorcima brisa cerviksa maternice obrađeni su metodama deskriptivne statistike s programskim paketom za statističku obradu Excel 2013.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Raspodjela visokorizičnih i niskorizičnih tipova HPV-a u skupini ispitanika

U razdoblju od 2014. do 2016. godine testirano je 448 pacijenata, 4 uzorka su bila neadekvatna pa se tražilo ponovno uzorkovanje. Daljnjom obradom 444 uzoraka dobiveni su rezultati prikazani na slici 8.



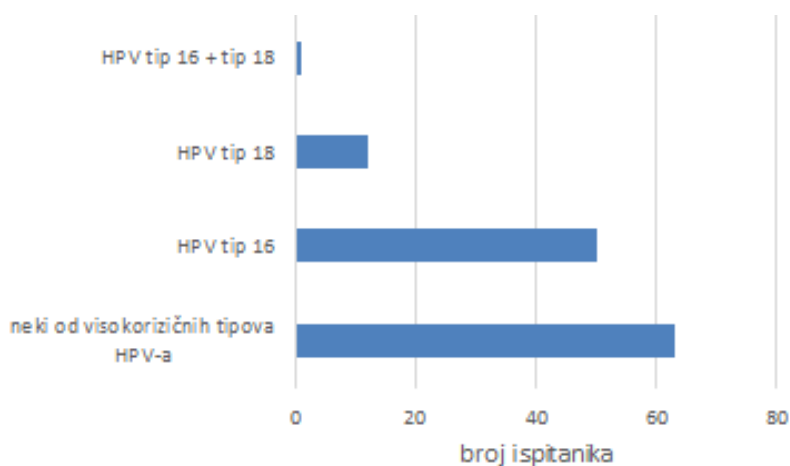
Slika 8. Rezultati kvalitativne detekcije HPV-a u ukupnoj skupini ispitanika. Udio pojedinih tipova HPV-a izražen je u postotcima.

Od ukupnog broja testiranih uzoraka brisa vrata maternice 50,9 % ih je bilo negativno na prisustvo HPV-a. Skoro trećina ukupnog broja uzoraka (28,38 %) nosila je i visokorizični i niskorizični genotip HPV-a (Slika 8). Najveći postotak pacijenata nalazi se u skupini u kojoj nije nađen genom HPV-a. U toj skupini dob je  $39 \pm 11$ , što čini pacijente koji nemaju HPV najstarijom od 4 skupine u kojima su podijeljeni pacijenti. Najmlađu dobnu skupinu čine pacijenti s niskorizičnim tipom HPV-a. Prosječna životna dob u toj skupini je  $34 \pm 11$ . Pacijenti koji se nalaze u skupini visokorizičnih i niskorizičnih tipova HPV-a te oni koji se nalaze u skupini s visokorizičnim tipom imaju prosječnu dob od  $35 \pm 11$  (Tablica 3.).

Tablica 3. Prosječna dob pacijentica prilikom upućivanja na genotipizaciju HPV-a.

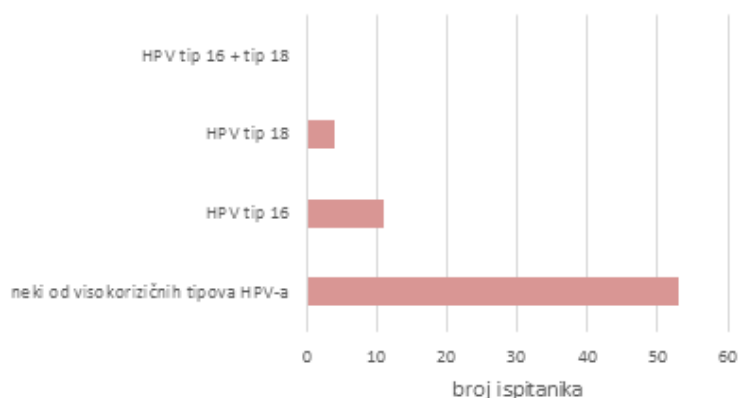
|                                                              | Nije nađen genom HPV-a | Niskorizični | Visokorizični i niskorizični | Visokorizični |
|--------------------------------------------------------------|------------------------|--------------|------------------------------|---------------|
| Dob prilikom genotipizacije HPV-a (prosjeak godina $\pm$ SD) | 39 $\pm$ 11            | 34 $\pm$ 11  | 35 $\pm$ 11                  | 35 $\pm$ 11   |

