

Dijagnostika infekcija uzrokovanih Humanim papilomavirusom

Merčep, Filipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:652218>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Filipa Merčep

**DIJAGNOSTIKA INFEKCIJA UZROKOVANIH
Humanim papilomavirusom**

Završni rad

Split, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Filipa Merčep

DIJAGNOSTIKA INFEKCIJA UZROKOVANIH

Humanim papilomavirusom

DIAGNOSIS OF Human papillomavirus INFECTIONS

Završni rad / Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc. prim. dr.sc. Vanja Kaliterna, dr.med.

spec. medicinske mikrobiologije s parasitologijom

Split, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Humani papillomavirus – HPV.....	2
1.2. Epidemiologija infekcije HPV-om	3
1.2.1. Čimbenici rizika za HPV infekciju	4
1.2.2. Način prijenosa HPV infekcije.....	5
1.3. Patogeneza HPV infekcije	6
1.4. Klinička slika infekcija uzrokovanih HPV-om.....	8
1.5. Dijagnostika infekcija uzrokovanih HPV-om.....	14
1.6. Liječenje promjena uzrokovanih HPV-om	16
1.7. Prevencija infekcija uzrokovanih HPV-om	20
1.7.1. Cjepivo protiv HPV infekcije.....	20
2. CILJ RADA.....	25
3. IZVORI PODATAKA.....	26
4. METODE DIJAGNOSTIKE HPV - INFEKCIJE.....	28
4.1. Povijest lančane reakcije polimeraze	28
4.2. Uzorkovanje.....	29
4.2.1. Uzorkovanje obriska cerviksa za molekularnu pretragu na HPV metodom RealTime PCR.....	30
4.3. Potrebni reagensi za izolaciju i amplifikaciju ciljane sekvence virusne DNK	31
4.4. Pribor i aparati.....	32
4.5. Postupak rada.....	33
4.6. Princip metode - PCR (Polymerase Chain Reaction)	36
4.7. Detekcija umnoženih sekvenci	40
4.8. Izgled konačnih rezultata i gotovog nalaza.....	41
5. SAŽETAK	43
6. ABSTRACT	45
7. LITERATURA	47
8. ŽIVOTOPIS.....	50

1. UVOD

Human papillomavirus – HPV pripada porodici *Papovaviridae* i rodu *Papillomavirus*. Danas je poznato oko 200 različitih tipova ovog virusa, a oko 40 ih zahvaća spolni sustav. Genitalna infekcija uzrokovana HPV-om najčešća je spolno prenosiva bolest. Dijagnoza infekcije HPV-om je bitna jer je HPV najvažniji poznati predisponirajući čimbenik karcinoma vrata maternice, vulve, anusa, penisa, a prema nekim istraživanjima i prostate, kao i ekstragenitalnih organa poput usne šupljine i jednjaka. Važan je javno-zdravstveni problem, te je preporučljivo da svaka država organizira preventivne programe.

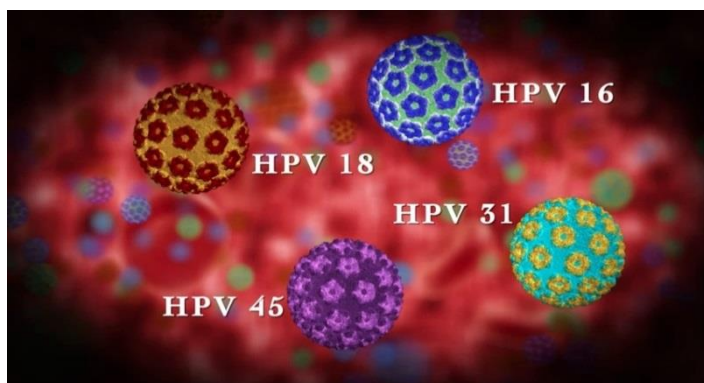
Vrijeme inkubacije, odnosno vrijeme od infekcije do pojave vidljivih promjena traje od 3 tjedna do 6 mjeseci. Većina infekcija je bez simptoma i promjena. Trenutno ne postoji antivirusni lijek odobren za liječenje HPV infekcije. Postoji niz postupaka kojima se kondilomi više ili manje uspješno otklanjaju, no niti jedan nije metoda izbora jer se u 30–70% slučajeva vraćaju tijekom 6 mjeseci od liječenja.

Danas su dostupna cjepiva protiv HPV-a koja su primarna profilaksa i važno sredstvo za smanjenje pojavnosti HPV infekcije i njenih posljedica. Cjepiva su učinkovita protiv nekih, ali ne svih tipova virusa, te ne umanjuju potrebu za aktivnim sudjelovanjem u programu probira.

1.1. Humani papillomavirus – HPV

Virus je ikozaedralne strukture, promjera 55-60 nm. Otporan je na eter, 70 %-tni etanol, kiseline i toplinu, jer nema lipidnu ovojniju. Genom je statičan i mutacije su rijetke. Čini ga zatvorena, kružna, dvolančana DNK veličine 7800 do 7900 parova baza. Geni su podijeljeni na rano (eng. Early – E), kasno (eng. Late – L) i regulatorno (eng. Regulatory – R) područje. L područje kodira strukturu kapsidnih bjelančevina i to velikog L1 i malog L2. E područje sadržava zapise bjelančevina odgovornih za razmnožavanje virusa (E1 za replikaciju i E2 za transkripciju), vezanje za citokeratin (E4), staničnu transformaciju (E5 vezanje na receptor za čimbenik rasta) i onkogenezu (E6). Virus većinom zahvaća višeslojni pločasti epitel i transformacijsku zonu. Inficira epitel skrotuma, analnog kanala, cerviksa, vulve i perianalnog područja.

Danas je poznato više od 200 različitih tipova virusa, a više od 40 ih zahvaća spolni sustav. Tipovi se razlikuju prema redosljedu baza u području L1, ali samo ako je razlika veća od 10% nukleotidnih nizova. Različiti tipovi virusa imaju različiti tkivni tropizam te više ili manje preferiraju određena tkiva, npr. kondilome uzrokuju najčešće tipovi 6 i 11. HPV se dijeli na tipove visokog i niskog rizika s obzirom na molekularno-biološka svojstva i povezanosti s anogenitalnim malignomima. Visokorizični tipovi (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82) povezuju se s nastankom genitalnih i ekstragenitalnih karcinoma. Niskorizični tipovi (6,11,42,43,44,54,61,70,72,81 i CP6108) uzrokuju dobroćudne anogenitalne promjene i intraepitelne lezije vrata maternice niskog stupnja. Niskorizični tipovi 6 i 11 uzrokuju papilome nosne i usne šupljine i grkljana te iako su niskog rizika, smatraju se potencijalnim karcinogenima.



Slika 1. Genotipovi HPV-a

1.2. Epidemiologija infekcije HPV-om

HPV je najčešća spolno prenosiva bolest u svijetu, a ukupni broj oboljelih žena se procjenjuje na više od 290 milijuna. Prema CDC-u (engl. Centers for Disease Control and Prevention) učestalost HPV-a (među ženama ili u ukupnoj populaciji ?) iznosi 18,3%, u odnosu od 3,9% za klamidiju. Razlog tomu je i činjenica da se HPV izrazito lako prenosi u odnosu na ostale spolno prenosive bolesti. Vjerojatnost infekcije HPV-om pri jednom heteroseksualnom spolnom odnosu iznosi od 28 do čak 60%. Epidemiološke studije pokazuju da će oko 100 milijuna žena u svijetu bar jednom tijekom života biti zaraženo onkogenim tipovima HPV-a 16 ili 18. Oko 80% žena do 50. godine života dođe u kontakt s HPV-om. Unatoč visokoj stopi infekcije, gotovo 90% HPV infekcija nestaje spontano tijekom 24 mjeseca od prvog kontakta.

Najčešći tip HPV-a u svijetu je 16 iako se vrlo često izoliraju i tipovi 18, 39, 84, 51, 58, 31 i 52. HPV tipovi 16 i 18 uzrokuju 70% karcinoma vrata maternice.

U Splitsko-dalmatinskoj županiji, prema podacima Kaliterne i suradnika, 35% žena ima HPV u obrisku cerviksa. Prema dobi testiranih žena, najviše je HPV pozitivnih žena bilo u dobi između 25 – 34 godine (48,5%), dok ih je 19,5% bilo pozitivno u dobi mlađoj od 24 godine, a 32% HPV pozitivnih žena bile su starije od 34 godine. Od ukupnog broja testiranih žena njih 10,8% je bilo pozitivno na HPV-16, dok je HPV-18 bio zastupljen u 7,8% testiranih žena.

Najveća učestalost infekcije onkogenim tipovima virusa u muškaraca je u dobi od 30. do 34. godine, a neonkogenim HPV tipovima između 45. i 70. godine. Sveukupna učestalost infekcija svim tipovima u muškaraca najviša je u dobi između 30. i 39. godine. Trajanje HPV infekcije kraće je u muškaraca nego u žena te većina infekcija prolazi nakon godinu dana.

Stope prevalencije više su u imunosuprimiranih bolesnika i HIV-pozitivnih homoseksualaca.

Kožne bradavice (lat. *verrucae vulgares*) pojavljuju se u 10% djece, a najučestalije su u dobi od 12 do 15 godina.

1.2.1. Čimbenici rizika za HPV infekciju

Najvažniji čimbenici rizika za obolijevanje od HPV infekcije su:

- mlađa životna dob (do 25. godine)
- rana dob prvog spolnog odnosa (prije 16. godine)
- učestalo mijenjanje spolnih partnera
- pušenje cigareta
- dugotrajna uporaba oralnih kontraceptiva
- druge spolno-prenosive bolesti (klamidija, herpes simpleks tipa 2)
- kronične upale donjeg dijela spolnog sustava
- imunosuprimirana stanja

Smatra se da je rizik za HPV infekciju oko 50% u spolno aktivnih žena i muškaraca tijekom njihovih života. Najvažniji čimbenik rizika u žena je rizično spolno ponašanje. Dob je važan čimbenik rizika, a najveći rizik za infekciju imaju žene mlađe od 25 godina. Rizik za dobivanje HPV infekcije za žene pri prvom heteroseksualnom spolnom odnosu procjenjuje se na prosječno 28,5%.

I u muškaraca je rizično spolno ponašanje najvažniji čimbenik rizika, osobito veći broj spolnih partnera u posljednje vrijeme. Uporaba kondoma također je prepoznata kao čimbenik rizika, što se objašnjava slobodnijim spolnim ponašanjem uz zaštitu. Kondom ne pruža potpunu zaštitu s obzirom na to da ne prekriva u potpunosti područje kože potencijalno kontaminirano virusom (skrotum-vulva).

Hernandez i suradnici su u svojoj studiji pokazali kako je infekcija visokorizičnim tipovima virusa češća u neobrezanih muškaraca, navodeći zaštitni učinak cirkumcizije na HPV infekciju.

1.2.2. Način prijenosa HPV infekcije

Prijenos virusa ostvaruje se izravnim kontaktom kože spolnih partnera (penis/cerviks, skrotum/vulva, digitalno/analno, digitalno/vaginalno), neizravno putem kontaminiranih predmeta (ručnici, spužve, površine), autoinokulacijom iz okolnih područja kože, te prolazom ploda kroz inficirani porođajni kanal. U bolesnika s anogenitalnim karcinomom povezanim s HPV-om utvrđen je povišeni rizik za planocelularni karcinom tonzila povezan s ovim virusom, što govori u prilog genito-oralnom putu prijenosa.

