

# Dijagnostičke i epidemiološke značajke infekcije humanim papilomavirusom u istočnoj Hrvatskoj

---

**Burian, Sven**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:948789>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Sven Burian**

**DIJAGNOSTIČKE I EPIDEMIOLOŠKE  
ZNAČAJKE INFEKCIJE HUMANIM  
PAPILOMA VIRUSOM U ISTOČNOJ  
HRVATSKOJ**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Sven Burian**

**DIJAGNOSTIČKE I EPIDEMIOLOŠKE  
ZNAČAJKE INFEKCIJE HUMANIM  
PAPILOMA VIRUSOM U ISTOČNOJ  
HRVATSKOJ**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**

Rad je napravljen u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku, Službe za mikrobiologiju, Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Mentor rada: doc. dr. sc. Domagoj Drenjančević, spec. mikrobiolog

Rad ima 35 radna lista, 9 tablica, 7 slika.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću koji je svojim stručnim savjetima omogućio izradu ovog rada.

Zahvaljujem se Zinki Bošnjak, Magdaleni Perić, Jasminki Talapko i Ivi Vuković na stručnoj podršci, prijateljstvu, trudu, strpljenju i korisnim savjetima tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Velika hvala mojoj obitelji, prijateljima i radnim kolegama na razumijevanju, pomoći i velikoj potpori.

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Povijesni pregled.....                                       | 1         |
| 1.2. Papilomavirusi .....   | 1         |
| 1.3. Virusni proteini .....                                       | 2         |
| 1.4. Infekcija i onkogeneza HPV-om.....                           | 3         |
| 1.5. Podjela HPV-a .....  | 4         |
| 1.6. Epidemiologija .....   | 5         |
| 2. CILJ RADA .....  | 7         |
| <b>3. ISPITANICI I METODE .....</b>                               | <b>8</b>  |
| 3.1. Ispitanici.....  | 8         |
| 3.2. Priprema uzoraka .....                                       | 8         |
| 3.3. Izolacija DNA .....  | 9         |
| 3.3.1. Postupak izolacije DNA.....                                | 9         |
| 3.4. Određivanje visokorizičnog HPV-a .....                       | 10        |
| 3.4.1. Priprema radne otopine „working master mix“-a za PCR ..... | 11        |
| 3.4.2. Detekcija visokorizičnog HPV-a .....                       | 11        |
| 3.5. Genotipizacija HPV-a .....                                   | 14        |
| 3.5.1. Postupak genotipiziranja HPV-a.....                        | 15        |
| 3.6. Statističke metode .....                                     | 18        |
| <b>4. REZULTATI .....</b>   | <b>19</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1. Prikaz prevalencije HPV-virusom s područja Osječko-baranjske županije u petogodišnjem periodu ..... | 19        |
| 4.2. Prikaz broja imuniziranih osoba HPV-cijepivom u Osječko-baranjskoj županiji .....                   | 20        |
| 4.3. Prikaz učestalosti pojedinih genotipova kroz četiri godine.....                                     | 21        |
| 4.4. Prikaz miješanih infekcija u ukupnom broju genotipiziranih uzoraka.....                             | 24        |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>6. ZAKLJUČAK.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>7. SAŽETAK.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>8. SUMMARY.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>9. LITERATURA .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>  | <b>35</b> |

## 1. UVOD

### 1.1. Povijesni pregled

Kondilomi u genitalnom području (lat. *Condylomata acuminata* = šiljati kondilomi) bili su poznati već u doba Hipokrata, a kožni kondilomi spominju se već od prvog stoljeća prije nove ere (1). Payne je prvi zapazio da su kožni kondilomi prijenosni, a Heidingsfield je 1901. godine opisao prijenos genitalnih kondiloma spolnim kontaktom. Već 1907. Ciuffo je pretpostavio da se radi o virusu nakon što je uspio prenijeti zarazu ekstraktom tkiva kondiloma iz kojeg su filtracijom bile uklonjene stanice (2). Zatim, godine 1949. Strauss i suradnici elektronskim su mikroskopom vizualizirali virus i nazvali ga ljudski papiloma virus (HPV). Kancerogeni potencijal tih virusa prvi je eksperimentalno dokazao Rous još 30-tih godina prošlog stoljeća (3). Na temelju podataka dobivenih biokemijskom i imunološkom analizom virusnih proteina, smatralo se kako postoji jedan tip ljudskih papiloma virusa (HPV) te je takav stav vladao tijekom 60-ih godina prošlog stoljeća (4). Međutim, razvoj biologije 70-ih godina prošlog stoljeća omogućio je proučavanje ljudskih papiloma virusa na molekularnoj razini. Bazirajući se na heterolognosti DNA, analizom genoma izoliranih iz različitih lezija, u sljedeća dva desetljeća otkriven je velik broj genotipova HPV-a (5). Unatoč velikim naporima brojnih laboratorija, tek je 90-ih godina prošlog stoljeća općenito prihvaćeno da su pojedini genotipovi HPV-a bitno povezani s pojavom karcinoma vrata maternice (cerviksa) (6-7). Potvrđena je i uzročna veza HPV-a s nekim drugim tumorima (karcinomom grkljana i tonzila) (8). Kod ljudi je danas poznato više od 100 različitih genotipova HPV-a, a danas su te zaraze jedna od najčešćih spolno prenosivih bolesti.

### 1.2. Papilomavirusi

Virusi porodice *Papillomaviridae* mali su DNA virusi, promjera 55 nm, a sam genom virusa čini zatvorena, dvolančana, kružna DNA. Kapsida je ikozaedričnog oblika, a čine ju 72 kapsomere. Otporni su na djelovanje većine otapala kao što su 70%-tni etanol, eter i kloroform jer ne sadrže lipidnu ovojnica. Virusni genom dijeli se na tri područja koja podrazumijevaju područje L (engl. *Late*) u kojem su zapisi za strukturne proteine, 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 (9). Većina genotipova HPV-a ima šest različitih ranih gena: E1, E2, E4, E5, E6 i E7, koji kodiraju proteine potrebne za razmnožavanje 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 virusnog omotača (10).

### 1.3. Virusni proteini

Poznavanje virusne patogeneze usko je povezano s poznavanjem virusnih proteina. Virusni protein E1 posjeduje aktivnost ATP-aze i helikaze koji su potrebni za razmnožavanje virusa i integraciju u genom domaćina. Virusni protein E2 značajno povećava aktivnost proteina E1 u procesu razmnožavanja virusa, a istraživanja su pokazala da su za proces replikacije virusa potrebna oba proteina (11). Također, protein E2 ima ulogu i u procesu transkripcije virusa, a neka istraživanja su pokazala da protein E2 inhibira rast stanice koja sadrži DNA visokorizičnih genotipova 16 i 18. Ti podatci ukazuju na to da protein E2 ima veliku ulogu u sprječavanju onkogene transformacije stanica zaraženih HPV-om (12). Za razliku od njih, uloga proteina E4 još je uvijek nepoznata, iako su neka istraživanja pokazala da njegovim vezanjem na citokeratin dolazi do urušavanja stanične citokeratinske mreže te je moguće da se na taj način olakšava izlazak virusa iz stanice. Nadalje, transformacije zaražene stanice modifikacijom tirozin kinaznih receptora određenih faktora rasta uloga je proteina E5, a onkogeni potencijal visokorizičnih genotipova je najčešće povezan s proteinima E6 i E7. Proteini E6 i E7 zaustavljaju proces diferencijacije keratinocita i na taj način omogućavaju HPV-u da koristi stanične proteine za kontinuiranu replikaciju virusa. Naime, pokazalo se da ti proteini inhibiraju djelovanje tumorskih supresorskih proteina p53 i proteina retinoblastoma. Protein E6, naročito kod visokorizičnih genotipova, veže se s velikim afinitetom na p53 i značajno povećava njegovo raspadanje. Kao i protein p53, protein Rb također ima važnu ulogu u regulaciji dijeljenja stanica (13). Nadalje, Protein E7 visokorizičnog genotipa 16 dovodi do razgradnje Rb-a. Istraživanja također pokazuju kako zajedničko djelovanje proteina E6 i E7 onemogućuje djelovanje gena odgovornog za stvaranje interferona i na taj se način smanjuje odgovor domaćina na zarazu. Postoje i brojni drugi mehanizmi koji mogu objasniti ulogu proteina E6 i E7 u patogenezi bolesti povezanih s HPV-zarazom (14).