Od ukupno 126 uzoraka pozitivnih na prisustvo visokorizičnog tipa HPV-a 50 % je nosilo neki od visokorizičnih tipova HPV-a (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 97). Na HPV tip 16 pozitivno je bilo 39,7 % visokorizičnih, dok je 9,5 % visokorizičnih bilo HPV tipa 18. Samo jedan uzorak nosio je oba visokorizična tipa HPV-a 16 i 18 (Slika 9).



Slika 9. Raspodjela visokorizičnih tipova HPV-a u skupini uzoraka pozitivnih na visokorizični HPV genotip

U skupini od 68 ispitanika koji su bili pozitivni i na visokorizični i na niskorizični tip HPV-a 77,8 % ima neki od visokorizičnih tipova HPV-a, 16,2 % je pozitivno na HPV 16, a 5,9 % na HPV 18. Ni jedan uzorak pozitivan miješanog nisko-visokorizičnog tipa HPV-a nije imao oba visokorizična tipa 16 + 18 (Slika 10).



Slika 10. Raspodjela visokorizičnih tipova HPV-a u skupini miješanih nisko + visokorizičnih HPV infekcija

#### 4.2. Prikaz rezultata HPV testiranja kroz tri godine

Tablica 4. prikazuje rezultate HPV testiranja u razdoblju od 2014. do 2016. godine. Tijekom rutinskog dijagnostičkog programa u Laboratoriju prikupljeno je 444 uzoraka za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek. Možemo uočiti kako su rezultati testiranja kroz godine varirali. Učestalost niskorizičnog tipa HPV-a ima tendenciju pada od 2014. do 2016. godine. Za skupinu uzoraka miješanog visoko + niskorizičnog tipa učestalost je bila otprilike dva puta veća u 2015. godini u odnosu na 2014. i 2016. godinu. Svake godine oko 50 % uzoraka bude negativno na prisustvo HPV-a. Uočljiv je pad učestalosti visokorizičnog tipa za 5,8 % u 2015. godini u odnosu na 2014., dok u 2016. godini učestalost raste za 7,2 % u odnosu na prethodnu godinu.

Tablica 4. Rezultati HPV testiranja od 2014. do 2016.godine

| godina | Niskorizični | Visokorizični | Visoko i niskorizični | Nije nađen HPV genom | Ukupan broj uzoraka |
|--------|--------------|---------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| 2014   | 6 (6,9 %)    | 26 (29,9 %)   | 11 (12,6 %)           | 44 (50,6 %)          | 87                  |
| 2015   | 10 (6,2 %)   | 39 (24,1 %)   | 36 (22,2 %)           | 77 (47,5 %)          | 162                 |
| 2016   | 8 (4,1 %)    | 61 (31,3 %)   | 21 (10,8 %)           | 105 (53,8 %)         | 195                 |