Virus ulazi kroz oštećene dijelove kože i sluznice, koji mogu nastati spolnim odnosom.

Više studija je dokazalo mogućnost prijenosa bez vaginalne i/ili analne penetracije. Perianalno područje je često sijelo kontaminacije virusom, a pojava autoinfekcije u muškarca sa skrotuma ukazuje na mogućnost kako je i skrotalno područje rezervoar virusa.

Istraživači zaključuju kako je autoinokulacija moguća u obaju spolova, osobito u muškaraca.

1.3. Patogeneza HPV infekcije

Karcinom vrata maternice je drugi najčešći karcinom u žena diljem svijeta i jedan od vodećih uzroka smrti žena u zemljama u razvoju. HPV infekcija je najvažniji predisponirajući čimbenik razvoja predzloćudnih i zloćudnih promjena vrata maternice. Budući da je HPV otkriven u 99,7% karcinoma vrata maternice, smatra se da je infekcija HPV-om nužan uzrok razvoja karcinoma materničnoga vrata, ali nedovoljan sam za sebe.

Najvažniji poznati čimbenici i mehanizmi razvoja karcinoma materničnoga vrata su: infekcija HPV tipovima visokog rizika, visok broj virusnih čestica, perzistentna HPV infekcija, ugradnja virusne DNK u genom domaćina, ekspresija E6 i E7 onkoproteina i utjecaj drugih karcinogena.

Papilomavirusi su epiteliotropni virusi koji inficiraju bazalni sloj epitelnih stanica kože i sluznica. Smatra se da se infekcija pojavljuje na mjestima ozljede u proliferacijskom bazalnom sloju epitelnih površina. Životni ciklus virusa ovisi o diferencijaciji inficirane epitelne stanice. Ekspresijom produkata gena E6 i E7 u donjim slojevima epitelnih stanica inaktiviraju se tumor supresorski geni p53 i pRB (retinoblastom). To su antionkoproteini koji uvjetuju ulazak stanice u S-fazu mitotičke diobe, što uzrokuje proliferaciju stanice. Ekspresija produkata virusnih gena precizno je regulirana migracijom inficiranih bazalnih stanica prema površini epitela. Pod određenim okolnostima, oni dovode do potpunog gubitka kontrole proliferacije i diferencijacije inficiranih stanica i pojave malignih tumora. Papilomavirusi imaju izraženi tkivni tropizam, što uvjetuje raznolikost u lokalizaciji, tako da su HPV tipovi podijeljeni na kožne i mukozne tipove. Veliki broj HPV tipova izaziva tipične lokalne infekcije sluznica, manifestira se pojavom benignih papiloma, ali kod dijela inficiranih dolazi do razvoja karcinoma.

Mehanizam imunskog odgovora domaćina ima značajnu ulogu u kontroli i ograničavanju HPV infekcije. Smatra se da je HPV razvio mehanizam koji rezultira ne prepoznavanjem infekcije od strane domaćina i na taj način odgađanjem saniranja nastale infekcije. HPV ne lizira inficirane stanice i ne uzrokuje viremiju, što smanjuje izloženost virusnih antigena imunološkom sustavu domaćina i posljedično izostanak upale. Onkoproteini HPV-a imaju sposobnost transformiranja i preuredbe inficirane

stanice. Uloga onkoproteina E6 i E7 je inhibiranje proizvodnje interferona u NK (engl. natural killer) stanicama. E6 inaktivira staničnu regulacijsku bjelančevinu p53 odgovornu za popravak i apoptozu, a E7 inaktivira pRb što uzrokuje nekontroliranu diobu. Dok su funkcije E6 i E7 izražene tijekom infekcije stanice i neophodne su za održavanje transformiranog statusa stanice, ekspresija E5 pojavljuje se u ranoj fazi infekcije, prije početka virusne replikacije u dubljim slojevima inficiranog epitela. E5 je najmanji onkoprotein virusa, nalazi se u membranama endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata inficiranih stanica. E5 smanjuje količinu MHC (engl. major histocompatibility complex) molekula klase I na površini stanice, zadržavajući molekule unutar Golgijevog aparata, te je otežano prezentiranje inficiranih stanica imunološkom sustavu.

Razumijevanje patogeneze HPV-a olakšava terapijsku intervenciju usmjerenu prema HPV onkoproteinima (E5, E6, E7), koja će olakšati početnu eradicaciju lezije te odrediti smjer i razvoj infekcije.

1.4. Klinička slika infekcija uzrokovanih HPV-om

Klinička slika infekcije ovisi o tipu HPV-a, lokalizaciji infekcije i imunosnom statusu osobe.

HPV infekcije se mogu podijeliti:

- prema kliničkom tijeku: asimptomatske i simptomatske,
- prema mjestu promjene: kožne, anogenitalne i ostale,
- prema zloćudnom potencijalu promjena: benigne, premaligne i maligne.

Mogući simptomi su: svrbež, krvarenje, pečenje, osjetljivost, vaginalni sekret i bol.

Najčešći manifestni oblici infekcije su kondilomi (*condylomata acuminata* i *condylomata plana*) na vanjskom spolovilu, perineju i anogenitalnom području te koži ingvinalne regije i pubisa. Promjene se očituju u obliku egzofitičnih papuloznih, pendularnih ili papilomatoznih promjena sklonih konfluiranju i širenju u mokraćnu cijev, analni kanal i rodnicu.



Slika 2. Kondilomi na spolovilu

Tablica 1. Podjela infekcija s obzirom na mjesto promjene

Kožne
<i>verrucae vulgares</i>
<i>verrucae plantares</i>
<i>verrucae planae</i> (juvenilne)
<i>epidermodysplasia verruciformis</i>
Anogenitalne
<i>condylomata acuminata</i>
Buschke-Lowenstein tumor glansa penisa
predzloćudno-zloćudne promjene
Ostale
papilomi grkljana (najčešće tipovi 6 i 11)
rekurentna respiracijska papilomatoza (kod djece)
Hackova bolest (hiperplazija oralne sluznice)

Anogenitalne bradavice (lat. *Condylomata acuminata*) najčešće uzrokuje infekcija niskorizičnim tipovima HPV-a 6 i 11. Dobro se razvijaju u toploj i vlažnoj okolini. Najčešće su smještene na prepuciju, glansu penisa, labijama, vagini, uretri i oko anusa. Početna promjena (mala crvena ili bijela papula) rastom postaje izdužena bradavica na peteljci, ružičaste boje čijim spajanjem nastaju promjene slične cvjetači. Na mjestu pritiska, promjena se spljošti pa nastaje tzv. *pijetlova krijesta*. Velike vegetativne promjene često su macerirane i neugodna mirisa.

Subkliničke infekcije (latentne infekcije) su nevidljive okom, ali se mogu uočiti s pomoću 5 %-tne acetooctene kiseline i kolposkopa. Takve su lezije asimptomatske, no mogu ponekad uzrokovati iritaciju i upalu u obliku balanopostitisa ili vulvitisa.

U mlađih muškaraca mogu se pojaviti **preinvazivni karcinomi penisa** koje uzrokuje HPV tipa 16 (*Bowenoid papulosis* i *Erythroplasia Queyrat*). Klinička slika Bowenoidne papuloze očituje se promjenama sličnim genitalnim bradavicama, dok u eritroplazije Queyrat prevladavaju eritematozna, oštro ograničena područja baršunaste promjene. U oba entiteta histološki se nalazi spinocelularni karcinom *in situ*.

Perzistirajuća infekcija, koja se definira trajanjem infekcije dulje od dvije godine smatra se vodećim uzrokom **raka vrata maternice**. Oko 70% žena tokom godine dana od infekcije postaje HPV DNK negativna bez ikakva liječenja, a nakon dvije godine taj postotak raste na 90%. Perzistentna infekcija vodi progresiji u rak vrata maternice tek nakon prosječno od 8 do 15 godina.

Tablica 2. Kliničke manifestacije HPV infekcije podijeljene prema zloćudnosti lezije

Benigne
Bradavice (kondilomi ili veruke)
Ravni ili intraepitelni kondilomi
Divovski kondilomi
Premaligne
CIN – cervikalna intraepitelna neoplazija
AIS – adenokarcinom <i>in situ</i>
VAIN – vaginalna intraepitelna neoplazija
VIN – vulvarna intraepitelna neoplazija
PIN – penilna intraepitelna neoplazija
AIN – analna intraepitelna neoplazija
Maligne
karcinom cerviksa
karcinom anusa
karcinom vagine
karcinom vulve
karcinom penisa

CIN – Cervikalna intraepitelna neoplazija

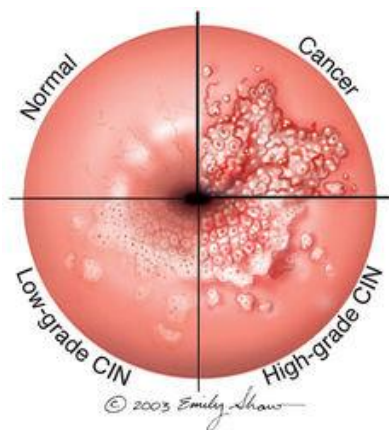
CIN predstavlja predstadij karcinoma cerviksa. Intraepitelni stadij označava pojavu diskariotičnih i atipičnih stanica unutar epitela cerviksa.

Diskariotične i atipične stanice su stanice čiji izgled manje ili više odstupa od normalnog izgleda, a ova odstupanja obuhvaćaju nejednakosti u obliku i veličini ne samo stanica već i njihovih jezgara, poremećaj sazrijevanja i odnosa citoplazma/jezgra,

različitu količinu i kvalitetu kromatina, izgled i broj nukleolusa, prisutnost mitozu, kao i način orijentacije jezgara.

Razlikuju se 3 stupnja CIN-a:

- **CIN 1 - blaga displazija:** predstavlja najblaži oblik cervikalne intraepitelne neoplazije. Promjene na stanicama ne zahvaćaju više od 1/3 debljine epitela, mjereno od bazalne membrane. Atipične stanice s atipičnim jezgrama su rijetke. Gornje 2/3 epitela su izdiferencirane, a tek po koja atipična stanica dopijeva na površinu epitela. U PAPA testu se nalazi diskarioza na superficijalnim stanicama
- **CIN 2 - umjerena displazija:** označava srednje teški poremećaj kod kojega su opisane promjene na stanicama nešto izraženije i prisutne su u donje 2/3 epitela. Prije svega se radi o poremećaju rasporeda i sazrijevanja stanica, uz vidljivu prisutnost nezrelih stanica, s povećanim sadržajem kromatina. Sazrijevanje epitela je izraženo najviše u gornjoj trećini epitela. U PAPA testu se nalazi diskarioza na superficijalnim i intermedijalnim stanicama
- **CIN 3 - teška displazija:** ova skupina promjena obuhvaća tešku displaziju CIS (Ca in situ), kao i atipične kondilomatozne promjene. Kod ovog tipa CIN-a nezrele displastične stanice se nalaze u više od 2/3 debljine epitela. Mnogobrojne su stanice s izrazitim promjenama na jezgrama. Znaci sazrijevanja i diferencijacije epitela nalaze se tek u gornjoj trećini epitela. U PAPA testu diskariotične stanice se nalaze u slojevima superficijalnih, intermedijalnih i parabazalnih stanica. CIS je prekanceroza s maksimalno izraženim citomorfološkim i histološkim znacima atipije. U potpunosti nedostaju znaci normalne građe epitela kao i sazrijevanje stanica. CIN 3 je predstadij karcinoma cerviksa, a maligni potencijal ovog stadija iznosi 30 - 45%. Period od pojave CIN-a 3 i razvoja karcinoma cerviksa najčešće iznosi oko 10 godina, ali su opisani i kraći vremenski intervali (1 - 3 godine).