#### 1.4. Infekcija i onkogeneza HPV-om

Umnožavanje HPV-a ovisi o prisutnosti određenih virusnih proteina te o zrelosti epitelnih stanica domaćina. U stanicama bazalnog sloja pločastog epitela otkriveni su kružni izvankromski dijelovi virusne DNA, a zaključeno je kako tada započinje infekcija. U bazalnom sloju stanica s episomima prisutna je latentna infekcija. Dozrijevanjem i diobom bazalnih stanica u spinozne stanice unutrašnji okoliš postaje povoljan za razmnožavanje virusa. Prepisivanjem mRNA i tvorbom proteina L1 i L2 nastaju proteini kapside zrelih virusnih čestica u gornjim slojevima pločastog epitela. Naposljetku nastaje koilocitoza koja se očituje u povećanju epitelnih stanica s perinuklearnom vakuolizacijom citoplazme i uvećanom staničnom jezgrom. Stanice epitela zaražene virusom postupno propadaju zbog razmnožavanja virusa, a sam proces vidljiv je svjetlosnom mikroskopijom.

Drugi oblik infekcije HPV-om vezan je uz postupnu tvorbu različitih tumora pločastog epitela koja se odvija u tri stupnja. U prvom stupnju dolazi do inficiranja stanice HPV-om. U drugom stupnju uz prisutni HPV u stanici, važnu ulogu imaju kancerogene tvari kao što su dim cigarete, ultraljubičaste zrake, zračenje, kemijski čimbenici i slično. Treći stupanj karakterizira ugradnja virusne DNA u genom domaćina. Visokorizični genotipovi imaju sklonost ugradnje u genom ljudske stanice, dok ih niskorizični genotipovi nemaju. Virusni se genom prije ugradnje u genom stanice najprije otvori, a potom izravna. Područje E2, u kojem nastaje prekid genoma, ima zapise za proteine koji inhibiraju aktivnost prepisivanja područja E6 i E7. Posljedica prekidanja E2 gena jest gomilanje virusnih proteina E6 i E7 koji se vežu s proteinima tumor-supresorskih gena p53 i RB. Tako dolazi do inaktivacije tumor-supresorskih proteina i slijedi nekontrolirana tvorba i rast tumora.

Temeljna su obilježja onkogeneze i infekcije HPV-om: 1. među mnogobrojnim osobama inficiranim HPV-om samo kod nekolicine dolazi do tvorbe tumora, 2. vremenski razmak od početka infekcije do tvorbe tumora obično je dugotrajan i 3. mora postojati sinergistički učinak HPV-a s drugim kancerogenim čimbenicima (9).

Perzistentne infekcije s HPV-om glavni su uzročnik cervikalnih karcinoma i prekursori cervikalnih intraepitelnih neoplazija (CIN I, II, III). Prisutnost HPV-virusa povezana je s više od 99% cervikalnih karcinoma u svijetu. HPV je mali, neovijeni, dvostruko zavijeni DNA virus s genomom od oko 8000 nukleotida. Postoji više od 100 različitih genotipova, a otprilike njih 40 sposobno je inficirati genitalnu mukozu. Samo određeni broj

spolno prenesenih genotipova povezano je s visokorizičnim cervikalnim displazijama i cervikalnim karcinomima (15). Oni se zovu visokorizični HPV genotipovi (eng. *high-risk HPV genotypes*), dok su niskorizični genotipovi (eng. *low-risk HPV genotypes*) povezani s benignim intraepitelnim lezijama ili kondilomima. Spolno prenesena infekcija HPV-om vrlo je učestala, a čak 75% žena u svom životu bit će u doticaju s HPV-om (16). Većina HPV-infekcija prolazi spontano, ali perzistentne infekcije s visokorizičnim genotipovima drastično povećavaju rizični faktor za razvoj cervikalnog karcinoma.

U razvijenim zemljama postoje metode probira za praćenje cervikalnih karcinoma PAPA-test ili VCE (vagina-cerviks-endometrij). Oni su u uporabi od sredine 1950-ih godina i korišteni su kao primarni test za detekciju ranih prekursora cervikalnog karcinoma. Uvođenjem PAPA-testa kao dijela preventivne kontrole, drastično je smanjen broj smrtnih slučajeva izazvanih cervikalnim karcinomom. PAPA-test iziskuje interpretaciju visokoeduciranih citopatologa, no unatoč tomu rezultati često nisu pouzdani te i dalje postoji visoki postotak lažno negativnih infekcija. Da bi se došlo do sigurnih i pouzdanih nalaza PAPA-briseva, potrebno je ponoviti testiranje te učiniti kolposkopiju i biopsiju sumnjivog područja. Tek histološki potvrđena visokorizična lezija mora biti kirurški odstranjena kako bi se spriječio razvoj invazivnog cervikalnog karcinoma. Papilloma virus je ekstremno teško uzgojiti u *in vitro* uvjetima. Postoji problem i sa serološkom dijagnostikom tog virusa jer neće svi pacijenti zaraženi HPV-om imati imunološki odgovor antitijelima. Stoga se primjenjuju DNA testiranja PCR-om, koja predstavljaju osjetljive i neinvazivne metode detektiranja aktivne cervikalne HPV-infekcije (17).

### 1.5. Podjela HPV-a

Ljudski papiloma virusi podijeljeni su u različite genotipove na osnovi njihove genetičke srodnosti. Do danas je poznato preko 100 različitih genotipova HPV-a, a razvojem molekularne biologije svakodnevno se otkrivaju novi. Godine 1978. predložena je nomenklatura za HPV te je zaključeno da će se novim genotipom smatrati onaj novootkriveni HPV čiji se slijed nukleotida više od 50% razlikuje od do tada poznatih genotipova. Godine 1991. promijenili su se kriteriji za određivanje novih genotipova, odnosno podtipova. Odlučeno je da će se novim genotipom smatrati svaki virus koji se po sukladnosti nukleotidnog slijeda u dijelu genoma E6, E7 i L1 razlikuje za više od 10% od do tada poznatih virusa. Na Internacionalnom kongresu o papiloma-virusima, održanom u Quebec

Cityju 1995. godine, ta je definicija potvrđena i od tada se novim genotipom smatra onaj čiji se nukleotidni slijed u dijelu genoma L1 razlikuje više od 10% od do tada poznatih genotipova.

Ubrzo je izrađeno filogenetsko stablo u kojemu su grupirani genotipovi HPV-a na temelju slijeda nukleotida u najočuvanijim dijelovima genoma (E6, E1, L1) (slika 1). Taj način grupiranja povezuje sve genotipove koji imaju afinitet prema sluznici i dio genotipova koji su uglavnom ili isključivo kožni genotipovi. Onkogeni potencijal pojedinog virusa teško je predvidjeti iz smještaja u filogenetskom stablu, iako postoji korelacija među filogenetskom povezanosti, afinitetom prema pojedinim tkivima i patološkim svojstvima pojedinog virusa (13).

## 1.6. Epidemiologija

Najčešći oblik širenja infekcija HPV-om je spolnim kontaktom, ali virus se može širiti između zaražene i nezaražene osobe bliskim dodiranjem te kontaminiranim predmetima i površinama (ručnici, površine namještaja). Oštećeni dijelovi kože i sluznice pospješuju ulazak virusa u organizam domaćina. Poznate su infekcije tijekom porođaja koje nastaju prolaskom novorođenčadi kroz inficirani porođajni kanal. Postupno nastaju papilomi grkljana kao posljedica stečenih infekcija u novorođenčadi izazvani genotipovima 11 i 6, a papilomatoza larinksa u djece može uzrokovati poremećaje disanja i pojavljuje se u svim dobnim skupinama. Također, ti genotipovi su uzročnici anogenitalnih bradavica skvamoznog epitela vanjskih dijelova spolnih organa koji se pojavljuju u obliku tzv. šiljatih kondiloma. Anogenitalne bradavice se rijetko kada pretvaraju u zloćudne tumore.

HPV je također odgovoran za nastanak kožnih bradavica, a najčešće se pojavljuje na keratiniziranim dijelovima kože ruku i stopala. Početak infekcije javlja se u djetinjstvu ili u ranoj adolescenciji.

Spolne infekcije HPV-om danas se ubrajaju u spolno prenosive bolesti. Infekcija ženskog spolnog sustava genotipovima 16 i 18 povezana je s intraepitelnom neoplazijom i cervikalnim karcinomom. Citološke promjene karakteristične su za virusnu infekciju bojane po Papanicolaouu, a uključuju koilocite i perinuklearnu vakuolizaciju citoplazme. Displazija je početna neoplastična promjena i vidljiva je svjetlosnim mikroskopom. Otprilike 40 – 70%

blažih displazija nestane spontano. Dugotrajne promjene epitelnih stanica mogu dovesti do nastanka karcinoma koji napreduje od blagog (CIN I, cervikalna intraepitelnaneplazija), preko srednjeg (CIN II) do teškog oblika displazije (CIN III) i karcinoma *in situ* (9).