### 4.3. Rezultati detekcije HPV-a s obzirom na uputne dijagnoze

Tablica 5. Rezultati detekcije HPV-a s obzirom na uputne dijagnoze

| Uputna dijagnoza                        | broj uzoraka | HPV negativan    | niskorizični   | visoko i niskorizični | visokorizični   |
|-----------------------------------------|--------------|------------------|----------------|-----------------------|-----------------|
| Dysplasia cervicis uteri                | 313          | 151<br>(48,24 %) | 18<br>(5,75 %) | 51<br>(16,29 %)       | 93<br>(29,71 %) |
| Karcinom <i>in situ</i> vrata maternice | 7            | 4<br>(57,14 %)   | 0              | 1<br>(14,28 %)        | 2<br>(28,57 %)  |
| CIN III                                 | 15           | 8<br>(53,33 %)   | 1<br>(6,67 %)  | 1<br>(6,67 %)         | 5<br>(33,33 %)  |
| CIN II                                  | 10           | 4<br>(40,0 %)    | 0              | 6<br>(60,0 %)         | 0               |
| CIN I                                   | 25           | 12<br>(48,0 %)   | 0              | 4<br>(16,0 %)         | 9<br>(36,0 %)   |
| Anogenitalne bradavice                  | 26           | 8<br>(30,77 %)   | 4<br>(15,38 %) | 7<br>(26,92 %)        | 7<br>(26,92 %)  |
| Opći ginekološki pregled                | 30           | 16<br>(53,33 %)  | 1<br>(3,33 %)  | 2<br>(6,67 %)         | 11<br>(36,67 %) |
| Ulcerozni kolitis/<br>Crohnova bolest   | 10           | 7<br>(70,0 %)    | 0              | 3<br>(30,0 %)         | 0               |
| druge dijagnoze                         | 8            | 7<br>(87,5 %)    | 0              | 1<br>(12,5 %)         | 0               |

Prema tablici 5. može se uočiti kako je najveći broj uzoraka s uputnom dijagnozom *Dysplasia cervicis uteri* bio negativan na prisustvo HPV-a (48,24 %). Za istu uputnu dijagnozu od HPV pozitivnih bilo je najviše visokorizičnih (29,7 %). Otprilike je slična učestalost kod uputne dijagnoze karcinoma *in situ* s tom razlikom što u ovoj skupini nije nađen ni jedan uzorak s niskorizičnim HPV-om. Učestalost prisutnosti pojedinih tipova HPV-a kod uzoraka dijagnoze CIN III i CIN I slične su rezultatima za skupinu displazije. U skupini uputne dijagnoze CIN II ni jedan uzorak nije bio samo visokorizični, nego su svi pozitivni uzorci bili miješanog tipa infekcije. U skupini uzoraka uputne dijagnoze anogenitalnih

bradavica bilo je, u odnosu na sve ostale uputne dijagnoze, najviše uzoraka pozitivnih na niskorizični tip HPV-a te isto tako u odnosu na ostale uputne dijagnoze najmanje uzoraka negativnih na prisustvo HPV-a.

Tablica 6. Raspodjela visoko i niskorizičnih tipova HPV-a u ukupnom broju pozitivnih uzoraka s obzirom na uputne dijagnoze.

| Uputna dijagnoza                        | ukupan broj uzoraka | HPV negativni    | HPV pozitivni    | Ukupo niskorizičnih (% od HPV pozitivnih) | Ukupo visokorizičnih (% od HPV pozitivnih) |
|-----------------------------------------|---------------------|------------------|------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Dysplasia cervicis uteri</i>         | 313                 | 151<br>(48,24 %) | 162<br>(51,76 %) | 69<br>(42,59 %)                           | 144<br>(88,89 %)                           |
| Karcinom <i>in situ</i> vrata maternice | 7                   | 4<br>(57,14 %)   | 3<br>(42,8 6%)   | 1<br>(33,33 %)                            | 3<br>(100,0 %)                             |
| CIN III                                 | 15                  | 8<br>(53,33 %)   | 7<br>(46,67 %)   | 2<br>(28,57 %)                            | 6<br>(85,71 %)                             |
| CIN II                                  | 10                  | 4<br>(40,0 %)    | 6<br>(60,0 %)    | 6<br>(100,0 %)                            | 6<br>(100,0 %)                             |
| CIN I                                   | 25                  | 12<br>(48,0 %)   | 13<br>(52,0 %)   | 4<br>(30,77 %)                            | 13<br>(100,0 %)                            |
| Anogenitalne bradavice                  | 26                  | 8<br>(30,77 %)   | 18<br>(69,23 %)  | 11<br>(61,11 %)                           | 14<br>(77,78 %)                            |
| Opći ginekološki pregled                | 30                  | 16<br>(53,33 %)  | 14<br>(64,67 %)  | 3<br>(21,43 %)                            | 13<br>(92,86 %)                            |
| Ulcerozni kolitis/<br>Crohnova bolest   | 10                  | 7<br>(70,0 %)    | 3<br>(30,0 %)    | 3<br>(100,0 %)                            | 3<br>(100,0 %)                             |
| druge dijagnoze                         | 8                   | 7<br>(87,5 %)    | 1<br>(12,5 %)    | 1<br>(100,0 %)                            | 1<br>(100,0 %)                             |