Slika 3. Premaligne i maligne promjene epitela inficiranog HPV-om

VAIN - Vaginalna intraepitelna neoplazija

VAIN predstavlja intraepitelni stadij karcinoma vagine.

VAIN se najčešće javlja zajedno s već postojećim premalignim lezijama vulve i cerviksa. Zbog toga je važan detaljni pregled vagine u svim slučajevima displazije vulve ili cerviksa i obratno.

Razlikuju se 3 vrste VAIN-a:

- **VAIN 1 - blaga displazija:** promjene na stanicama u smislu diskeratoze ili atipije, odstupanja od normalnog izgleda stanice koja se mogu prikazati kao nejednakost u obliku i veličini ne samo stanica već i njihovih jezgara, poremećaju sazrijevanja i odnosa citoplazma/jezgra, različitoj količini i kvaliteti kromatina, izgledu i broju nukleolusa, prisutnosti mitoza, kao i načinu orijentacije jezgara. Ovakve promjene prisutne su samo u donjoj trećini epitela.
- **VAIN 2 - umjerena displazija:** opisane promjene na stanicama prisutne su u donje 2/3 epitela, a sazrijevanje epitela je izraženo najviše u gornjoj 1/3 epitela.
- **VAIN 3 - teška displazija:** obuhvaća tešku displaziju, CIS, kao i atipične kondilomatozne promjene. Kod ovog tipa VAIN-a nezrele displastične stanice se nalaze u više od 2/3 debljine epitela. VAIN 3 je predstadij karcinoma vagine.

VIN – Vulvarna intraepitelna neoplazija

VIN je premaligna displazija pločastog epitela vulve koja se može razlikovati od karcinoma epitela vulve time što ne prolazi epitelnu bazalnu membranu. Dok karcinom vulve nije čest, učestalost VIN-a je u porastu, osobito u mlađih žena.

Zloćudni potencijal VIN-a nije određen. Bez obzira na veličinu rizika, VIN visokog stupnja uobičajeno je liječiti zbog mogućnosti zloćudne preobrazbe. VIN se javlja sa simptomima svrbeži, pečenja, dugotrajne nelagode u području stidnice koji loše utječu na kvalitetu života i seksualnost.

Većina slučajeva VIN-a može se pripisati infekciji HPV-om podtipova 16 i 18.

1.5. Dijagnostika infekcija uzrokovanih HPV-om

Danas je prihvaćena važnost HPV testiranja u žena s nalazom atipičnih stanica neodređenog značenja u Papa-testu. To je službeni stav CDC-a (*Centers for Disease Control and Prevention*), ASC-a (*American Cancer Society*) i mnogih drugih uvažanih društava.

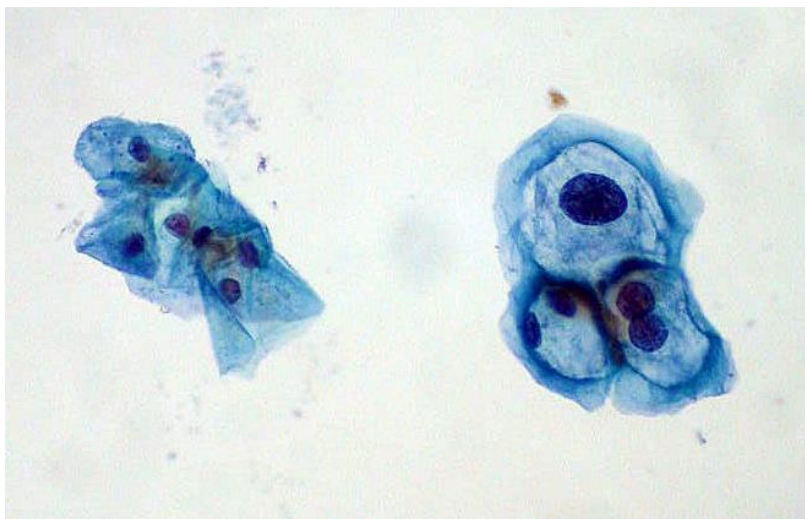
Kondilomi se dijagnosticiraju pregledom uz dobru rasvjetu.

Citološki se u Papa-testu kod infekcije HPV-om nalaze karakteristične promjene na stanicama tzv. koilociti, a njihovu pojavu uzrokuje umnažanje virusa. Koilocite karakterizira perinuklearna vakuolizacija citoplazme (prosvjetljenje citoplazme oko jezgre) i uvećana stanična jezgra.

Ako je rezultat Papa-testa dvojbjen, treba prema protokolu učiniti kolposkopiju, a po potrebi i biopsiju. Pomoćne dijagnostičke metode su uretroskopija i proktoskopija.

Detekcija virusa elektronskim mikroskopom ima vrlo nisku osjetljivost.

Imunokemijske metode koje detektiraju virusni antigen (L1) su imunofluorescencija i imunoperoksidaza-test.



Slika 4. Usporedba zdravih epitelnih stanica i inficiranih promijenjenih stanica – koilocita

Molekularne mikrobiološke metode su najbolji izbor u dijagnostici HPV infekcija. Jedino su molekularne metode dovoljno osjetljive i pouzdane za dokazivanje virusa i genotipizaciju. Tu se ubrajaju:

- *In Situ Hybridization* (ISH)
- *Southern Transfer Hybridization* (STH)
- *Hybrid Capture* (HC)
- *Dot Blot* (DB)
- *Filter Hybridization* (FH)
- ***Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Indikacije za biopsiju genitalnih promjena su: nesigurna dijagnoza, izostanak odgovora na standardno liječenje, brzo i učestalo vraćanje kondiloma nakon liječenja, promjene kod imunokompromitiranih bolesnika, lezija veća od 1 cm i atipija (pigmentacija, induracija, fiksacija za tkivo i ulceracija). Većina autora smatra da je indicirano izvoditi biopsiju kod žena starijih od 35 do 40 godina. U patohistološkom nalazu bioptata karakteristične promjene su koilocitoza, akantoza, parakeratoza i hiperkeratoza.

Mnogi bolesnici inficirani HPV-om su istovremeno inficirani i drugim spolno prenosivim bolestima pa mnogi preporučuju probir i na ove bolesti.

Neki od problema kod dijagnostike HPV infekcije su sljedeći: mnoge aceto-bijele lezije nisu uzrokovane HPV-om, histološke promjene uzrokovane infekcijom HPV-om nisu specifične te činjenica da HPV dijagnostika ne spada u rutinske dijagnostičke metode. Također, u diferencijalnoj dijagnostici treba razlikovati HPV infekciju od nekih drugih promjena kao što su kontagiozni moluskum, sekundarni sifilis, mikropapilomatoza vulve, saboroična keratoza i karcinom skvamoznih stanica.

1.6. Liječenje promjena uzrokovanih HPV-om

Antivirusni lijek licenciran za liječenje HPV infekcije još uvijek ne postoji.

Kožne bradavice u 60-70% slučajeva nestanu u razdoblju od 3-24 mjeseca bez liječenja.

Postoji niz različitih postupaka kojima se kondilomi manje ili više uspješno otklanjaju, no niti jedan nije metoda izbora, jer se u 30-70% slučajeva vraćaju tijekom 6 mjeseci od liječenja.

Liječenje se razlikuje prema postupku uspješnosti otklanjanja lezija, slobodnom razdoblju i vraćanju lezije, te prema cijeni i nuspojavama koje izaziva.

Liječenje se dijeli prema vrsti na:

- ablacijske zahvate (krioterapija tekućim dušikom, laserska terapija, ekscizija)
- imunomodulatore (imikvimod, interferon)
- sredstva koja djeluju fizički ili kemijski (podofilin, podofilotoksin, triklorooctena kiselina i 5-fluorouracil)
- antimikrobne lijekove (cidofovir i BCG) koji se sve više ispituju

Izbor načina liječenja ovisi o morfologiji, broju i rasprostranjenosti kondiloma. Mekani nekeratinizirani kondilomi dobro reagiraju na podofilotoksin, podofilin i triklorooctenu kiselinu. Keratinizirane kondilome je bolje liječiti fizikalnim ablativnim zahvatima (krioterapija, ekscizija ili elektrokauterizacija). Imikvimod je prikladan za oba tipa kondiloma. Manji broj malih kondiloma preporučljivo je liječiti ablativnim zahvatima.



Slika 5. Krioterapija

Preporuke za liječenje bradavica prema lokalizaciji:

- Koža anogenitalnog područja – liječenje kod kuće: podofilotoksin i imikvimod; liječenje u ustanovama: krioterapija, podofilin, triklorooctena kiselina, kirurška ekscizija. Alternativni preporučeni postupci: aplikacija interferona ili laserska kirurgija.
- Anus – triklorooctena kiselina, krioterapija, elektrokirurgija i laser.
- Uretralni otvor – krioterapija, elektrokirurgija, podofilotoksin ili imikvimod. Lezije dublje unutar uretre treba liječiti endoskopski pod kontrolom oka.
- Maternični vrat – ako nema intraepitelne neoplazije preporučuje se krioterapija ili triklorooctena kiselina. Ako su promjene tipa CIN-a preporučuje se elektroekscizija velikom omčom (engl. LETZ – Loop Excision of Transformation Zone) osobito za nerotkinje, ili opsežniji zahvat – konizacija prema protokolu.

Liječenje kod kuće preporučuje se podofilotoksinom tijekom 4 tjedna ili imikvimodom do 16 tjedana.

- Podofilotoksin – otopina 0,5 % primjenjuje se za kondilome penisa, a 0,15 %-tna krema za liječenje lezija vulve i anusa. Aplikira se svaki drugi dan, tijekom 3 tjedna ili 2 puta na dan, tijekom 3 dana, zatim 4 dana stanke, u 4 ciklusa. Kontraindiciran je u trudnica.
- Imikvimod – aplikira se 5 %-tna krema uvečer, ujutro se ispere (nakon 6-10 h). Primjenjuje se 3 puta tjedno, sve dok lezije ne nestanu, a najdulje 16 tjedana. Njegova primjena ne preporučuje se u trudnoći.