## **2. CILJ RADA**

Ciljevi ovog rada su:

1. Prikazati prevalenciju HPV-infekcija u Osječko-baranjskoj županiji u petogodišnjem periodu,
2. Prikazati broj imuniziranih osoba HPV-cijepivom u Osječko-baranjskoj županiji,
3. Prikazati učestalost pojedinih genotipova kod različitih skupina bolesnika s osvrtom na dijagnostičke laboratorijske metode.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Ispitanici u ovom istraživanju bili su žene i muškarci koji su testirani na HPV-virus u Županijskom zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije od 2010. do 2014. godine. Uzorci su bili bris cerviksa kod žena, a kod muškaraca bris uretre i bris pubisne regije penisa. Na zahtjev nadležnog liječnika koji pripisuje uputnicu za određenu pretragu, odabrana je posebna grupa pacijenata kojima je određen genotip. Pacijenti nisu aktivno sudjelovali kao sudionici u istraživanju. U istraživanju su se koristili podatci iz elektronske baze podataka Službe za mikrobiologiju, Županijskog zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Obradeno je 2979 pacijenata, od toga 538 pacijenta kojima je uspješno detektiran genotip. Korišteni su podatci o broju cijepljenih pacijenta u Županijskom zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije te privatne ginekološke ordinacije dr. Siniše Matkovića od 2007. do 2015. godine.

#### 3.2. Priprema uzoraka

Uzorci brisa vrata maternice uzorkovali su se u ginekološkim ordinacijama s pripadajućim medijem prema uputama proizvođača testa za uzorkovanje *Thin Prep liquid Pap vial*. Brisevi uretre kod muškaraca uzorkovani su u *MicroTest M4RT transport medium* (Remel, USA), a samo uzorkovanje obavljano je u mikrobiološkoj ambulanti Županijskog zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije te u ordinacijama obiteljske medicine ili u ginekološkim ordinacijama. Uzorci su bili pohranjeni na +4°C do daljnje analize.



Slika 1. Medij za uzorkovanje HPV-a (fotografirao: S. Burian)

### 3.3. Izolacija DNA

Kako bi dobili točan i pouzdan uzorak za daljnju detekciju HPV-a, vrlo je važno pravilno izolirati virusnu DNA te otkloniti višak proteina iz kliničkog materijala. U ovom istraživanju korištena je metoda temeljena na adsorpciji DNA na kolone, *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

#### 3.3.1. Postupak izolacije DNA

1. U sterilnu 1.5 ml mikrocentrifugalne tubice dodano je 200  $\mu$ l vorteksiranog uzorka, 200  $\mu$ l *Binding Buffera* i 40  $\mu$ l *Proteinase K*, sve zajedno dobro promiješano i inkubirano na 70°C 10 minuta.
2. Dodano je 100  $\mu$ l isopropanola i dobro promiješano.
3. Ukupni sadržaj iz mikrocentrifugalne tubice prebačen je u *Filter Tube* koje su uronjene u *Collection Tube*. Centrifugirano je minutu na 10000 rpm.
4. Promijenjene su nove *Collection Tube* i dodano je 500  $\mu$ l *Inhibition Removal Buffer* na *Filter Tube*. Centrifugirano je minutu na 10000 rpm.
5. Promijenjene su nove *Collection Tube* i dodano je 500  $\mu$ l *Wash Buffer* na *Filter Tube*. Centrifugirano je minutu na 10000 rpm (ovaj postupak se ponavljao dva puta).



6. Promijenjene su nove *Collection Tube* i bez dodavanja pufera centrifugirano je zajedno sa *Filter Tube* 30 sekundi na najvećoj brzini od 14000 rpm.

7. *Filter Tube* prebačene su u sterilne 1.5 ml mikrocentrifugalne tubice i dodano je 200 µl *Ellution Buffer* koji je prethodno zagrijan na 70°C. Centrifugirano je minutu na 10000 rpm..

8. Pripremljena mikrocentrifugalna tubica sadržavala je eluiranu, pročišćenu DNA koja se mogla odmah koristiti ili skladištiti na -20°C do daljnje upotrebe.



Slika 2. Biokabinet za sterilni rad laboratorij za molekularnu dijagnostiku mikroorganizama (fotografirao: S. Burian)

#### 3.4. Određivanje visokorizičnog HPV-a

DNA je umnožena specifičnim biotiniziranim početnicama za polimorfnu regiju L1 HPV genoma te biotiniziranim početnicama za regiju beta globin gena (BGG) čime se kontrolira kvaliteta uzetog brisa, izolacija DNA i umnožavanje svakog pojedinog uzorka s pripadajućim pozitivnim i negativnim kontrolama. Umnožavanje specifičnog dijela genoma HPV-a visokog rizika i dijela genoma BGG provedeno je u PCR uređaju (*GeneAmp PCR System 9700* sa zlatnim blokom *Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD) (Slika 4). Dobiveni PCR produkti se kemijski denaturiraju za dobivanje jednolančanih PCR produkata te se ti biotinizirani jednolančani produkti vežu oligonukleotidnim probama vezanim za mikrotitarsku ploču. Serijom automatskog ispiranja 8-igličnim ispiračem (*Columbus* proizvođača *Tecan*, Salzburg, Austrija) ispiru se mikrotitarske ploče da bi se uklonili nevezani PCR produkti. Za detekciju vezanja koristi se avidin-peroksidaza-konjugat koji se veže za već

hibridizirane biotinizirane PCR produkte. Dodatkom supstrata koji sadrži vodikov peroksid i kromogentetrametilbenzidin (TMB), avidin-peroksidaza katalizira reakciju oksidacije TMB-a što rezultira stvaranjem plave boje. Dodatkom STOP-otopine zaustavlja se oksidiranje te plava boja konvertira u žutu istog intenziteta i zatim se paralelno mjeri promjena boje spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih ploča *Sunrise* (proizvođača *Tecan*) na valnoj duljini od 450 nm.

#### 3.4.1. Priprema radne otopine „workingmastermix“ za PCR

1. U radnu otopinu *Working Master Mix* iz *Amplisor HPV Amplification Kit*-a, odmjereno je pipetom 150 µl MgCl<sub>2</sub> te kratko vorteksirano.
2. Pripremljena radna otopina razdijeljena je u *PCR tube*, a zatim se u *PCR tubu* 1 dodalo 50 µl pozitivne kontrole dok se u *PCR tubu* 2 dodalo 50 µl negativne kontrole iz *Amplisor HPV Control Kit*-a koji se izolirao zajedno s ispitivanim uzorcima.
3. U ostale *PCR tube* dodano je 50 µl izoliranog uzorka i potom su tube zatvorene. Za svaki uzorak korišteni su novi sterilni filter nastavci.
4. *PCR tube* stavljene su u uređaj *Applied Biosystems GeneAmp PCR 9700 System* sa zlatnim blokom, a sam PCR-program traje 2 sata i 45 minuta.
5. nakon odrađenog PCR-a, *PCR tube* vadene su iz uređaja u biokabinetu za sterilni rad na sterilni stalak te je u njih dodano 100 µl DN-otopine. Sadržaj je promješšan sa sterilnim filter nastavcima te se za svaki uzorak koristio novi filter nastavak.
6. Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Denaturirani uzorci korišteni su odmah za daljnji postupak ili su spremljeni na +4°C.

#### 3.4.2. Detekcija visokorizičnog HPV-a

1. Denaturirani uzorci iz točke 8 prijašnjeg postupka stavljeni su u uređaj *Eppendorf Gradient* na 37°C u trajanju od 2-3 minute.
2. Iz *Amplisor Detection HPV* seta, kolone od 8 jažica za HPV i BGG složile su se redom na ramu slobodnih mikrotitarskih ploča te su se kolone označile brojevima.
3. 8-kanalnom pipetom sa sterilnim nastavcima dodano je 100 µl *HPV HYB* otopine.
4. U svaku pripadajuću jažicu sterilnim nastavkom sa filterom dodano je 25 µl denaturiranog amplikona, a na pozicije 1 i 2 stavljene su pozitivna i negativna *HR-HPV* kontrolne otopine.