Učinimo li analizu podataka tako da gledamo raspodjelu visoko i niskorizičnih u skupini uzoraka pozitivnih na HPV možemo uočiti (Tablica 6) da su sve bolesnice s uputnim

dijagnozama karcinoma *in situ* vrata maternice, CIN I, CIN II, ulcerozni kolitis/Crohnova bolest i druge dijagnoze, koje su bile pozitivne na HPV, imale visokorizični tip HPV-a. U pozitivnih uzoraka je visoka učestalost visokorizičnog tipa i kod uputnih dijagnoza opći ginekološki pregled (92,86 %), displazije cervicis uteri (88,89 %), CIN II (85,71 %) te anogenitalnih bradavica (77,78 %). Niskorizični tip HPV-a imale su sve ispitanice pozitivne na HPV koje su imale uputnu dijagnozu CIN II, ulcerozni kolitis/Crohnova bolest i druge dijagnoze. Niskorizični tip HPV-a u pozitivnih ispitanica uputne dijagnoze anogenitalnih bradavica imao je učestalost 61,11 % te 20 - 40 % u skupinama opći ginekološki pregled, CIN III, CIN I, karcinom *in situ* vrta maternice i displazija *cervicis uteri*.



## 5. RASPRAVA

Od 2014. do 2016. godine ukupan broj uzoraka testiran na infekciju humanim papiloma virusom metodom PCR-a i reverzne hibridizacije u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek je 444 uzoraka brisa grlića maternice. Možemo primijetiti da raste broj uzoraka koji se godišnje testira na infekciju HPV-om. Niskorizični tipovi HPV-a najčešće uzrokuju anogenitalne bradavice dok visokorizični tipovi uzrokuju rak grlića maternice ili neoplaziju vrata maternice (CIN) (16). U ovom istraživanju su sve pacijentice s uputnom dijagnozom karcinoma *in situ* vrata maternice koje su pozitivne na HPV imale visokorizični tip HPV-a, dok nijedna nije bila pozitivna samo na niskorizični tip HPV-a. Ovaj podatak slaže se s podacima iz literature koji navode da karcinom *in situ* uzrokuju visokorizični tipovi HPV-a. U provedenom istraživanju je u skupini pacijentica s uputnom dijagnozom anogenitalnih bradavica bio najveći postotak uzoraka pozitivnih samo na niskorizični tip HPV-a u odnosu na ostale uputne dijagnoze, a 29,6 % ih je imalo miješanu visoko + niskorizičnu infekciju HPV-om što je u skladu s literaturnim navodima kako niskorizični tipovi uzrokuju anogenitalne bradavice (17).

Kombinacijom preventivnih metoda i metoda ranog otkrivanja infekcije HPV-om moguće je spriječiti nastanak i razvoj gotovo 95 % slučajeva raka vrata maternice. Nažalost, u brojnim nerazvijenim zemljama svijeta primjena Papa-testa je nezadovoljavajuća ili potpuno nepoznata pa je u svijetu rak vrata maternice jedan od najčešćih uzroka smrti u žena (9 % od svih smrti od raka u žena) (18). Prema dostupnim podacima, citološki *screening* (Papa-test) žene ne trebaju raditi prije dvadeset pete godine, a nakon toga bi se trebao raditi svakih 3 do 5 godina. Specijalnu pozornost treba obratiti na starije žene koje nikad nisu sudjelovale u *screeningu*. Oportunistički *screening* (testiranje na zahtjev pojedinca) najčešće se provodi u populaciji žena koje imaju dobre rezultate na testiranje Papa i HPV testom što dovodi do loše efektivnosti do koje ne bi došlo da se oportunistički *screening* odvija u populacijama žena lošijeg socioekonomskog statusa (19). Rak vrata maternice rijetko se javlja prije 30. godine života pa se mlađe žene ne trebaju testirati toliko često. Svjetska zdravstvena organizacija preporuča testiranje svake 3 godine kod mlađih žena i pokazuje kako je testiranja svake tri godine jednako učinkovito kao testiranje svake godine (20). Papa-test je morfološki test koji najtočnije i najbrže otkriva rak vrata maternice. Upotreba Papa-testa dovela je do velikog smanjenja morbiditeta i mortaliteta od raka vrata maternice, pa se smatra najboljim testom probira za rak uopće.