Liječenje u medicinskoj ustanovi

- Podofilin – primjenjuje se sve rjeđe zbog nastanka kemijskih opekline, alergija, teratogenog i onkogenog djelovanja dokazanog na životinjama. Kontraindiciran je u trudnoći te na lezijama cerviksa i anusa. Znatno je slabijeg učinka u otklanjanju lezija u odnosu na podofilotoksin.
- Triklorooctena kiselina – primjenjuje se 80-90 %-tna otopina jednom tjedno tijekom četiri tjedna. Uzrokuje nekrozu stanice, a nuspojave su bol, pečenje i ulceracija.
- 5-fluorouracil – blokira sintezu DNK. 5 %-tna krema primjenjuje se 5-7 dana, a ispire se 3-10 sati nakon aplikacije. U kombinaciji s adrenalinom ima bolji intralezijski učinak. Nuspojave su neovaskularizacija, pečenje, ima i teratogeni učinak pa je kontraindiciran u trudnica.
- Interferon – modulira imunosni odgovor, djeluje antiproliferativno i antiviralno. Primjenjuje se u obliku kreme ili se injicira u leziju, 3 puta tjedno tijekom 4 tjedna. Uporaba je ograničena zbog sustavnih nuspojava, promjenjivog učinka i visoke cijene.
- Cidofovir – antivirusni lijek koji se koristi u liječenju infekcije citomegalovirusom (CMV), ali smanjuje i ekspresiju E6 i E7 onkogeno HPV-a. Primjenjuje se u obliku 1 %-tne kreme, jedan put na dan, 5 dana, svaki drugi tjedan, najviše šest ciklusa, ispire se nakon 4 sata. Pokazala se učinkovitom i u liječenju displazije cerviksa kada se krema aplikira na cerviks, svaki drugi dan,

ukupno tri puta. Otopina 2,5 mg/mL primjenjuje se intralezijski svakih 14 dana, tri puta. Uspjeh uklanjanja kondiloma iznosi 47%.

- BCG – cjepivo za tuberkulozu. Provedeno je nekoliko ispitivanja u liječenju HPV infekcija. Lokalno primijenjen BCG u 10 bolesnika s kondilomima imao je terapijski odgovor u 6, djelomično u jednog i bez odgovora u 3 bolesnika.

Ablativne ili ekscizijske metode su efikasnije, no zahtijevaju anesteziju i ostavljaju ožiljak. Ekscizija je prikladna za uklanjanje manjeg broja keratiniziranih lezija. Lokalni anestetik, koji se daje prije ablativne terapije, treba primijeniti bez adrenalina ako se injicira u penis ili oko klitorisa.

- Krioterapija – tekućim dušikom primjenjuje se u tjednim intervalima. Može se primijeniti i za vrijeme trudnoće. Najčešće je prvi izbor liječenja.
- Laser – infracrvena koagulacija, koja se već primjenjuje za liječenje hemoroida, kroničnog rinitisa i uklanjanje tetovaža, sada se primjenjuje i za ablaciju promjena nastalih HPV infekcijom. Uspješnost uklanjanja je i do 82%, ovo je najskuplji postupak liječenja HPV infekcije.

1.7. Prevencija infekcija uzrokovanih HPV-om

Primarnu prevenciju protiv nekih od najvažnijih tipova HPV-a osigurava cjepivo koje je dostupno u dva oblika: bivalentno (*Cervarix*) i kvadrivalentno (*Gardasil*). U Hrvatskoj je odobrena primjena obaju profilaktičnih cjepiva. Cjepivo ne djeluje na sve tipove virusa. Nije uvršteno u kalendar obaveznog cijepljenja u Hrvatskoj. S obzirom na to, mjere zaštite poput odgovornog spolnog ponašanja, programi probira i testiranja na preinvazivne promjene vrata maternice i dalje su temeljna metoda prevencije infekcija HPV-om. Valja izbjegavati kontakt s potencijalno inficiranim osobama, pa i kontaminiranim predmetima. Čak ni stabilni monogamni odnosi ne jamče potpunu zaštitu, jer je HPV infekcija utvrđena i u osoba koje su imale samo jednog spolnog partnera tijekom života. Uporaba kondoma eventualno može smanjiti mogućnost infekcije vrata maternice, jer ne štiti od kontaktne infekcije koja se prenosi prstima, dodirom skrotum/vulva (odakle se širi na vaginu i cerviks). U literaturi je opisan učinak mikrobicida na infekciju HPV-om, kao i njihovo preventivno djelovanje na karcinom cerviksa (SDS - *sodium dodecyl sulfate* inaktivira HPV).

Sekundarna prevencija podrazumijeva probir na promjene uzrokovane HPV-om te liječenje preinvazivnih promjena vrata maternice. Promjene sporo progrediraju i danas se lako i uspješno liječe. Važno je istaknuti kako se u žena koje aktivno sudjeluju u programima probira ovaj karcinom gotovo nikad ne razvije. Program sekundarne prevencije podrazumijeva redoviti odlazak na ginekološki pregled, Papa-test i HPV testiranje.

1.7.1. Cjepivo protiv HPV infekcije

HPV cjepivo pruža mogućnost primarne prevencije HPV infekcija i njenih posljedica, uključujući premaligne i maligne promjene materničnog vrata, ostale anogenitalne malignome i genitalne bradavice. Bivalentno cjepivo djeluje na tipove 16 i 18, a kvadrivalentno uz tipove 16 i 18, djeluje i na tipove 6 i 11. Uz navedene tipove virusa, 9-valentno cjepivo djeluje još i na tipove 31, 33, 45, 52 i 58. Dosad provedene kliničke studije pokazale su izuzetnu učinkovitost cjepiva.

Cjepivo je odobreno za primjenu samo u ženskih osoba u dobi od 9 do 26 godina, jer je prema istraživanju u ovoj dobi cjepivo imunogeno i sigurno za primjenu. S obzirom da je HPV infekcija spolno prenosiva bolest preporuča se cijepiti prije prvog spolnog odnosa, a preporučena dob je između 11 i 12 godina. Preporuke za rutinsko cijepljenje djevojčica u ovoj dobi temelje se na dokazima o učinkovitosti i sigurnosti cjepiva, podacima o sve većoj učestalosti HPV infekcija, sve ranijem stupanju u spolne odnose te visokoj vjerojatnosti infekcije u prvim godinama nakon početka spolne aktivnosti. Iako je preporuka o primjeni cjepiva između 11. i 12. godine, korisno je cijepiti žene u dobi između 13 i 26 godina.

Potvrđena je učinkovitost cjepiva najmanje pet godina, no smatra se da je to djelovanje puno dulje te su u tijeku daljnja praćenja.

Ako su žene već zaražene nekim od tipova virusa, zaštitit će se od infekcije i posljedica uzrokovanih ostalim tipovima virusa na koje cjepivo djeluje. Iako je ukupna učinkovitost cjepiva manja u spolno aktivnih žena, većina žena i u ovoj skupini ostvarit će barem djelomičnu korist od cijepjenja.

Važno je napomenuti kako je cjepivo profilaksa, a ne liječenje, kao i da ne djeluje na sve tipove virusa. Zbog toga su metode prevencije u obliku seksualne edukacije, odgovornog spolnog ponašanja i redovitih ginekoloških pregleda i kontrola i dalje od temeljnog značenja za prevenciju infekcija uzrokovanih HPV-om.



Slika 6. Gardasil – kvadrivalentno cjepivo dostupno u Hrvatskoj

Doziranje i način primjene

Cjepivo se primjenjuje intramuskularno u tri odvojene doze po 0,5 mL. Druga doza se daje dva mjeseca nakon prve, a treća doza šest mjeseci nakon druge doze.

Sastav cjepiva

Riječ je o rekombiniranom cjepivu koje ne sadrži živi virus. Cjepivo djeluje putem bjelančevine L1. To je velika kapsidna bjelančevina koja ima ulogu antigena te potiče stvaranje protutijela, a ne može uzrokovati infekciju. Pročišćena L1 bjelančevina je integrirana u tzv. dijelove nalik virusu, kako bi ih organizam lakše prepoznao. Cjepivo je adsorbirano na adjuvans koji dodatno ubrzava i pojačava reakciju.

Učinkovitost cjepiva

Velike međunarodne, randomizirane, dvostruko slijepe studije provedene na ženama u dobi od 16. do 23. godine dokazale su visoku učinkovitost cjepiva na prevenciju perzistentnih infekcija uzrokovanih HPV tipovima 6, 11, 16 i 18, nastanak cervikalne intraepitelne neoplazije uzrokovane navedenim tipovima i pojavu ekstragenitalnih lezija. Nema dokaza da cjepivo štiti od ostalih tipova virusa.

Učinkovitost cjepiva na prevenciju perzistentnih infekcija uzrokovanih tipovima 6, 11, 16 i 18 procjenjuje se na 89,5 %.

Djelovanje cjepiva u sprječavanju nastanka CIN-a bilo kojeg stupnja (povezan sa spomenutim HPV tipovima) iznosi čak 100 %.

Učinkovitost cjepiva u sprječavanju nastanka genitalnih bradavica iznosi 98,9 %.

Učinak cjepiva na infekciju i tijek infekcije, koja postoji u vrijeme cijepjenja, još se ispituje.

Gardasil 9 cjepivo

Gardasil 9 je novo adjuvantno neinfektivno 9-valentno rekombinirano cjepivo. Pripremljeno je od visokopročišćenih čestica nalik virusu glavnog L1 proteina kapside četiri tipa HPV-a (6, 11, 16 i 18) kakva sadrže kvadrivalentna cjepiva Gardasil ili Silgard i 5 dodatnih tipova HPV-a (31, 33, 45, 52 i 58).

Cjepivo je indicirano za primjenu u oba spola u dobi od 9-26 godina. Ako se osobe cjepe u dobi od 9-14 godina u vrijeme prve injekcije s Gardasilom 9 može se primijeniti 2-dozni raspored. Drugu dozu treba primijeniti između 5 i 13 mjeseci nakon prve doze.

Za osobe starije od 15 godina u vrijeme prve injekcije Gardasil 9 treba primijeniti 3-dozni raspored. Drugu dozu treba primijeniti najmanje mjesec dana nakon prve doze, a treću dozu treba primijeniti najmanje 3 mjeseca nakon druge doze. Sve tri doze moraju se primijeniti unutar razdoblja od godine dana.

Osobe koje su prethodno bile cijepljene prema 3-doznom režimu kvadrivalentnog cjepiva protiv tipova 6, 11, 16 i 18 HPV-a (Gardasil), mogu primiti i 3 doze cjepiva Gardasil 9 kao dodatnu zaštitu protiv HPV tipova koje ne sadrži kvadrivalentno cjepivo.

Trajanje zaštite

Prema dosadašnjim rezultatima cjepivo bi trebalo pružiti dugotrajnu zaštitu. Uz dugotrajnu zaštitu ovo cjepivo ima i anamnestički odgovor, odnosno brzi porast titra protutijela neposredno nakon docjepljenja. Postojeće studije potvrdile su petogodišnje trajanje imunizacije, a daljnja istraživanja provode se s ciljem točnog utvrđivanja trajanja zaštite. Rezultati studija koje su u tijeku pokazat će postoji li potreba za davanjem tzv. *booster* doze nakon pet godina od cijepljenja.

Sigurnost i nepoželjni učinci

Nepoželjni učinci uglavnom su vezani za mjesto primjene cjepiva. Najčešće nepoželjne pojave bile su bol na mjestu primjene, oteklina i crvenilo na mjestu primjene. U većine cijepljenih ove pojave su bile blagog intenziteta i kratkog trajanja. Više prijavljenih nuspojava pojavilo se nakon prve doze u odnosu na drugu i treću dozu.

Zasad se ne preporučuje cijepiti trudnice iako nisu pronađeni dokazi o negativnom učinku na trudnoću i fetus. Ženama koje su primile prvu dozu i naknadno otkrile trudnoću savjetuje se pričekati s ostalim dozama nakon završetka trudnoće. U žena koje su dojile tijekom ili nakon primjene doza nisu utvrđene nikakve štetnosti koje bi se dovele u vezu s cjepivom.