5. Pokrivena mikrotitarska ploča sa sterilnim biofilmom i inkubirana je u inkubatoru na 37°C u trajanju od 60 minuta.
6. Mikrotitarska ploču izvađena je iz inkubatora, odlijepljen je sterilni Alu-biofilm i ploča je stavljena na uređaj za ispiranje *Tecan* sa prethodno pripremljenim puferom za ispiranje. Nakon ispiranja, mikrotitarska ploča laganim se udarcima posušila na staničevini.
7. 8-kanalnom pipetom sa sterilnim nastavcima bez filtera odmjerenom je 100 µl *HPV AV-HRP* otopine i dodano u mikrotitarsku ploču.
8. Ponovljen je korak 6.
9. 8-kanalnom pipetom sa sterilnim nastavcima bez filtera odmjerenom je 100 µl prethodno pripremljenog *HPV conjugate* otopine i dodano u mikrotitarsku ploču.
10. Mikrotitarska ploča pokrivena je poklopcem i inkubirana u mraku 10 minuta na sobnoj temperaturi u kabinetu za sterilni rad.
11. 8-kanalnom pipetom sa sterilnim nastavcima bez filtera odmjerenom je 100 µl *HPV Stop* otopine i dodano u mikrotitarsku ploču.
12. Apsorbancija mikrotitarskih pločica očitavana je na uređaju *Tecan Sunrise* pri čemu su se provjeravali parametri optičke gustoće od 450 nm i referalne valne duljine od 620 nm.
13. Na osnovu vrijednosti apsorbancija očitani su rezultati uzoraka prema vrijednosnim intervalima u tablici 1

Tablica 1. Interpretacija rezultata dobivenih vrijednosti apsorbancije HPV-a i rezultata kontrolnog beta-globin gena

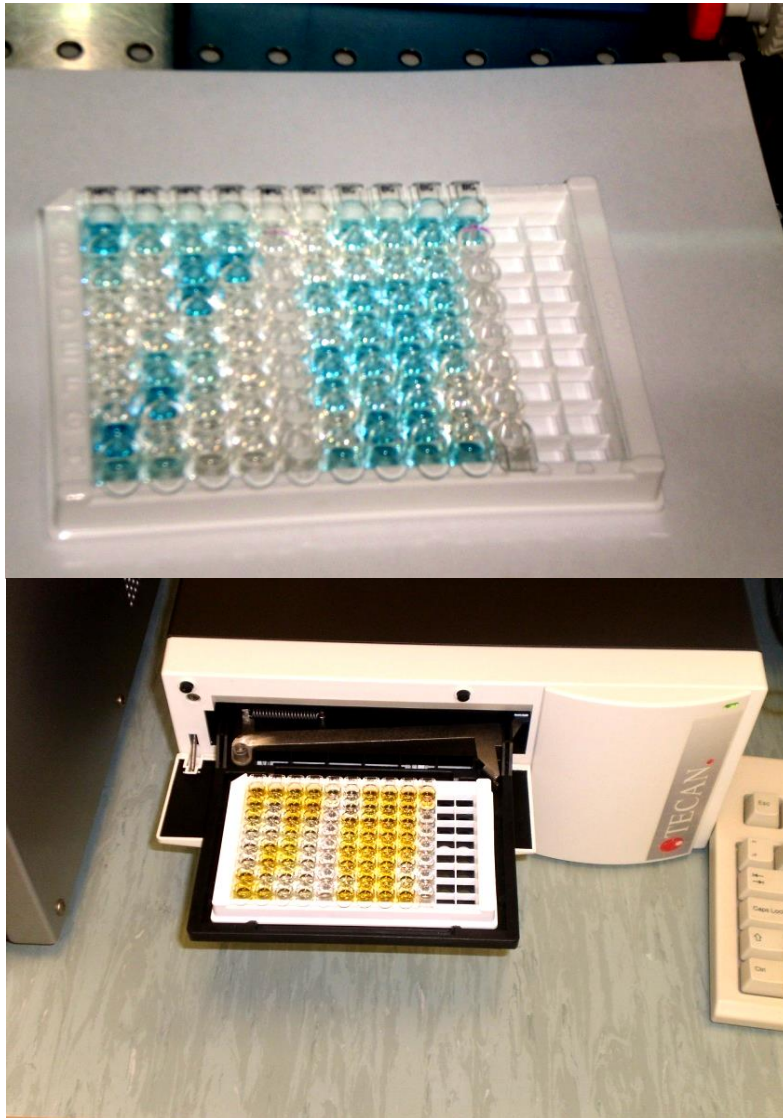
| HPV rezultat | beta – globin gen rezultat           | Interpretacija                          |
|--------------|--------------------------------------|---|
| < 0,2        | 0,2                                  | HR-HPV nije otkriven<br>(negativan-NEG) |
| < 0,2        | <0,2                                 | Invalidan rezultat<br>(neadekvatan-NU)  |
| 0,2          | Bilo koja vrijednost<br>apsorbancije | HR-HPV je otkriven<br>(pozitivan-POZ)   |



Slika 3. AMPLICOR Human Papilloma Virus (HPV) test koji pomoću PCR reakcije otkriva 13 visokorizičnih HPV-genotipova najčešće povezanih s rakom vrata maternice (fotografirao: S. Burian)



Slika 4. PCR uređaj (GeneAmp PCR System 9700 sa zlatnim blokom) (fotografirao: S. Burian)



Slika 5. Mikrotitarska ploča Sunrise, proizvođača Tecan (fotografirao: S. Burian)

### 3.5. Genotipizacija HPV-a

*Linear Array HPV genotyping test* je kvalitativni *in vitro* test koji služi za detekciju HPV-a u kliničkim uzorcima. Kombinacijom amplifikacije ciljane DNA polimerazom lančanom reakcijom i hibridizacijom nukleinskih kiselina omogućuje detekciju ukupno 37 genotipova. Test koristi biotinizirane početnice koje definiraju sekvencu nukleotida u polimorfnoj L1 regiji HPV-genoma. Mješavina HPV-početnica prisutnih u MasterMix-u omogućuje amplifikaciju 37 HPV-genotipova uključujući 13 visokorizičnih genotipova (16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Dodatni par početnica za dokazivanje  $\beta$ -globin gena koristi se kao kontrola prisutnosti stanica u uzorku, pravilne ekstrakcije i amplifikacije. Dodatkom streptavidina konjugiranog s peroksidazom hrena na test-trakicama stvara se

kompleks vezanjem hibridiziranog amplikona i oligonukleotidnih proba. Ispiranjem trakica odstranjuje se sav nevezani kompleks koji dalje ne ulazi u reakciju. Dodatkom TMB-a (3,3', 5,5'-*tetramethylbenzidine*) uz prisutnost vodikovog peroksida dolazi do oksidacije kompleksa. Na test-trakici se to očituje kao formiranje plave boje koja se na tablici vizualno uspoređuje i samim time definira prisutnost određenog genotipa.

#### 3.5.1. Postupak genotipiziranja HPV-a

1. Koristeći sterilnu pincetu postavljene su genotip trakice okrenutu prema gore u kadici sa odvojenim kolonama i označene brojevima.
2. Dodano je 4 ml prethodno ugrijan *Working Hybridization Buffer* (53°C) u kolone sa test trakicama te je dodano 75 µl denaturiranog amplikona.
3. Kadica je prekrvena poklopcem i postavljena u vodenu kupelju sa tresalicom te hibridizirana 30 minuta, brzinom trešnje od 60 RPM-a.
4. Svaka kolona aspirirana je vakum aspiratorom sa sterilnim nastavkom pazeći da se trakica ne okrene. Odmah nakon toga dodano je 4 ml *Working Ambient Wash Buffer*, kolone su lagano protrešene i odmah je aspiriran sav sadržaj.
5. Dodano je 4 ml prethodno ugrijan *Working Strigent Wash Buffer* na 53°C, kadica se prekrila poklopcem i postavila u vodenu kupelju sa tresalicom na 15 minuta, brzinom trešnje od 60 RPM-a.
6. Aspirirane su kolone i dodano je 4 ml prethodno napravljenog *Working Conjugate* (15 µl *SA-HRP* + 5 ml *Working Ambient Wash Buffer* za svaku trakicu). Kadica se ponovno postavila na tresalicu sobne temperature kroz 30 min/60 RPM.
7. Aspirirane su kolone i dodano je 4 ml *Working Ambient Wash Buffer*, kolone su lagano protrešene i odmah je aspiriran sav sadržaj.
8. Aspirirane su kolone i dodano je 4 ml *Working Ambient Wash Buffer*, zatim se kadica postavila na tresalicu sobne temperature kroz 10 min/60 RPM. Postupak se ponovio još jednom.
9. Aspirirane su kolone i dodano je 4 ml *Working Citrate Buffer*, zatim se kadica postavila na tresalicu sobne temperature kroz 5 min/60 RPM.
10. Aspirirane su kolone i dodano je 4 ml prethodno npravljenog *Working Substrate* (4 ml *SUB A* + 1 ml *SUB B* za svaku trakicu). Kadica se postavila na tresalicu sobne temperature kroz 5 min/60 RPM, pri tome kadica je obavezno bila prekrivena kako bi se zaštitila od reakcije izazvane direktnim svjetlom.

11. Aspirirane su kolone i dodano je 4 ml destilirane vode. Pomoću pincete, genotip trakice izvađene su iz kolona i ostavljene sat vremena na staničevini kako bi se osušile.