Razvojem tehnologije nastale su nove tehnike za detekciju infekcije HPV-om i za analizu DNA HPV-a. Ni jedna od razvijenih tehnika ne smatra se „zlatnim standardom“ detekcije HPV-a. Metode detekcije HPV DNA koje se trenutno koriste u molekularno-dijagnostičkim laboratorijima mogu se podijeliti u 2 skupine: (1) tehnike amplifikacije signala (hibridizacije) i (2) tehnike kombinacije PCR-a (engl. *polymerase chain reaction*) s nekom od postamplifikacijskih metoda detekcije HPV-a. Test Hybrid Capture 2 HPV DNA razvijen je 1997. godine u Americi i najčešće je korišten test za detekciju HPV-a u svijetu, a koristi tehniku hibridizacije. Test ima manju osjetljivost od PCR tehnika ali se tehnički lakše izvodi. Ovaj test omogućuje grupnu detekciju 13 visokorizičnih HPV tipova, a može detektirati i grupu HPV tipova niskog rizika. Nema mogućnost individualne genotipizacije HPV-a. Test korišten u ovom istraživanju koristi tehniku PCR-a, a nakon amplifikacije PCR produkti su analizirani hibridizacijom. Test je osjetljiviji i specifičniji u odnosu na tehniku amplifikacije signala. Ima mogućnost, osim grupne detekcije visokorizičnih i niskorizičnih tipova HPV-a, individualno tipizirati HPV 16 i HPV 18.

Osim hibridizacijom, nakon amplifikacije PCR produkti mogu bit analizirani sekvencioniranjem, real-time PCR-om ili tehnologijom mikročipova. Primjerice, PCR testovi nove generacije imaju automatiziranu pripremu uzorka za analizu u kombinaciji s real-time PCR tehnologijom. Koriste vrlo male reakcijske volumene i mogu obraditi veći broj testova u kraćem vremenskom periodu (21). Tehnologija mikročipova koristi se pri analizi velikog broja uzoraka. Nadalje, nakon umnožavanja PCR-om produkte je moguće genotipizirati i pomoću MALDI-TOF spektrometra masa (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*). Ova metoda ima visok stupanj specifičnosti, osjetljivosti i efikasnosti (4500 uzoraka u 24 sata) (22). U fazi istraživanja je i metoda identifikacije HPV-a pomoću biosenzora. Kombinacija mikročipova i bioloških materijala omogućila je konstruiranje biosenzora koji rade na način da supstrat, koji se mjeri, prolazi kroz tanku membranu i nailazi na biološki senzor (enzim, protutijelo ili cijela mikroba stanica). Kao proizvod reakcije između supstrata i senzora mogu nastati električna struja, toplina, plin ili neki topivi kemijski spoj. Nastali proizvod se pomoću mjernog pretvarača očitava kao električni signal. Metodologija biosenzora zahtjeva dodatna istraživanja (23).

Kao rezultat velikog napretka tehnologije u današnje vrijeme na tržištu je sve više metoda pogodnih za rutinsku dijagnostiku HPV-a koje se odlikuju visokom specifičnošću, osjetljivošću i mogućnošću obrade velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu.