Cjepivo nije odobreno za primjenu djevojčicama mlađim od 9 godina i ženama starijim od 26 godina. U tijeku su istraživanja o primjeni cjepiva za žene starije od 26 godina.

Cjepivo će zaštititi samo od onih bolesti koje su uzrokovane tipovima HPV-a protiv kojih je cjepivo usmjereno. Stoga treba nastaviti primjenjivati odgovarajuću zaštitu od spolno prenosivih bolesti. Cjepivo je samo za profilaktičku primjenu i ne djeluje na aktivne HPV infekcije ili klinički razvijenu bolest. Nije utvrđeno da cjepivo ima terapijski učinak. Stoga ovo cjepivo nije indicirano za liječenje karcinoma.

Ženama koje su cijepjene također se provode redovite ginekološke kontrole i probir prema preporukama za prevenciju premalignih i malignih promjena vrata maternice, zbog mogućnosti infekcije HPV tipovima koji nisu uključeni u cjepivo, a mogu uzrokovati karcinom.

2. CILJ RADA

Rad je izrađen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko - dalmatinske županije (NZJZ SDŽ), u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i dijagnostiku infekcija spolnog sustava

Cilj rada je bio dijagnosticirati Humani papilomavirus na uzetom uzorku, u svrhu pravodobnog liječenja i sprječavanja razvoja komplikacija koje virus može uzrokovati.

Kako je HPV infekcija često bez simptoma, pravodobna dijagnoza je od osobite važnosti s obzirom na to da infekcija može uzrokovati teške komplikacije i najvažniji je poznati predisponirajući čimbenik za razvoj karcinoma vrata maternice.

Metode dijagnostike stoga trebaju biti što osjetljivije i specifičnije, a za žene jednostavne i neinvazivne.

PCR je vrlo mlada laboratorijska metoda s obzirom da je svoj razvoj započela sredinom 80-ih godina prošlog stoljeća. Danas se koristi na gotovo svim poljima dijagnostike i znanstveno istraživačkog rada zahvaljujući svojoj superiornosti u usporedbi s tradicionalnim tehnikama.

3. IZVORI PODATAKA

Izvori podataka su rezultati rutinskog rada Odjela za molekularnu dijagnostiku i dijagnostiku infekcija spolnog sustava NZJZ SDŽ.

Tablica 3. Broj uzoraka pozitivnih na HPV po genotipu od ukupnog broja testiranih u 2016. godini u NZJZ SDŽ

	Broj uzoraka	Postotak
POZ HPV 16	179	6,2 %
POZ HPV 18	33	1,1 %
POZ ostali visokorizični HPV	576	20,0 %
POZ HPV 16 + 18	3	0,1 %
POZ HPV 16 + ostali	100	3,5 %
POZ HPV 18 + ostali	27	0,9 %
POZ HPV 16 + 18 + ostali	8	0,3 %
Ukupno testiranih uzoraka	2878	100 %
Pozitivni uzorci	926	32,1 %
Negativni uzorci	1952	67,9 %

U ovom laboratoriju tijekom 2016. godine testirano je ukupno 2878 uzoraka obrisaka cerviksa na visokorizične tipove HPV-a, molekularnom metodom – PCR, od kojih je 926 (32,1 %) bilo pozitivno na bar jedan visokorizični tip HPV-a.

Broj višestrukih infekcija visokorizičnim tipovima HPV-a iznosi 138, što predstavlja 4,8 % od ukupnog broja testiranih uzoraka. Postotak uzoraka pozitivnih na sve testirane visokorizične tipove HPV-a je izrazito mali, svega 0,3 %, odnosno 8 uzoraka od ukupnog broja testiranih.

Prema navedenim podacima (Tablica 3), od ukupno 2878 testiranih uzoraka najveći broj pozitivnih, 711 (24,7 %), bilo je pozitivno na jedan ili više tipova u skupini ostalih visokorizičnih tipova HPV-a (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68).

Od ukupnog broja testiranih uzoraka njih 290 (10,1 %) bilo je pozitivno na HPV 16 samostalno ili u kombinaciji s ostalim HPV tipovima, a 2,5 % odnosno 71 uzorak bio je pozitivan na HPV tip 18.

4. METODE DIJAGNOSTIKE HPV - INFEKCIJE

Dijagnostika infekcija uzrokovanih *Human papillomavirusom* provodi se molekularnom metodom **RealTime PCR** - *Polymerase Chain Reaction* (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu).

DNK polimeraza je višefunkcionalna molekula, no njena glavna uloga je sinteza novih dijelova DNK u smjeru 5'-3' dodajući dNTP na 3' hidroksilnu skupinu rastućeg lanca. Ovaj enzim treba početnicu radi pokretanja sinteze niza komplementarnih DNK, odnosno za početak polimerizacije. U molekularnoj biologiji primjenjuje se DNK polimeraza da bi se izazvala lančana reakcija polimeraze čime se povećava količina molekula DNK.

4.1. Povijest lančane reakcije polimeraze

Povijest lančane reakcije polimeraze (PCR) je opisana kao klasična "Eureka!" ili kao primjer kooperativnog timskog rada između različitih istraživača. Nakon što su Watson i Crick opisali DNK strukturu 1953. godine uslijedila su brojna istraživanja. Vrijedi istaknuti istraživanje Khorana i njegovih kolega koji su 1971. godine opisali pristup za replikaciju područja dvostruke DNK uzvojnice koristeći dvije DNK sintezne početnice osmišljene tako da su njihovi 3' krajevi istaknuti jedan prema drugom. No, za izum PCR metode zaslužan je dr. Kary Mullis iz Odjela za humanu genetiku korporacije Cetus. On je sasvim slučajno, 1983. godine, tijekom noćne vožnje prema Kaliforniji došao do najjednostavnijeg rješenja za sve primjene. On je shvatio osnovnu ideju za PCR, točnije lančanu reakciju polimeraze. Deset godina kasnije, dr. Mullis je dobio Nobelovu nagradu za kemiju, istaknuvši važnost te jednostavne ideje. U časopisu *Science* 1985. godine objavljen je rad u kojem prvi put opisuju tehniku specifičnog umnožavanja fragmenta DNK in vitro kataliziranog enzimom DNK polimeraze porijeklom iz *Escherichia coli*. U istom časopisu 1988. godine isti tim znanstvenika publicira rad u kojem umjesto navedene polimeraze *E. coli* uvode termostabilnu polimerazu izoliranu iz bakterije *Thermus aquaticus* (Taq). Unatoč brojnim modifikacijama, raznovrsnim primjenama i automatizaciji procesa lančane sinteze polimerazom, osnovne odrednice ove tehnike utemeljene 1985. godine i 1988. godine nisu se značajnije izmijenile.

4.2. Uzorkovanje

Za dijagnostiku HPV infekcije metodom RealTime PCR kao uzorak koristi se obrisak cerviksa.

Napomena:

- uzorkovati obrisak za PAPA test prije uzimanja uzorka za DNK testiranje
- uzorkovati obrisak za DNK testiranje prije premazivanja octenom kiselinom ili jodom, ako se radi kolposkopija
- uzorak za ovu pretragu potrebno je poslati u transportnom mediju za PCR – *The ThinPrep PAP TEST*, koristeći četkicu za uzorkovanje (Cervex brush)

Za ispravno izvođenje testa potrebno se striktno pridržavati uputa za uzimanje uzorka za molekularnu dijagnostiku.

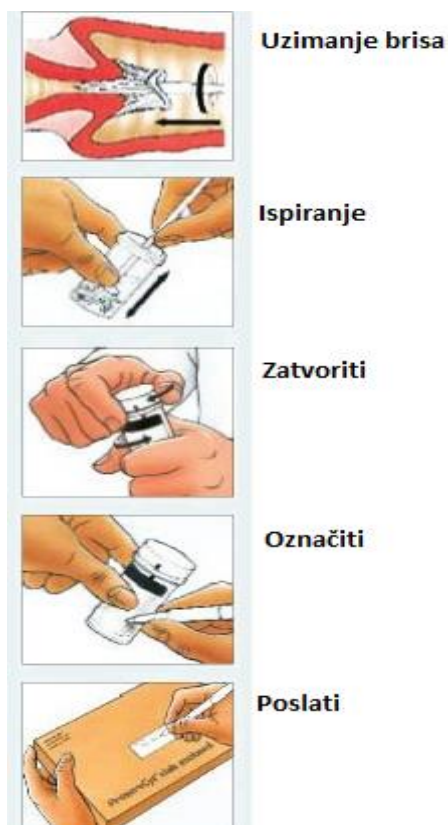
Za uzorkovanje i transport uzorka koristi se komplet *The ThinPrep PAP TEST*, kojeg čini *PreservCyt Solution*, transportna bočica i dvije četkice koje se po završetku uzorkovanja odbacuju. *PreservCyt Solution* je originalna otopina koja se koristi za transport i pohranu uzorka obriska cerviksa za molekularnu dijagnostiku infekcija HPV-a testom *Cobas 4800 HPV Test*. Otopina sadrži metanol i otopinu pufera koji služe za pohranu uzorka te čini stanice i DNK u uzorku stabilnima do 6 mjeseci na temperaturi od 2 – 30 °C.



Slika 7. Transportni medij za uzimanje uzorka obriska cerviksa

4.2.1. Uzorkovanje obriska cerviksa za molekularnu pretragu na HPV metodom RealTime PCR

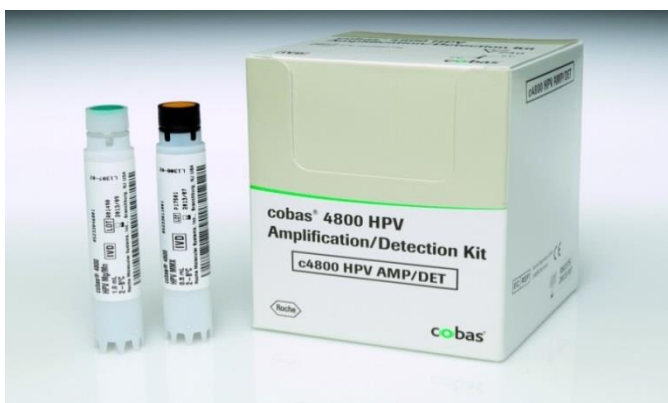
- uvući centralna vlakna četkice u endocervikalni kanal dovoljno duboko da kraća vlakna četkice budu u kontaktu s ektocerviksom, lagano pritiskati i okretati četkicu 5 puta u smjeru kazaljke na satu
- odmah nakon uzorkovanja isprati četkicu u transportnom mediju pritiskujući četkicu u dno transportnog medija 10 puta tako da se vlakna razdvoje, zatim energično zavrtati četkicu u mediju kako bi se cijeli uzeti sadržaj stanica oslobodio u medij
- odbaciti četkicu
- zatvoriti transportnu bočicu pazeći da navoji čepa dobro prionu da ne bi došlo do prolijevanja tijekom transporta
- na bočicu i uputnicu pravilno napisati potrebne podatke, poslati u laboratorij



Slika 8. Uzorkovanje obriska cerviksa za molekularnu dijagnostiku

4.3. Potrebni reagensi za izolaciju i amplifikaciju ciljne sekvence virusne DNK

1. cobas 4800 System Sample Preparation Kit (komplet otopina za pripremu uzoraka)
 - MGP cobas 4800 System Magnetic Glass Particles (sustav sa česticama magnetskog stakla)
 - EB cobas 4800 System Elution Buffer (sustav pufera za ispiranje)
2. cobas 4800 HPV Amplification/Detection Kit (komplet za amplifikaciju/detekciju DNK)
 - HPV MMX cobas 4800 HPV Master Mix
 - HPV Mg/Mn cobas 4800 HPV Mg/Mn Solution
3. cobas 4800 HPV Controls Kit (kontrola)
 - HPV (+) C cobas 4800 HPV Positive Control
 - HPV (-) C cobas 4800 System Negative Control
4. cobas 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit (komplet otopina za pripremu uzorka tekućinske citologije)
 - PK cobas 4800 Proteinase K
 - SDS cobas 4800 System SDS Reagent (deterdent koji otapa membranu i oslobađa DNK)
 - LYS cobas 4800 System Lysis Buffer
5. cobas 4800 System Wash Buffer Kit



Slika 9. HPV amplification/detection kit reagensi

4.4. Pribor i aparati

Roche Cobas 4800 sastoji se od:

- cobas 4800 software i kontrolna jedinica
- cobas x480 aparat
- cobas z480 analizator (thermocycler)

Cobas 4800 software i kontrolna jedinica

Software radi s posebnom kontrolnom jedinicom. Program vodi korisnika kroz cijeli proces od pripreme uzorka do amplifikacije i otkrivanja DNK te na kraju interpretacije rezultata. Ručni barkod čitač spojen je na kontrolnu jedinicu. Koristi se za skeniranje uzoraka i reagensa te za podešavanje radnih naloga.