12. Očitani si rezultati genotip trakica uz pomoć Tablice 2:

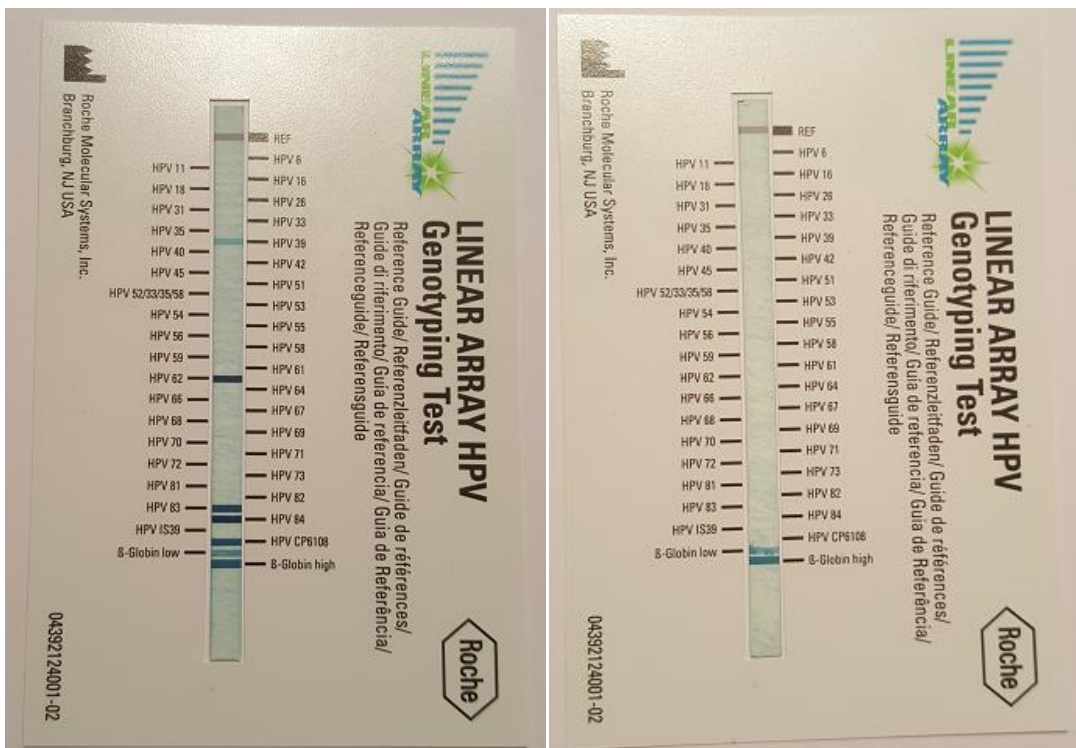
Tablica 2. Interpretacija rezultata HPV-a genotip-trakicom i rezultata kontrolnog niskog i visokog beta-globin gena

| HPV<br>rezultat | Niski beta -<br>globin gen<br>rezultat | Visoki beta<br>-globin gen<br>rezultat | Interpretacija     |
|-----------------|--|--|--------------------|
| -               | -                                      | -                                      | Neadekvatan uzorak |
| -               | -                                      | +                                      | Neadekvatan uzorak |
| -               | +                                      | +                                      | Negativan rezultat |
| +               | -                                      | -                                      | Pozitivan rezultat |
| +               | -                                      | +                                      | Pozitivan rezultat |
| +               | +                                      | +                                      | Pozitivan rezultat |

**Legenda:** + = pozitivan rezultat; - = negativan rezultat; Neadekvatan uzorak = neadekvatno uzorkovanje, pogreška u obradi uzoraka ili prisutnost inhibitora reakcije



Slika 6. Vakumska aspiracija pufera dodanog u kadicu s genotip-trakicama (fotografirao: S. Burian)



Slika 7. Očitavanje rezultata genotip-trakice (fotografirao: S. Burian)



### 3.6. Statističke metode

Dobiveni rezultati obrađeni su s programskim paketom za statističku obradu – SPSS 20.0., a u samoj obradi podataka provedena je provjera normaliteta distribucija, izračun deskriptivnih podataka podrazumijevajući frekvencije, postotke, medijan, interkvartilni raspon i  $\chi^2$  test.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Prikaz prevalencije HPV-virusom s područja Osječko-baranjske županije u petogodišnjem periodu

Kako bi se pravilno odabrale statističke mjere za prikaz prikupljenih rezultata, testirani su normaliteti distribucija korištenih varijabli. Prema vrijednostima Kolmogorov-Smirnovljevog testa distribucije varijabli, statistički značajno odstupaju od normalne distribucije ( $p < 0,05$ ) stoga su u daljnjoj analizi korištene neparametrijske mjere prikaza rezultata. Daljnja obrada podataka uključivala je analizu deskriptivne statistike koja omogućava pregled pojavnosti te osnove deskriptivne statistike ukupnog broja pozitivnih uzoraka infekcijom HPV-a te pojavnost istih uzoraka s obzirom na spol. Dobiveni podatci vidljivi su u Tablici 3. i Tablici 4.

Tablica 3. Incidencija i deskriptivni podatci za pozitivne uzorke na infekciju HPV-om kroz 5 godina

| HPV  | Frekv.<br>ukupno<br>poz. | %<br>ukupno<br>poz. | Medijan<br>(C) | Q     |
|------|--------------------------|---------------------|----------------|-------|
| 2010 | 239                      | 45                  | 2,5            | 10,5  |
| 2011 | 445                      | 56                  | 4,0            | 11,75 |
| 2012 | 353                      | 52                  | 2,0            | 2,5   |
| 2013 | 287                      | 52                  | 2,0            | 1,5   |
| 2014 | 144                      | 34                  | 2,0            | 3,0   |

**Legenda:** Q = interkvartilni raspon

Iz Tablice 3 može se uočiti kako je od 2010. do 2014. testirano 2979 uzoraka od kojih je 1468 (49%) bilo pozitivnih na HPV. Postotak pozitivnih uzoraka ne varira značajno od 2010. do 2013. godine te kako se smanjenje postotka oboljelih uočava tek 2014. godine. Najveći postotak pozitivnih uzoraka na infekciju HPV-om uočava se u 2011. godini. Također, interkvartilno raspršenje za 2010. i 2011. godinu znatno je veće nego za ostala razdoblja, što

se može objasniti postojanjem ekstremnih vrijednosti kod određenih pozitivnih uzoraka za te dvije godine.

Tablica 4. Pojavnost negativnih i pozitivnih HPV-infekcija prema spolu kroz 5 godina

|           | 2010. |     | 2011. |     | 2012. |     | 2013. |     | 2014. |     |
|-----------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
|           | M     | Ž   | M     | Ž   | M     | Ž   | M     | Ž   | M     | Ž   |
| Negativni | 68%   | 51% | 68%   | 39% | 65%   | 43% | 49%   | 47% | 59%   | 69% |
| Pozitivni | 32%   | 49% | 32%   | 61% | 35%   | 57% | 51%   | 53% | 41%   | 31% |

**Legenda:** M – muškarci; Ž - žene

Iz pregleda Tablice 4 može se zaključiti kako se u 2014. godini smanjio postotak žena pozitivnih na HPV-infekciju, a povećao broj muškaraca pozitivnih na HPV-infekciju, dok je taj omjer od 2010. do 2013. viši za žene nego za muškarce, i to naročito 2011. i 2012. godine. Od 2011. do 2013. godine više od 50 % od ukupnog broja testiranih žena imalo je infekciju HPV-om, dok je kod muškaraca taj postotak dosegnut samo u 2013. godini.

Dobivena je statistički značajna razlika u spolu s obzirom na učestalost pozitivnih i negativnih HPV-infekcija u smjeru statistički značajnog većeg broja pozitivnih HPV-infekcija kod žena,  $\chi^2(1, N=2797)= 31.47, p < 0.01$

#### 4.2. Prikaz broja imuniziranih osoba HPV-cijepivom u Osječko-baranjskoj županiji

Imunizacija HPV-cijepivom, koja uključuje bivalentno cjepivo *Cervarix* i kvadrivalentno cjepivo *Gardasil*, u Osječko-baranjskoj županiji započela je 2007.godine, a provodi se do danas. Cijepljenje se može obaviti u Županijskom zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije u prostorima školske medicine te privatnoj ginekološkoj ordinaciji dr. Siniše Matkovića. Prema podacima dobivenim iz tih dviju ustanova od 2007. do 2011. godine cijepljene su ukupno 43 osobe, a od 2012. do 2015. cijepljene su 4 osobe (oko 0,45%djevojčica u generaciji).