## 6.ZAKLJUČAK

U provedenom istraživanju dobiveni su sljedeći zaključci:

- U razdoblju od 2014. do 2016. godine testirano je 448 pacijenata, 4 uzorka su bila neadekvatna pa se tražilo ponovno uzorkovanje.
- Od ukupnog broja testiranih uzoraka brisa vrata maternice polovica ih je bilo negativno na prisustvo HPV-a.
- Skoro trećina ukupnog broja uzoraka nosila je i visokorizični i niskorizični genotip HPV-a.
- Najmlađu dobnu skupinu čine ispitanici s niskorizičnim tipom HPV-a, prosječna životna dob u toj skupini je  $34 \pm 11$ .
- U periodu od 2014. do 2016. godine učestalost niskorizičnog tipa HPV-a u prosjeku je bila 5,7 % s tendencijom pada. Učestalost visokorizičnog tipa blago varira, no u prosjeku čini oko 28 % testiranih uzoraka. Učestalost miješane visoko + niskorizične infekcije HPV-om u prosjeku je  $15,2 \pm 6$  %. Polovica testiranih uzoraka je svake godine bila negativna na prisustvo HPV-a.
- U ovom istraživanju su sve pacijentice s uputnom dijagnozom karcinoma *in situ* vrata maternice, a koje su pozitivne na HPV, imale visokorizični tip HPV-a, dok nijedna nije bila pozitivna samo na niskorizični tip HPV-a. U skupini pacijentica s uputnom dijagnozom anogenitalnih bradavica najveći postotak uzoraka bio je pozitivan samo na niskorizični tip HPV-a u odnosu na ostale uputne dijagnoze, a 29,6 % ih je imalo miješanu visoko + niskorizičnu infekciju HPV-om.

## 7. LITERATURA

1. Vitković L, Mijović M, Trajković G, Jakovljević S. Histološko-citološka korelacija nalaza i pouzdanost papanicolau testa u otkrivanju premalignih i malignih promena na grliću maternice. *Praxis Medica*. 2015;44:23–31.
2. Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija*. 1.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
3. Grce M. Molekularna dijagnostika oralnih infekcija. *Acta Med Croatica*. 2013;67: 425-432.
4. Grce M, Mravak-Stipetić M. Human papillomavirus–associated diseases. *Clin Dermatol* 2014;32:253-258.
5. Foneseca-Moutinho JA Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstetrics and Gynecology* 2011;10:1-6.
6. Abreu A, Souza RP, Gimenes F, Consolaro M. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*. 2012; 9:262-271.
7. Piana A, Giovanni S, Castiglia P, Pischedda S, Dettori M, Cocuzza C, i sur. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection: new insights into their role in diagnostics and epidemiological surveillance. *JPH* 2009;6(2):164-171.
8. Riemer AB, Keskin DB, Zhang G, Handely M, Anderson KS, Brusic V i sur. A Conserved E7-derived Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Expressed on Human Papillomavirus 16-transformed HLA-A2 Epithelial Cancers *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:29608-29622.
9. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
10. [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf).
11. Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetić D, Verša Ostojić D, Rubeš-Mihaljević R, Dinter M. Citologija vrata maternice (Papa-test) – terminologija i značaj u probiru za rak vrata maternice. *Medicina fluminensis*. 2016; 3: 324-336.
12. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010; 8(10): 1139–1162.
13. Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *J Gynecol Oncol*. 2016; 27(2): 1-12.

14. Židovec Lepej S, Vince A. Molekularna dijagnostika spolno prenosivih infekcija. *Medicus*, 2006;15(2):219-225.
15. Marušić M. i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
16. Lešin J, Babić D, Forko-Ilić J, Skerlev M, Zekan J, Lugonja M i sur. Infekcije s više od jednim podtipom HPV-a povezana je s lošijom prognozom u bolesnica s invazivnim karcinomom vrata maternice. *Gynaecol Perinatol*, 2010;19(3):141–147.
17. Park IU, Wojtal N, Silverberg MJ, Bauer HM, Hurley LB, Manos M. Cytology and Human Papillomavirus Co-Test Results Preceding Incident High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *PLoS One*. 2015;880:1–10.
18. Cricca M, Marasco E, Alessandrini F, Fazio C, Prossomariti A, Savini C i sur. High-throughput genotyping of high-risk human papillomavirus by a MALDI-TOF mass spectrometry-based method. *New Microbiologica*. 2015; 38:211-223.
19. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N i sur. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document *Annals of Oncology* 2010; 21: 448–458.
20. Grce M, Grahovac B, Rukavina T, Vrdoljak-Mozetič D, Glavaš-Obrovac Lj, Kaliterna V i sur. HPV Testing for Cervical Cancer Screening in Croatia. *Antropol*. 2007; 2: 67–71.
21. Yi X, Li J, Yu S, Zhang A, Xu J, Yi J i sur. A New PCR-Based Mass Spectrometry System for High-Risk HPV, Part I. *Am J Clin Pathol* 2011;136:913-919.
22. Dutra I, Foroni I, Couto AR, Lima M, Bruges-Armas J. Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus. *Intechopen*. 2012;7: 953-978.
23. Frias I, Avelino K, Silva R, Andrade C, Oliveira M. Trends in Biosensor for HPV: Identification and Diagnosis. *Journal of Sensors*. 2015; 10: 1-16.