Cobas sustav može biti spojen s laboratorijskim informacijskim sustavom (LIS). U tom slučaju nalozi se automatski preuzimaju iz LIS-a nakon što su uzorci stavljeni u Cobas aparat.



Slika 10. Cobas x480 aparat i računalo, Cobas 4800 software

4.5. Postupak rada

Priprema uzoraka:

- dobro promiješati (vortex) uzorak prije stavljanja u aparat
- krvavi i gnojni uzorci nisu prikladni za analizu
- uzorke iz hladnjaka otopiti na sobnoj temperaturi



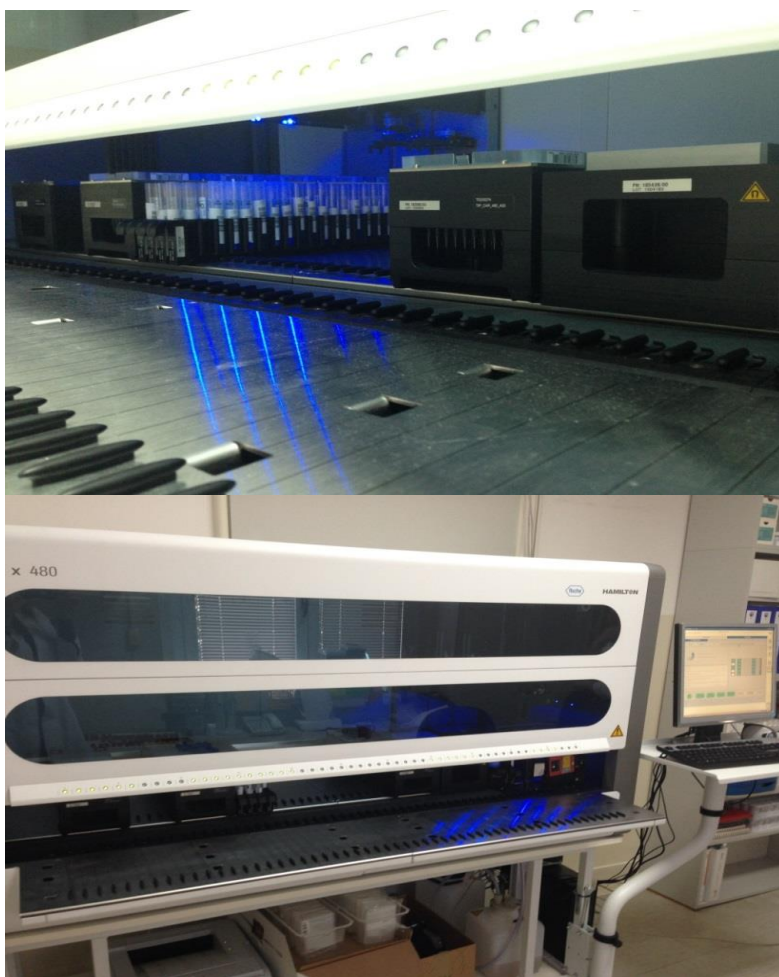
Slika 13. Vortex za uzorke

Cobas x480 aparat

U aparatu Cobas x480 odvija se prvi dio metode, priprema uzorka za amplifikaciju u termobloku. U aparat se stavljaju uzorci u originalnom transportnom mediju, reagensi i potrošni materijal. Radni proces automatske pripreme uzorka odvija se u tri faze:

1. punjenje aparata reagensima, uzorcima i potrošnim materijalom
2. automatska izolacija čiste DNK
3. automatsko dodavanje reakcijske smjese (Master Mix) izoliranoj DNK

Nakon ovog postupka uzorci se nalaze u mikrotitarskim pločicama i spremni su za postupak amplifikacije i detekcije DNK u PCR termobloku Cobas z480.



Slika 11. Roche Cobas x480 aparat

Cobas z480 analizator

Cobas z480 analizator (termoblok) točnim i preciznim promjenama temperature kroz tri koraka PCR reakcije umnaža ciljnu sekvencu DNK u mikrotitarskim pločicama. Analizator koristi fluorescentni signal za detekciju umnoženih nukleinskih kiselina koristeći metodu RealTime PCR. Proces je u potpunosti automatiziran, osim dijela stavljanja i vađenja mikrotitarskih pločica.



Slika 12. Roche Cobas z480 aparat

4.6. Princip metode - PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR - "*Polymerase Chain Reaction*" (lančana reakcija polimerazom) predstavlja replikaciju (prepisivanje, umnažanje) DNK molekula in vitro. To je metoda kojom se relativno kratki dio DNK umnaža u veliki broj identičnih kopija. Metoda je u osnovi vrlo jednostavna. Ciljni dio DNK molekule koju želimo umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama – početnicama (*primeri*), koji su komplementarni krajevima dijela DNK koju želimo umnožiti. Ovi primeri su pokretači serijske reakcije pomoću enzima DNK *Polymeraze*, koja na kalupu jednog DNK lanca sintetizira novi komplementarni lanac. Pri tomu dužina sintetiziranog dijela DNK molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrani primeri.

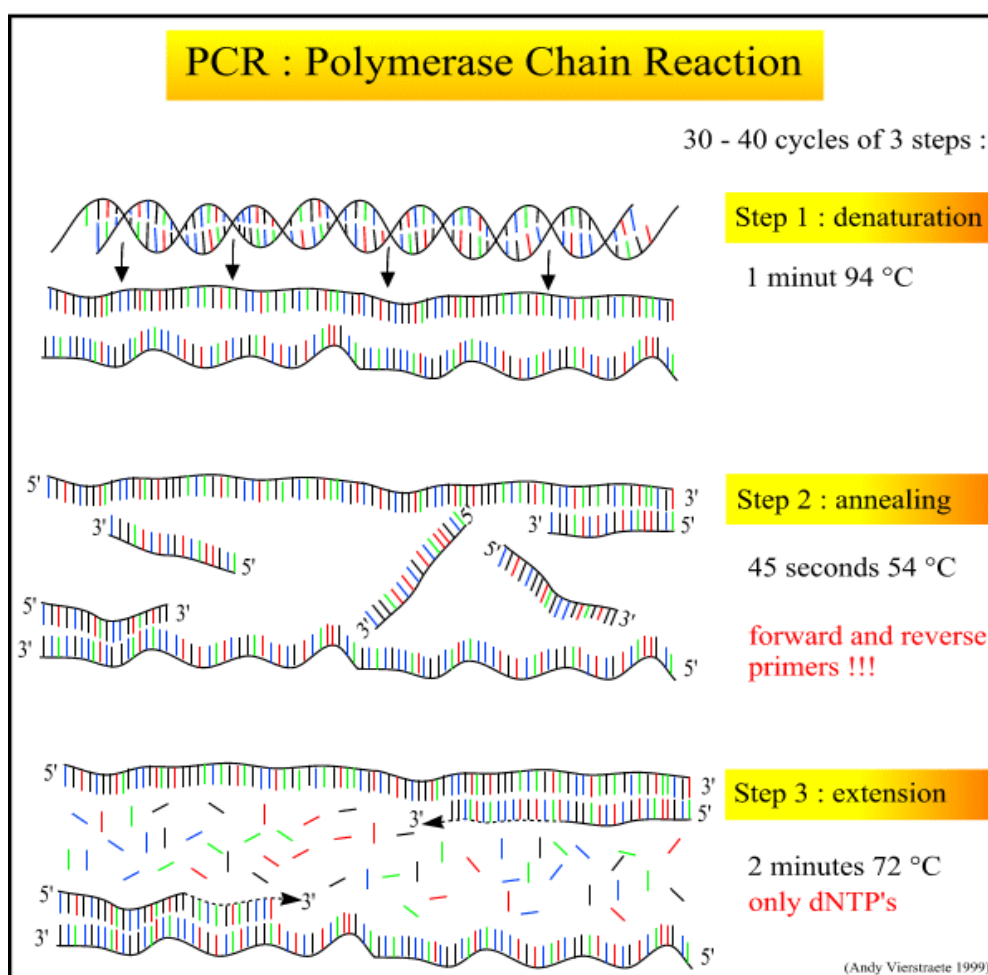
PCR ili lančana reakcija polimerazom je reakcija koja koristi nekoliko osnovnih molekularnih reagensa kako bi se stvorile brojne kopije DNK fragmenata. U početku je koncentracija DNK jako mala, ali tijekom procesa se koncentracija eksponencijalno povećava i sve kopije postaju novi kalupi za umnožavanje. Za replikaciju kompletnog genoma potreban je cijeli niz različitih proteina. Koncentracija reaktanata se stalno mijenja tijekom reakcije jer neki reaktanti, primjerice DNK polimeraza, mogu djelovati ograničavajuće, to jest mogu zaustaviti proces. Također, značajne su oscilacije u temperaturi i pH vrijednosti što značajno utječe na dinamiku molekularnih interakcija. Puno faktora utječe na ovaj proces i čini ga jako kompliciranim. Međutim, ovaj proces ima ogromnu važnost za obradu DNK i njenu analizu.

Replikacija DNK se odvija tako da se najprije dvolančana DNK rastavlja na dva lanca te oni postaju kalupi za formiranje novog dvostrukog lanca. Proces se odvija na semikonzervativan način tako da svaka nova molekula DNK sadrži jedan roditeljski lanac DNK i jedan novosintetizirani lanac DNK. Kopiranje i stvaranje novih lanaca odvija se na točno određeni način sa točno određenim enzimima od kojih su najvažnije nukleaze, ligaze i polimeraze. Najvažniji dio tog procesa je specifičnost sparivanja nukleotida. Radi se o purinskim i pirimidinskim bazama, od kojih se timin uvijek spaja s adeninom, a gvanin s citozinom. Velik broj proteina i molekula, primjerice primeri, su neophodni za efikasnu i točnu replikaciju. Primeri obično sadrže oko dvadeset nukleotida. Za odmotavanje DNK u stanici koriste se mnogi enzimi i proteini, ali u

polimeraznoj lančanoj reakciji je to zamijenjeno zagrijavanjem te kidanjem vodikovih veza između parova baza Taj proces naziva se denaturacija.