### 4.3. Prikaz učestalosti pojedinih genotipova kroz četiri godine

HPV-genotipovi kategorizirani su prema onkogenom potencijalu. Kliničkim zapažanjima te epidemiološkim i molekularnim istraživanjima utvrđena je uloga HPV-zaraza u razvoju karcinoma cerviksa. Niskorizični genotipovi su 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108, a nađeni su kod šiljatih kondiloma. Visokorizični genotipovi su 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82, a dok se genotipovi 26, 62, 66 za sada smatraju genotipovima "vjerojatno visokog rizika". Kategorizacija se stalno mijenja i dopunjuje novim genotipovima, a sama zastupljenost genotipova varira u odnosu na geografske regije (18). Prikazana je učestalost pojedinih genotipova u Osječko-baranjskoj županiji od 2011. do 2014. godine, a izostavljeni su podaci za 2010. godinu koji se nisu koristili zbog nepotpunih godišnjih podataka i uvođenja metode u rutinski laboratorijski posao.

Tablica 5. Prikaz učestalosti pojave genotipova podijeljenih u tri kategorije s obzirom na visinu rizika u odnosu na spol kroz četiri godine

|                               | 2011.      |              | 2012.       |              | 2013.       |             | 2014.       |             |
|-------------------------------|------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                               | M          | Ž            | M           | Ž            | M           | Ž           | M           | Ž           |
| Niskorizični                  | 5<br>(11%) | 39<br>(89%)  | 18<br>(37%) | 31<br>(63%)  | 50<br>(64%) | 28<br>(36%) | 31<br>(89%) | 4<br>(11%)  |
| Potencijalno<br>Visokorizični | 3<br>(5%)  | 61<br>(95%)  | 16<br>(22%) | 55<br>(78%)  | 15<br>(38%) | 25<br>(62%) | 9<br>(39%)  | 14<br>(61%) |
| Visokorizični                 | 10<br>(4%) | 249<br>(96%) | 31<br>(16%) | 157<br>(84%) | 33<br>(30%) | 76<br>(70%) | 39<br>(52%) | 36<br>(48%) |

**Legenda:** M - muškarci; Ž - žene

Iz Tablice 6 može se vidjeti kako se od 2011. do 2013. godine broj muškaraca u niskorizičnoj skupini povećavao, a broj žena smanjivao. Također, za razliku od godina prije, 2013. i 2014. broj žena u niskorizičnoj skupini bio je manji u odnosu na muškarce. Kroz sve godine broj žena u potencijalno visokorizičnoj skupini veći je nego broj muškaraca, iako se te razlike smanjuju u 2013. i 2014. godini. Što se tiče visokorizične skupine, može se vidjeti iznimno velika razlika između muškaraca i žena u 2011. i 2012. godini, u smjeru puno većeg broja žena u toj skupini. Dok u 2013. godini još uvijek ima veći broj žena u visokorizičnoj skupini, u 2014. godini ta se razlika ne samo gubi, već je zabilježen veći broj muškaraca u toj skupini. Općenito se može vidjeti kako je najveći broj žena u visokorizičnoj skupini kroz sve

godine, a najmanje u niskorizičnoj skupini, dok muškaraca također ima najviše u visokorizičnoj skupini isključujući 2013. godinu, a najmanje u potencijalno visokorizičnoj skupini.

Tablica 6. Prikaz učestalosti pojedinog visokorizičnog genotipa kod žena i muškaraca u ukupnom periodu od četiri godine

|   | 16             | 51            | 52          | 31          | 35           | 39           | 58           | 59           | 18         | 33           | 73           | ostali        |
|---|----------------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| Ž | 122<br>(23.5%) | 64<br>(12.5%) | 53<br>(10%) | 53<br>(10%) | 19<br>(3.5%) | 33<br>(6.5%) | 22<br>(4.5%) | 22<br>(4.5%) | 27<br>(5%) | 23<br>(4.5%) | 23<br>(4.5%) | 57<br>(10.5%) |
| M | 28<br>(24.5%)  | 28<br>(24.5%) | 8<br>(7%)   | 4<br>(3.5%) | 3<br>(2.5%)  | 4<br>(3.5%)  | 5<br>(4.5%)  | 5<br>(4.5%)  | 8<br>(7%)  | 1<br>(1%)    | 9<br>(8%)    | 10<br>(8.5%)  |

**Legenda:** M – muškarci; Ž - žene

Tablica 7. Prikaz učestalosti pojedinog potencijalnog visokorizičnog genotipa kod žena i muškaraca u ukupnom periodu od četiri godine

|   | 53          | 61          | 62           | 66            | 55          | 54          | 70          | 83          | ostali      |
|---|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ž | 41<br>(27%) | 12<br>(8%)  | 32<br>(21%)  | 39<br>(25.5%) | 3<br>(2%)   | 8<br>(5.5%) | 7<br>(4.5%) | 8<br>(5.5%) | 2<br>(1.5%) |
| M | 11<br>(26%) | 1<br>(2.5%) | 6<br>(14.5%) | 5<br>(12%)    | 10<br>(24%) | 4<br>(9.5%) | 0<br>(0%)   | 3<br>(7%)   | 2<br>(4.5%) |

**Legenda:** M – muškarci; Ž - žene

Tablica 8. Prikaz učestalosti pojedinog niskorizičnog genotipa kod žena i muškaraca u ukupnom periodu os četiri godine

|   | 6         | CP6108   | 11       | 42       | 84        | 81     |
|---|-----------|----------|----------|----------|-----------|--------|
| Ž | 34 (33%)  | 23 (23%) | 8 (8%)   | 14 (14%) | 21 (21%)  | 1 (1%) |
| M | 79 (76 %) | 7 (6.9%) | 6 (5.5%) | 2 (1.8%) | 10 (9.8%) | 0 (0%) |

**Legenda:** M - muškarci; Ž - žene

Kod žena u visokorizičnoj skupini najčešće se javljaju genotipovi 16, 51, 52 i 31, iako se može uočiti njihov kontinuirani pad pojavnosti kroz godine, odnosno, najviše ih je bilo 2011., a najmanje 2014. Kod žena u potencijalno visokorizičnoj skupini najčešće se javljaju genotipovi 53, 62 i 66. Također, njihova pojavnost opada od 2011. do 2014. godine, iako genotipovi 62 i 66 pokazuju najveću učestalost 2012. godine, a zatim njihova pojavnost pada. Kod žena u niskorizičnoj skupini najčešće se javljaju genotipovi 6, 84 i CP6108, uz to da se genotip 84 u 2014. godini nije pojavio bez obzira na spol. Također, učestalost genotipa 6 pokazuje porast od 2011. do 2013. godine, dok u 2014. godini bilježi najnižu pojavnost.

Kod muškaraca u visokorizičnoj skupini najčešće se javljaju genotipovi 16 i 51, iako u nižoj učestalosti nego kod žena. Ipak, dok kod žena genotip 51 ukazuje na pad učestalosti, kod muškaraca se njegova učestalost povećava kroz godine. Tako se genotip 51 kod muškaraca 2011. godine pojavio jednom, dok se u 2014. godini pojavio 12 puta. Kod muškaraca u potencijalno visokorizičnoj skupini najčešće se javljaju genotipovi 53 i 55. Genotip 53 se javlja kroz godine sve učestalije, odnosno, 2011. godine se pojavio jednom, a 2014. godine pet puta. Za razliku od njega, genotip 55 najveću učestalost ima 2012. godine u kojoj se također pojavio pet puta, a najmanju 2014. godine kada se pojavio samo jednom. Kod muškaraca u niskorizičnoj skupini najčešće se javlja genotip 6, ukazujući na povećanje učestalosti od 2011. do 2013. godine u kojoj ima zabilježenu najveću učestalost koja iznosi 39. U 2014. godini dolazi do pada učestalosti koja tada iznosi 22.

Dobivena je statistički značajna razlika u učestalosti pojava genotipova podijeljenih u tri kategorije s obzirom na visinu rizika u odnosu na spol. Muškarci značajno češće obolijevaju od niskorizične HPV-infekcije za razliku od žena koje statistički značajno češće obolijevaju od visokorizičnih HPV-infekcija,  $\chi^2(2, N=538) = 25.88, p < 0.01$ .

#### 4.4. Prikaz miješanih infekcija u ukupnom broju genotipiziranih uzoraka

Određivanje HPV-genotipa potrebno je kod bolesnica s karcinomom vrata maternice jer je infekcija s više od jednim HPV-genotipom (miješana infekcija) povezana s lošijom prognozom kod bolesnica s invazivnim karcinomom vrata maternice.

Tablica 9. Incidencija miješanih infekcija u ukupnom broju genotipiziranih uzoraka kroz četiri godine

|                                | 2011.       | 2012.       | 2013.       | 2014.       |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Miješana infekcija             | 91<br>(44%) | 94<br>(65%) | 59<br>(47%) | 34<br>(55%) |
| Ukupno genotipiziranih uzoraka | 206         | 145         | 125         | 62          |

Prema tablici 8 može se uočiti kako je najveći broj miješanih infekcija zabilježen 2012. godine. Također je vidljivo kako ukupni broj genotipiziranih uzoraka kroz godine značajno opada. Može se zaključiti kako je broj miješanih infekcija bio u opadanju od 2012. do 2014. godine.