## 8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Metodom kombinacije PCR-a i reverzne hibridizacije analizirati rezultate molekularne dijagnostike HPV-a učinjene u dijagnostičkom programu KBC-a Osijek u periodu 2014.-2016. godine.

Nacrt studije: Retrospektivna studija

Ispitanici i metode: U ovo istraživanje uključeno je 448 ispitanica kojima je detekcija HPV-a u brisu vrata maternice učinjena u rutinskom dijagnostičkom programu Laboratorija za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek. Iz elektronske baze podataka prikupljeni su arhivski podatci o rezultatima HPV testa, dobi bolesnica i uputnoj dijagnozi. Izračunata je dob ispitanica u trenutku uzimanja tkiva za analizu i napravljena deskriptivna statistička obrada rezultata testiranja.

Rezultati: Od ukupnog broja testiranih uzoraka brisa vrata maternice 50,9 % ih je bilo negativno na prisustvo HPV-a. Skoro trećina ukupnog broja uzoraka (28,38 %) nosila je i visokorizični i niskorizični genotip HPV-a. Najveći postotak pacijenata nalazi se u skupini u kojoj nije nađen genom HPV-a, u toj skupini dob je  $39 \pm 11$  što čini pacijente koji nemaju HPV najstarijom od 4 skupine u kojima su podijeljeni pacijenti. U pozitivnih uzoraka je visoka učestalost visokorizičnog tipa i kod uputnih dijagnoza opći ginekološki pregled (92,86%) i displazije cervicis uteri (88,89%). Niskorizični tip HPV-a imale su sve ispitanice pozitivne na HPV koje su imale uputnu dijagnozu CIN II, ulcerozni kolitis/Crohnova bolest i druge dijagnoze.

Zaključak: Rezultati raspodjele i učestalosti nisko i visokorizičnih tipova HPV-a u ispitivanoj skupini s obzirom na uputne dijagnoze u skladu su s literaturnim podacima.

Ključne riječi: HPV, PCR, hibridizacija

## 9. SUMMARY

**Objectives:** The aim of this study was to analyze results of the HPV molecular diagnostic techniques in the diagnostic program in KBC Osijek in the period from 2014 until 2016. This study used two methods, namely PCR (polymerase chain reaction) and reverse hybridization.

**Study design:** Retrospective study

**Participants and methods:** 448 patients involved in the study did an HPV test in the diagnostic program at the Laboratory for Molecular Diagnostics and Tissue Typing in KBC Osijek. Archive medical documentation gave us the results on the HPV test, patients' age and cytology diagnostics. Patients' age was calculated at the moment of sampling tissues for the analysis. When the results of the HPV test arrived, they showed the percentage of a low grade and high grade risk HPV.

**Results:** From the total number of tested samples, 50.9% was negative on HPV. 28.38% had a high grade risk and low grade risk HPV. The highest percentage of patients were in the group that tested negative for the HPV genome. In that group, the patients' age was  $39 \pm 11$ , which made this group the oldest out of four groups. The samples that had been tested positive for the HPV genome had a high frequency of a high risk HPV especially in the samples that had a diagnosis for dysplasia cervicis uteri (88.89%) and general gynecology examination (92.86%). All patients with diagnosis CIN II, Crohn's disease/ulcerative colitis and other diagnosis were tested positive for a low risk HPV.

**Conclusion:** The results and frequencies of a low and high risk HPV in the tested group considering their prompt diagnosis are in line with the previously reported similar research results.

**Key words:** HPV, PCR, hybridization