Naravno, nijedan proces ne može imati 100 % učinkovitost pa tako ni ovaj, stoga je većinom potrebno napraviti 25 do 40 ciklusa. PCR je jako specifična i efikasna metoda u kojoj od malog broja DNK molekula dobivamo veliku količinu nosintetiziranih molekula (često mikrogram i više).

PCR se izvodi ponavljanjem u 30-40 ciklusa od kojih se svaki sastoji iz tri osnovne faze na tri različite temperature.



Slika 14. Shematski prikaz PCR metode

1. Razdvajanje lanaca DNK (*denaturation*):

Inicijalno denaturiranje DNK u trajanju od jedne minute na temperaturi od 94 °C.

Pri tome se razdvajaju sparni lanci dvolančane DNK, koji potom služe kao kalupi za amplifikaciju, a sve enzimske reakcije se zaustavljaju.

2. Sparivanje početnica s komplementarnim dijelovima DNK (*annealing*):

Hibridizacija primera na komplementarne dijelove DNK (eng. *annealing*).

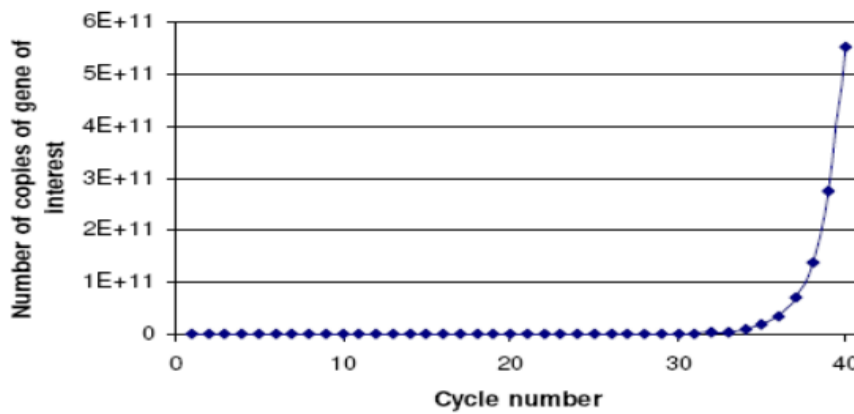
U tom procesu se temperatura snižava na prosječno 55 °C (50–60 °C), te se oligonukleotidni primeri vežu na komplementarne razdvojene lance DNK. Ova faza traje oko 45 sekundi u zavisnosti od dužine primera, jer je dužim primerima potrebno duže vrijeme za vezivanje.

3. Produljenje lanca (*extension*):

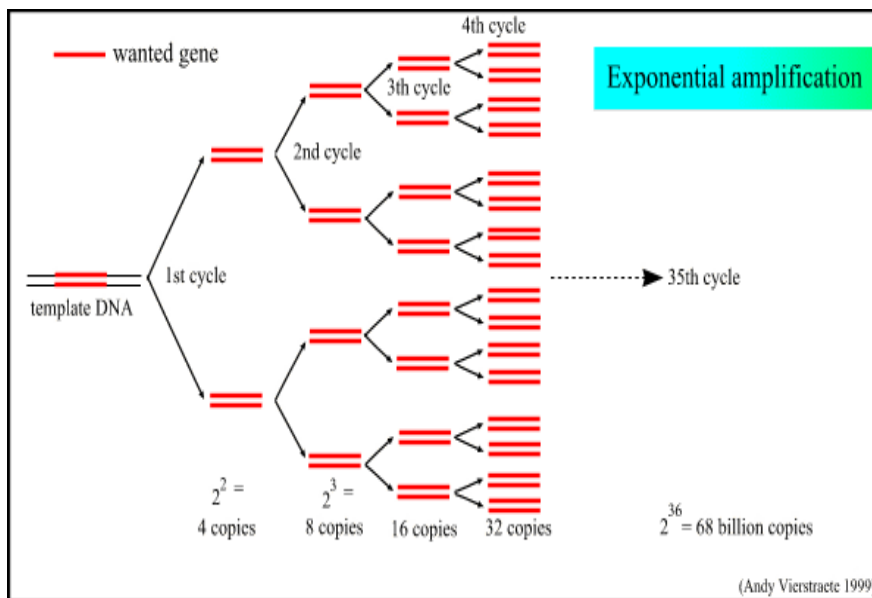
Sinteza komplementarnog lanca (eng. *extension*) na temperaturi od 72 °C.

Na ovoj temperaturi Taq polimeraza započinje polimerizaciju i dostiže maksimum aktivnosti. Trajanje ove faze zavisi od dužine fragmenta koji se želi umnožiti i iznosi 1–2 minute. Budući da se na oba lanca odvija sinteza, u jednom ciklusu amplifikacije će se broj DNK molekula udvostručiti. Postupak možemo u cijelosti ponavljati i na taj način broj novonastalih molekula DNK će se uvećavati geometrijskom progresijom (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64,...).

Reakcija će konačno biti ohlađena na 4 °C.



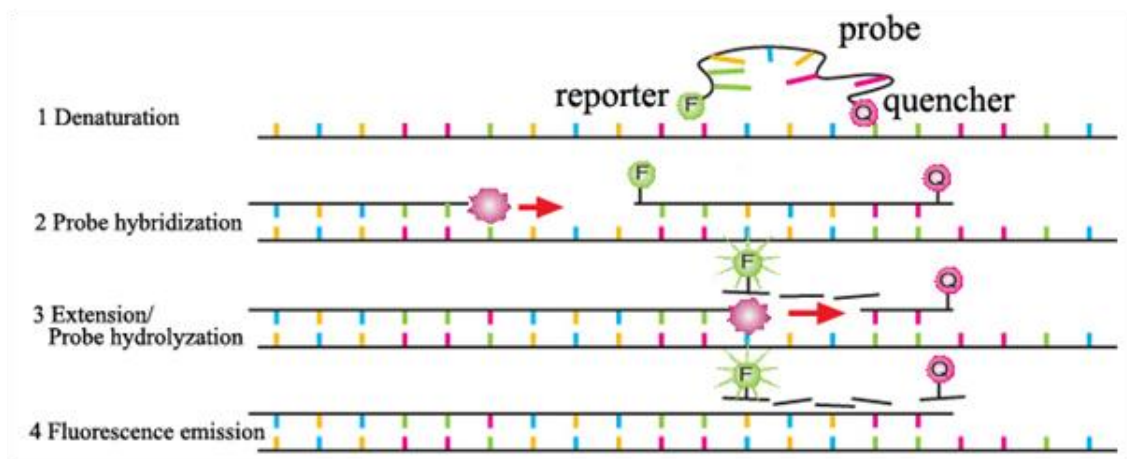
Slika 15. Broj kopija DNK u odnosu na broj ciklusa



Slika 16. Eksponencijalno povećanje broja DNK molekula tijekom amplifikacije

4.7. Detekcija umnoženih sekvenci


Cobas 4800 HPV Test koristi real-time PCR tehnologiju. Svaka oligonukleotidna proba u reakciji je označena fluorescentnom bojom koja služi kao *reporter*, te s *quencherom* koji sprječava emisiju fluorescentne boje dok se proba ne veže za lanac DNK. Kako amplifikacija napreduje, probe koje su komplementarne vežu se na sekvence razdvojenih lanaca DNK. Aktivnost polimeraze odcjepljuje *reporter* od *quenchera*. Kada se pobudi određenim spektrom svjetlosti, slobodni *reporter* emitira fluorescentno svjetlo točno određene valne duljine. Oligonukleotidne probe su označene različitim bojama i emitiraju svjetlo različitih valnih duljina ovisno o tipu virusa, tako razlikujemo HPV-16, HPV-18, ostale visokorizične tipove i β – globin koji služi kao kontrola kvalitete uzorka.



Slika 17. Shematski prikaz vezanja fluorescentno obilježenih proba i oslobađanja reportera od quenchera

4.8. Izgled konačnih rezultata i gotovog nalaza

NZJZ Split

cobas® 4800 

cobas HPV Test Report

Start of run:	06-Apr-2017 08:38:48	Lysis Buffer Lot/Exp:	X00728 / Mar-2018
System:	c4CZC34155S1	MGP Lot/Exp:	X02511 / Mar-2018
Serial No.:	x 480: 6168 / z 480: 51526	Elution Buffer Lot/Exp:	X08869 / Jun-2018
Test version:	2.0.0	Proteinase K Lot/Exp:	W15501 / Aug-2017
Operator:	Laboperator1	Positive Control Lot/Exp:	X02534 / Mar-2018
MWP ID:	ID3026171	Negative Control Lot/Exp:	X02539 / Mar-2018
DWP ID:	IA0732409	Master Mix Lot/Exp:	X01647 / Mar-2018
Wash Buffer Lot/Exp:	X02240 / Apr-2018	MgMn Reagent Lot/Exp:	X01963 / Mar-2018
SDS Lot/Exp:	X00723 / Mar-2018		

Run name 06-APR-2017 08:38 HPV 06.04.2017

Test status: VALID

Controls

Position	Sample ID	Control Type	Result	Flags	Accepted by
A01	2H1X025342I09KZ	Positive control	Valid		Laboperator1
B01	0NCX025392I0KO3	Negative control	Valid		Laboperator1

Specimens

Position	Sample ID	Result 1	Result 2	Result 3	Flags	Accepted by
C01	0757	NEG Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
D01	0758	POS Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
E01	0759	NEG Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
F01	0760	NEG Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
G01	0761	NEG Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
H01	0762	Invalid Other HR HPV	Invalid HPV16	Invalid HPV18		Laboperator1
A02	0763	NEG Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
B02	0764	NEG Other HR HPV	POS HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
C02	0766	POS Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1
D02	0767	NEG Other HR HPV	NEG HPV16	NEG HPV18		Laboperator1

cobas® 4800 software 2.2.0 07-Apr-2017 08:21:39
 06-APR-2017 08:38 HPV 06.04.2017 Page 1 of 2

Slika 18. Izgled konačnih rezultata, Cobas 4800 software, isprintano

Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko - dalmatinske županije
Služba za mikrobiologiju i parazitologiju
21 000 Split, Vukovarska 46
Tel: (021) 401 111



J

Zaprimljeno : 29.06.2016.
Završeno : 01.07.2016.

078207827 Spec.gin.ord. Tatjana Praprotnik, dr.med.spec.gin.
Prezime i ime : ██████████, 08.07.1989. Prijepis nalaza
Uzorak - pretraga : **Bris cerviksa - detekcija HPV visokog rizika**
Lab broj : 1589

Nalaz mikrobiološke pretrage

Rezultat pretrage na Human Papillomavirus (HPV) metodom RealTime PCR na sljedeće genotipove visokog rizika:
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

HPV tip 16 - negativan

HPV tip 18 - negativan

HPV ostali tipovi - pozitivan



Kaliterna
Doc.prim.dr.sc. Vanja Kaliterna, dr.med.
specijalist
medicinske mikrobiologije
Iden. Br. HZZJZ 137987

Doc. prim. dr.sc. Vanja Kaliterna, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije

Slika 19. Prikaz gotovog nalaza

Rezultati testa *Cobas 4800 HPV High Risk Panel Plus Genotyping* se izdaju kao negativni ili pozitivni za HPV tip 16, HPV tip 18 i HPV ostale tipove visokog rizika (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68).

Mogući rezultati pretrage na HR HPV su:

- HPV visokog rizika negativan ili
- u slučaju da je nalaz pozitivan, dobiva se pojedinačni rezultat za HPV-16, za HPV-18 i skupno za ostale tipove HPV-a (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) koji su obuhvaćeni ovom pretragom

5. SAŽETAK

HPV je mali DNK virus, veličine genoma oko 8000 parova baza. Poznato je oko 200 različitih tipova virusa, a oko 40 tipova uzrokuje infekciju epitela anogenitalne regije u ljudi. Visokorizični tipovi koji se povezuju s intraepitelnim lezijama i genitalnim karcinomima su sljedeći: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82.

HPV je najčešća spolno prenosiva bolest i smatra se da više od 75% žena u nekom trenutku u životu dođe u kontakt s virusom. Više od 90% inficiranih žena uspostavi učinkovit imunološki odgovor i infekcija nestaje spontano unutar 24 mjeseca od početka, bez ikakvih ozbiljnijih posljedica. Iako infekcija bilo kojim visokorizičnim tipom virusa može uzrokovati cervikalnu intraepitelnu leziju (CIN), to se najčešće sprječava liječenjem HPV infekcija. Perzistentne i ponavljajuće infekcije HPV-om uzrok su intraepitelne neoplazije i karcinoma vrata maternice. Infekcija HPV-om uzrok je karcinoma vrata maternice u više od 99% slučajeva, širom svijeta.

U razvijenim zemljama program probira (*screening*) na rak vrata maternice, provodi se od sredine 1950-ih godina. Metoda prvog izbora je Papa-test za detekciju prekursora karcinoma cerviksa. Iako je to drastično smanjilo stopu smrtnosti od karcinoma vrata maternice, interpretacija Papa-testa zahtjeva visoku edukaciju i izvježbanost citoskriera pa su česti lažno negativni rezultati. Iako su citološke promjene u razmazu Papa-testa primarno uzrokovane HPV infekcijom, neke upale ili nepravilno uzeti uzorci mogu rezultirati lažno pozitivnim nalazom. Nakon patološkog nalaza Papa testa potrebno je ponoviti nalaz Papa-testa, uraditi HPV testiranje, napraviti kolposkopiju i biopsiju.

Detekcija nukleinskih kiselina PCR tehnikom neinvazivna je metoda detekcije prisutne HPV infekcije spolnog sustava. Uvođenje molekularnih metoda detekcije HPV infekcije poboljšalo je i unaprijedilo *screening* programe. Na taj način omogućena je ranija detekcija visokorizičnih lezija. Nadalje, detekcijom pojedinačnih tipova HPV 16 i 18 kao najčešćih uzročnika karcinoma, omogućeno je selektiranje kandidatkinja za kolposkopiju, te je u konačnici smanjen broj nepotrebnih kolposkopija.

S obzirom na visoku osjetljivost, molekularne metode detekcije HPV-a nameću se kao prvi izbor u programima probira, te je zbog toga PCR predložen i usvojen u mnogim *screening* programima kao primarni test probira.

6. ABSTRACT

Human papillomavirus is a small, double-stranded DNA virus, with a genome of approximately 8000 nucleotides. There are more than 200 different types of HPV, and approximately 40 different HPVs that can infect the anogenital mucosa. Next types are considered high-risk for development of CIN (cervical intraepithelial neoplasia) and cervical cancer: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82.

Sexually transmitted HPV infection is extremely common, with estimates of up to 75% of all women experiencing exposure to HPV at some point of life. However, > 90% of infected women will develop an effective immune response and they will clear the infection in 24 months without any long term health consequences. Infection with any high-risk HPV type can produce CIN. HR-HPV infections are self-limited and regress spontaneously within several months. Persistent HPV infection is the cause of cervical cancer and its precursor cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The presence of HPV has been implicated in more than 99% of cervical cancers, worldwide.

In developed countries with cervical cancer screening programs, the Pap smear has been used since the mid-1950s as the primary tool to detect early precursors to cervical cancer. Although it decreased the mortality rates due to cervical cancer dramatically in those countries, the Pap smear requires interpretation by highly trained cytopathologists and is a relatively inaccurate test with a high rate of false negative results. Cytological abnormalities observed in the Pap smear are primarily due to infection with HPV, however, various inflammatory or sampling variations can result in false positive Pap result. Triage of an abnormal Pap smear involves repeated Pap smear testing, HPV DNA testing, colposcopy and biopsy.

Nucleic acid (DNA) testing by PCR is non-invasive method for determining the presence of a cervical HPV infection. The implementation of HPV DNA testing has increased the efficiency of cervical cancer screening programs by detecting high-risk lesions earlier. Furthermore, by detecting individual HPV types 16 and 18 as the most common carcinogenic agent, candidates for colposcopy selection were disabled and ultimately reduced the number of unnecessary colposcopy.

With superior sensitivity established, HPV DNA testing as a first-line primary screening test has been proposed and adopted in some screening programs.

7. LITERATURA

1. Castro F.A, Koshiol J, Quint W, Wheeler C.M, Gillison M.L, Vaughan L.M, Kleter B, Van Doom L, Chaturvedi A.K, Hildesheim A, Schiffman M, Wang S.S, Zuna R.E, Walker J.L, Terence Dunn S, Wentzensen N. Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods. *BMC Infectious Diseases* 2015.; 15:544
2. Centres for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. US: Coordinating Center for Health Information and Service, Centers for Disease Control and Prevention 2006.
3. Degen H.J, Deufel A, Eisel D, Grunewald-Janho S, Keesey J. PCR Applications Manual. Germany: Roche Diagnostics GmbH 2006.
4. Denny L, Prendiville W. Cancer of the cervix: Early detection and cost-effective solutions. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2015; 131 Suppl 1: S28-32
5. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ* 2015; 350:h2372
6. Serić J. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
7. Westra W.H, Detection of human papilloma virus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncology* 2014; 50(9): 771-779
8. L Stern P, C Kitchener H, Vaccines for the Prevention of Cervical Cancer. Oxford, Oxford Oncology Library, 2008.
9. Kaliterna V, Kaliterna M, Pejković L, Drmić-Hofman I, Anđelinović Š. Prevalence and genotyping of the Human papillomavirus in the cervical specimens among women of Southern Croatia (Dalmatia county). *Cent Eur J Public Health* 2013; 21(1):26-9
10. Karelović D. i suradnici. Infekcije u ginekologiji i perinatologiji. Zagreb; Medicinska naklada; 2012., str. 460-475
11. Severson J, Evans T.Y, Lee P, Chan T, Arany I, Tyring S.K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and therapy. *J Cutan Med Surg*. 2001 Jan-Feb;5(1):43-60.

12. Miller D.L, Puricelli M.D, M. Stack M.S. Virology and Molecular Pathogenesis of Human Papillomavirus (HPV)-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biochem J.* 2012 Apr 15; 443(2): 339–353.
13. Baseman J.G, Koutsky L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32S:S16-S24.
14. Bosch F.X, Burchell A.N, Schiffman M, Giuliano A.R, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kruger Kjaer S, Munoz N. Epidemiology and natural history of Human papillomavirus infection and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26S:K1-K16.
15. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32S:S7-S15.
16. Poljak M, Kocjan B.J, Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. 2010. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 1139-1162
17. Wright T.C, Stoler M.H, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright T.L, The ATHENA (*Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics*) Study Group: Evaluation of HPV – 18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV + cytology-negative results. 2011. *Am J Clin Pathol* 136, 578-586
18. Schiller J.T, The Potential Benefits of HPV Vaccination in Previously Infected Women. 2016. *EbioMedicine* 10, 5-6
19. Markowitz L.E, Tsu V, Deeks S.L, Cubie H, Wang S.A, Vicari A.S, Brotherton J.M.L, Human papillomavirus vaccine introduction – the first five years. 2012. *Vaccine* 30 (Suppl 5), F139-F148
20. Stern P.L, van der Burg S.H, Hampson I.N, Broker T.R, Fiander A, Lacey C.J, Kitchener H.C, Einstein M.H, Therapy of Human Papillomavirus – Related Disease. 2012. *Vaccine* 30 (Suppl 5) F71-F82
21. Harper D.M, DeMars L.R. HPV vaccines – A review of the first decade. 2017. *Gynecologic oncology.* 146 (1): 196-204
22. Budd, A.C, Brotherton, J.M, Gertig, D.M, Chau, T., Drennan, K.T, Saville, M. Cervical screening rates for women vaccinated against human papillomavirus. *Med. J. Aust.* Sep 1, 2014; 201: 279–282
23. Ćorušić A, Škrđgatić L, Karadža M, Planinić P, Lovrić Gršić H, Human papillomavirus infection and genital cancer in women. April, 2013. *Medix.*19 (104/105)

8. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Filipa Merčep

Datum rođenja: 06.02.1996.

Adresa stanovanja: Hercegovačka 52, Split

Broj mobitela: 091 905 0385

e-mail: mercepfilipa@gmail.com

OBRAZOVANJE

2010. završila osnovnoškolsko obrazovanje

2014. maturirala u Zdravstvenoj školi Split; smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar

2014. upisala studij u Splitu, na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija – Medicinsko laboratorijska dijagnostika

JEZICI

Engleski u govoru i pismu – razumijevanje

Ruski u govoru i pismu – A1 razina, Centar znanja stranih jezika, Trg republike 2, 21000, Split

RAČUNALNE VJEŠTINE

Aktivno korištenje računala u Windows okruženju, poznavanje Microsoft office paketa (Word, Excel, Power Point), sluzenje internetom.

POPIS SLIKA

Slika 1. Genotipovi HPV-a	2
Slika 2. Kondilomi na spolovilu	8
Slika 3. Neoplazija - promjene epitela inficiranog HPV-om.....	11
Slika 4. Usporedba zdravih epitelnih stanica i inficiranih promjenjenih - koilocita	12
Slika 5. Krioterapija.....	14
Slika 6. <i>Gardasil</i> – kvadrivalentno cjepivo dostupno u Hrvatskoj.....	18
Slika 7. Transportni medij za uzimanje uzorka cervikalnog brisa.....	24
Slika 8. Uzorkovanje obriska cerviksa	25
Slika 9. HPV amplification/detection kit reagensi.....	26
Slika 10. Cobas x480 aparat i računalo, Cobas 4800 software.....	27
Slika 11. Roche Cobas x480 aparat	28
Slika 12. Roche Cobas z480	29
Slika 13. Vortex za uzorke.....	30
Slika 14. Shematski prikaz PCR metode	32
Slika 15. Broj kopija DNA u odnosu na broj ciklusa	33
Slika 16. Eksponencijalno povećanje broja DNA molekula tijekom amplifikacije	34
Slika 17. Shematski prikaz vezanja fluorescentno obilježenih proba i oslobađanja reportera od quenchera	35
Slika 18. Izgled konačnih rezultata, Cobas 4800 software, isprintano	37
Slika 19. Prikaz gotovog nalaza.....	38