## 5. RASPRAVA

Od 2010. do 2014. u Osječko-baranjskoj županiji testirano je 2979 uzoraka od kojih je 1468 (49%) bilo pozitivnih na HPV, a 538 uzoraka kojima je uspješno detektiran genotip. Najveći postotak pozitivnih uzoraka na infekciju HPV-om uočava se u 2011. godini. Može se zaključiti kako su žene do 2014. godine u prosjeku više oboljevale od HPV-infekcije nego muškarci, no treba uzeti u obzir i mogućnost rjeđeg testiranja i prijave oboljenja kod muškaraca. Time bi se moglo objasniti kako se postotak oboljelih muškaraca u 2013. i 2014. godini povećao u odnosu na proteklo razdoblje jer se smatra da se povećala i osviještenost muškaraca o toj infekciji, kao i važnost brige o vlastitom zdravlju. Također, moguće je da je broj oboljelih žena počeo opadati zbog aktivnog i pojačanog educiranja ljudi kroz zadnjih nekoliko godina o važnosti prevencije, testiranja i kontrole vlastitog zdravlja te uvođenja mogućnosti preventivnog cijepljenja koja do danas ipak nisu dostigla željeni postotak u broju cijepljenih.

Trenutne procjene pokazuju da se svake godine 308 žena zarazi HPV-om u Hrvatskoj, od kojih 147 razvija rak vrata maternice (19). U usporedbi s rezultatima ovog rada u prosjeku svake godine u Osječko-baranjskoj županiji oko 150 žena godišnje dobije pozitivan nalaz HPV-infekcije. Tako veliki broj pozitivnih nalaza kod žena u Osječko-baranjskoj županiji u odnosu na broj pozitivnih nalaza kod žena u cijeloj Hrvatskoj, može se pripisati velikom području istočne Hrvatske gdje postoji samo jedna ustanova koja analizira i detektira HPV-virus. Također, veliki broj pozitivnih nalaza ukazuje na to da se žene u tijeku godine nekoliko puta testiraju, a samim time povećavaju ukupan broj pozitivnih nalaza kod žena.

HPV-tipovi 16 i 18 odgovorni su za otprilike 70% svih slučajeva raka vrata maternice u svijetu, dok su genotipovi 6 i 11 najčešće uzročnici genitalnih bradavica. U Osječko-baranjskoj županiji najčešći visokorizični HPV-tipovi kod žena i muškaraca su genotip 16 i 51, dok kod niskorizičnih tipova najveću pojavnost imaju genotip 6 i 84. Muškarci značajno češće oboljevaju od niskorizične HPV-infekcije za razliku od žena koje statistički značajno češće oboljevaju od visokorizičnih HPV-infekcija. Takvi podatci bi mogli objasniti činjenicu da žene češće obavljaju rutinske ginekološke preglede i samim time HPV-testiranje, dok muškarci pristupaju testiranju ukoliko primjete kožne promjene u genitalnoj regiji koje su izazvane niskorizičnim HPV-genotipovima.



Rak vrata maternice je drugi najčešći oblik raka kod žena u svijetu, u Hrvatskoj je osmi najčešći rak kod žena i petnaesti kod žena u dobi od 15 do 44 godine starosti. Profilaktička cjeviva predstavljaju mogućnost primarne prevencije HPV-infekcije i izbjegavanje njezinih posljedica. Cjepivo ne doprinosi izlječenju, ako je žena u vrijeme cijepljenja već zaražena genotipom HPV-a koji se nalazi u cjevivu. Zbog toga najveću korist od cijepljenja imaju djevojčice i djevojke koje nisu bile u kontaktu s HPV-om, odnosno, koje nisu spolno aktivne. Trenutno postoje dvije vrste cjeviva za primarnu prevenciju od HPV-infekcije, *Cervarix* i *Gardasil*. Bivalentno cjevivo (*Cervarix* – *GlaxoSmithKline*) djeluje na genotipove 16 i 18 koji predstavljaju dva bitna HPV-genotipa povezana s oko 70% slučajeva karcinoma cerviksa. Kvadrivalentno cjevivo (*Gardasil* – *Merck Sharpe&Dohme*) je rekombinantno cjevivo jer ne sadrži živi virus, a daje se tijekom 6 mjeseci intramuskularno na prvi dan, zatim nakon dva mjeseca te konačno nakon šest mjeseci. Prednost *Gardasila* je u tomu što dodatno štiti epitel sluznice od nastanka dobroćudnih genitalnih bradavica uzrokovanih HPV-genotipovima 6 i 11. One ne predstavljaju životnu opasnost ni povećan rizik od razvoja raka vrata maternice pa samim time nisu ni značajni javnozdravstveni problem. Način djelovanja cjeviva je putem L1 proteina koji se nalaze na kapsuli ili kapsidi virusa. Kvadrivalentno cjevivo sadrži pročišćene L1 proteine za četiri tipa virusa. Nakon davanja cjeviva, imunološki mehanizam organizma počinje s proizvodnjom protutijela za ciljane L1 proteine koji se nalaze na HPV-u te nakon ekspozicije dolazi do razaranja virusa (20). Prednost *Cervarixa* je njegova jača unakrsna zaštita protiv srodnih tipova virusa koji su drugi po učestalosti uzročnici raka vrata maternice nakon HPV-a. Na području EU-a jedan oblik cijepljenja se primjenjuje na nacionalnoj razini i to u Belgiji, Nizozemskoj, Rumunjskoj i Velikoj Britaniji te u većini regija Italije, Španjolske i Poljske, dok se oba cjeviva jednako primjenjuju u Grčkoj, Francuskoj, Luksemburgu i Njemačkoj. Kod svakog se cjeviva pri odluci o primjeni treba uzeti u obzir koristi, imajući na umu ograničenja poput djelotvornosti koja nije stopostotna. Postoje rizici u smislu nastajanja mogućih nuspojava te eventualne nepoznanice vezane uz trajanje zaštite, mehanizam djelovanja i slično (19).

Prema najnovijim podacima Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske, cijepljenje protiv HPV-a se u rujnu 2015. godine uvodi u kalendar cijepljenja za sve dječake i djevojčice prvog razreda srednje škole. Tim postupkom Hrvatska ulazi u krug najrazvijenijih zemalja svijeta koje provode taj program te postaje peta zemlja u svijetu koja će cijepiti i dječake (21). Cijena cjeviva u Hrvatskoj do sada je iznosila oko 3000 HRK. U Osječko-baranjskoj županiji od 2007. do 2011. godine cijepljene su ukupno 43 osobe, a od 2012. do 2015. cijepljene su 4

osobe (u prosjeku 0.45% djevojčica u generaciji). U usporedbi s ostalim županijama, najveći broj cijepljenih osoba je u Primorsko-goranskoj županiji (23 – 48% djevojčica u generaciji) i Međimurskoj županiji (13 – 23% djevojčica u generaciji), a relativno mali ukupni postotak cijepljenih osoba ima grad Zagreb (10% djevojčica u generaciji), iako je u potpunosti financirao cijepljenje za razliku od ostalih županija. Izrazito malen broj cijepljenih osoba u Osječko-baranjskoj županiji mogao bi se pripisati relativno skupoj cijeni cjepljiva koja je isključivo na trošak pacijenta te nepovjerenju i zabrinutosti prema negativnim učincima cjepljiva koja može biti odraz nedovoljne educiranosti. Kako se većinom radi o djevojčicama osnovnoškolske dobi, dio roditelja ne želi cijepiti svoje kćeri zbog svjetonazorskih i vjerskih uvjerenja. Sekundarna prevencija obuhvaća metode probira među ženama. Programi prevencije sastoje se od uzimanja citološkog razmaza po Papanicolau te molekularnog HPV-testiranja, ali su različito koncipirani u raznim zemljama. Žene koje aktivno sudjeluju u probiru, čak i ako su HPV-pozitivne, gotovo nikada ne razviju karcinom cerviksa jer postoje uspješne metode liječenja prekanceroznih promjena (22). Preporuča se i obavezno korištenje kondoma pri spolnom odnosu, no on nije potpuna zaštita. Spontana eliminacija virusa očekuje se nakon tri mjeseca, ukoliko nije bilo ponovnog kontakta s virusom. Uporaba cjepljiva te sustavna i kontinuirana edukacija kao i ginekološki pregledi spolno aktivnih djevojaka važni su za primarnu prevenciju. Mladi čine populaciju koja je posebno rizična zbog spolnog ponašanja, neizgrađenih stavova, snažnog pritiska vršnjaka te hedonizma kao važnog dijela oblikovanja identiteta (23).

Specifično liječenje, nažalost, ne postoji, a sam postupak liječenja je složen i ovisi o zdravstvenom stanju zaražene osobe (dob, opće zdravstveno stanje, oblik, veličina i lokalizacija promjena, itd.). U slučaju pojave bolesti nužno je istovremeno liječiti i oboljelog partnera, čak i ako partner nema znakova bolesti. Kondilomi se mogu uklanjati kirurškim putem (laserom, krioterapijom, elektrokoagulacijom, LEEP-om) ili se premazuju različitim kemijskim sredstvima, a ponekad se u njih ubrizgava interferon (protein koji stvara imunost na viruse). Unatoč svemu, HPV-infekcija se ne može izliječiti u potpunosti te i dalje ostaje veliki javnozdravstveni problem u kojemu mjere prevencije i edukacije čine najvažniju ulogu u daljnjem širenju virusa.

## 6. ZAKLJUČAK

- Od 2010. do 2014. u Osječko-baranjskoj županiji testirano je 2979 uzoraka od kojih je 1468 (49%) bilo pozitivnih na HPV. Najveći postotak pozitivnih uzoraka na infekciju HPV-om uočava se u 2011. godini.
- Statistički je značajna razlika u spolu s obzirom na učestalost pozitivnih i negativnih HPV-infekcija u smjeru većeg broja pozitivnih HPV-infekcija kod žena.
- Može se zaključiti kako se u 2014. godini smanjio postotak žena pozitivnih na HPV-infekciju, a povećao broj muškaraca pozitivnih na HPV-infekciju, dok je taj omjer od 2010. do 2013. viši za žene nego za muškarce i to naročito u 2011. i 2012. godini.
- Muškarci češće oboljevaju od niskorizične HPV-infekcije za razliku od žena koje statistički češće oblijevaju od visokorizičnih HPV-infekcija.
- Žene su do 2014. godine u prosjeku više oboljevale od HPV-infekcije nego muškarci, no treba uzeti u obzir i mogućnost rjeđeg testiranja i prijave oboljenja kod muškaraca.
- U usporedbi s ostalim županijama, relativno je malen broj cijepljenih osoba u Osječko-baranjskoj županiji sa 47 cijepljenih u 9 godina.
- Podatci genotipiziranih HPV-uzorka pokazuju da je najveći broj žena u visokorizičnoj skupini kroz sve godine, a najmanje u niskorizičnoj skupini, dok muškaraca također ima najviše u visokorizičnoj skupini isključujući 2013. godinu
- Najčešći visokorizični genotipi kod žena i muškaraca su 16 i 51.
- Najčešći niskorizični genotipi kod žena su 6,CP6108 i 84, a kod muškaraca 6.
- Najveći je broj miješanih infekcija zabilježen 2012. godine s 94 (64%) pozitivnih uzoraka.

## 7. SAŽETAK

Zaraza HPV-om je jedna od najčešćih spolno prenosivih bolesti. Niskorizični genotipovi uzrokuju anogenitalne bradavice na vanjskim dijelovima spolnih organa, dok su visokorizični genotipovi povezani s nastankom intraepitelnih neoplazija i karcinoma vrata maternice. Metode izbora za detekciju infekcije HPV-om temeljene su na metodama molekularne dijagnostike - amplifikacija PCR. U istraživanju su se koristili podatci iz elektronske baze podataka Službe za mikrobiologiju, Županijskog zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Od 2010. do 2014. u Osječko-baranjskoj županiji testirano je 2979 uzoraka od kojih je 1468 (49%) bilo pozitivnih na HPV, a od toga 538 detektiranih genotipova. Od 2011. do 2013. godine više od 50 % od ukupnog broja testiranih žena imalo je infekciju HPV-om. Može se zaključiti kako su žene do 2014. godine u prosjeku više oboljevale od HPV-infekcije nego muškarci, no treba uzeti u obzir i mogućnost rjeđeg testiranja i prijave oboljenja kod muškaraca. Podatci genotipiziranih HPV-uzorka pokazuju da muškarci češće oboljevaju od niskorizične HPV-infekcije za razliku od žena koje statistički češće oboljevaju od visokorizičnih HPV-infekcija. Najčešći visokorizični genotipi kod žena i muškaraca su 16 i 51. Najčešći niskorizični genotipi kod žena su 6 i 84, a kod muškaraca 6. Najveći broj miješanih infekcija zabilježen 2012. godine s 94 (64%) pozitivnih uzoraka. U usporedbi s ostalim županijama, relativno je malen broj cijepljenih osoba u Osječko-baranjskoj županiji sa 47 cijepljenih u 9 godina.

Ključne riječi: HPV, genotip, cijepljenje, Osječko-baranjska županija

## 8. SUMMARY

HPV infection is one of the most common sexually transmitted diseases. Low-risk genotypes cause anogenital warts outside the genitals, while high-risk genotypes are associated with intraepithelial neoplasia and cervical cancer. The methods of choice for the detection of HPV infection are based on methods of molecular diagnostics – PCR amplification. The study used data from the electronic database of the Department of Microbiology, County Public Health Institute of Osijek-Baranja County. In the period from 2010 to 2014 in Osijek-Baranja County, there were 2 979 tested samples, of which 1468 (49%) were positive for HPV; 538 of which were detected genotypes. In the period from 2011 to 2013, more than 50% of the total number of tested women had HPV infection. It can be concluded that women until 2014 had more HPV infection than men, but we need to consider the possibility lower number of testing and registration disease in men. Data of genotyped HPV samples show that men more often suffer from low-risk HPV infections than women, who more often suffer from high-risk HPV infections. The most common high-risk genotypes in women and men are 16 and 51. The most common low-risk genotypes in women are 6 and 84, and in men 6. The largest number of mixed infections was recorded in 2012 with 94 (64%) positive samples. Compared with other counties, there is relatively small number of vaccinated people in Osijek-Baranja County with 47 vaccinated people in the period of 9 years.

Keywords: HPV, genotype, vaccination, Osijek-Baranja County

**9. LITERATURA**

1. Omeljčenko-Pasini V. Condylomata acuminata. Spolne bolesti. Zagreb. JAZU 1966;323-27.
2. Karamanou M, Agapitos E, Kousoulis A, Androutsos G. From the humble wart to HPV: a fascinating story throughout centuries. *Oncol Rev.* 2010;133-5.
3. Rous P, Kidd JG. The carcinogenic effect of a virus on tarred skin. *Science.* 1936;83:468-9.
4. Rowson KEK, Mahy BWJ. Human papova (wart) virus infection. *Bacteriol Rev.* 1967;31:110–31.
5. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology.* 1977;76:569–80.
6. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:958–64.
7. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J i sur. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:796 – 801.
8. Klussmann, Jens P., Gültekin, E., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries i sur. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol.* 2003;162.3:747-53.
9. Kalenić, i sur. *Medicinska mikrobiologija.* Zagreb: Medicinska Naklada. 2013;46:358-63
10. Brentjens, Mathijs H., et al. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin.* 2002;20.2:315-331.
11. Dixon EP, Pahl GL, Rocque WJ. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology.* 2000;270:345–57.

12. Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol.* 1995;69.12:7791-799.
13. Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288:55-78.
14. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science.* 1994;266:1821-1828
15. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah, KV i sur. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-9.
16. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997;102:3-8.
17. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A i sur. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2003;12:485-90.
18. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;35:348-518.
19. Human papillomavirus and related diseases  
report<http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.  
Datum pristupa: 01.09.2015.
20. Koulova A, Tsui J, Irwin K, Van Damme P, Biellik R, Aguado MT. Country recommendations on the inclusion of HPV vaccines in national immunization programmes among high-income countries June 2006–January 2008. *Vaccine.* 2008;26.51:6529-541.

21. Ministarstvo zdravlja  
[http://www.zdravlje.hr/novosti/novosti/cjepivo\\_za\\_hpv\\_od\\_jesen\\_besplatno\\_za\\_sve\\_srednjoskolce](http://www.zdravlje.hr/novosti/novosti/cjepivo_za_hpv_od_jesen_besplatno_za_sve_srednjoskolce).  
Datum pristupa: 01.09.2015.
22. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *Journal of clinical pathology*. 2004;57.1:68-72.
23. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections : 2006 – 2015 : breaking the chain of transmission  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43853/1/9789241563475\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43853/1/9789241563475_eng.pdf).  
Datum pristupa: 02.09.2015.



## 10. ŽIVOTOPIS

SVEN BURIAN

Datum i mjesto rođenja:

- 16.11.1987., Osijek

Obrazovanje:

- 2002.-2006. Medicinska škola Osijek, zdravstveno laboratorijski tehničar
- 2012.-2015. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Radno iskustvo:

- 2006.-2007. Pripravnički staž, Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, KBC Osijek
- 2007.-2012. Zdravstveno laboratorijski tehničar, Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Služba za mikrobiologiju
- 2012. Zdravstveno laboratorijski tehničar, Medicinski fakultet Osijek, Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju