



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2007 60 stp  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Deteksjon og kvantitering av humant papillomavirus DNA i serum hos kvinner med og uten celleforandringer i livmorhalsen**

Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the serum of women with and without cervical neoplasia

Yvonne Sandberg  
Bioteknologi, retning mikrobiologi



## Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført ved seksjon for genteknologi på senter for laboratoriemedisin ved sykehuset Østfold, Kalnes. Masteroppgaven er utført som en del av en mastergrad i bioteknologi ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås, i perioden august 2016 til august 2017.

Jeg ønsker først å rette en stor takk til min hovedveileder ved sykehuset Østfold, Christine Monceyron Jonassen, for at jeg fikk mulighet til å utføre arbeidet med min masteroppgave i forskningsgruppen ved seksjonen. Jeg vil takke for god inspirasjon og introduksjon av humant papillomavirus og all støtte, oppfølging og veiledning underveis. Jeg ønsker også å rette en stor takk til min veileder Camilla Furlund Nystrand for innføring i laboratorierutiner og laboratoriearbeid, samt god støtte, oppfølging og veiledning underveis i mitt arbeid. Jeg vil også takke min interne veileder ved NMBU, Leiv Sigve Håvarstein, for støtte og oppfølging rundt det formelle med gjennomføringen av en masteroppgave ved NMBU. Videre ønsker jeg å takke Anbjørg Rangberg for innføring i arbeid ved laboratoriet og støtte underveis, samt Jeanette Aarem for godt humør og mental støtte i tyngre perioder. Jeg må videre få takke seksjonsleder Laila Solhaug Hulleberg for at jeg fikk gjennomføre min masteroppgave ved seksjon for genteknologi. Samtidig ønsker jeg å takke alle ansatte ved seksjonen for at dere har tatt meg godt imot, vært inkluderende og behjelpelige, og bidratt til høy trivsel i hverdagen.

En takk rettes også til Ingrid Baasland for muligheten til å utføre masteroppgaven på hennes innsamlede prøvemateriale da det oppsto komplikasjoner rundt oppgaven som egentlig skulle gjennomføres. Takk også til Maria Melheim, Mona Ferbu, Knut Dahl og Rita Walter for korrekturlesning av oppgaven. Sist, men ikke minst ønsker jeg å takke min samboer, min familie og mine venner for all støtte og for å ha vist tålmodighet og forståelse for min manglende tilstedeværelse og mitt fokus på arbeidet med masteroppgaven gjennom dette året.

Kalnes, August 2017

.....  
Yvonne Sandberg



## Sammendrag

Persisterende infeksjon med humant papillomavirus (HPV) kan føre til utvikling av celleforandringer i livmorhalsen og livmorhalskreft, som på verdensbasis forårsaker 270 000 dødsfall hvert år. Innføringen av screeningprogrammet i 1995 utgjorde en nedgang i antall tilfeller av livmorhalskreft i Norge, der i underkant av 30 000 kvinner får påvist celleforandringer og omlag 3000 blir konisert hvert år. I mer enn 90 % av tilfellene vil HPV-infeksjonen gå tilbake uten behov for behandling, men det er ikke mulig å identifisere andelen av kvinner som kommer til å utvikle livmorhalskreft. Resultatet er en overbehandling der mange av koniseringstilfellene kunne vært unngått. Identifisering av gode biomarkører for sykdomsprogresjon vil ha stort potensiale til å optimalisere screening og behandling, og samtidig senke tallet av overbehandling, da konisering kan medføre komplikasjoner for kvinnen ved senere svangerskap. Det er tidligere antatt at HPV ikke går over i blodbanen, men flere studier har nå vist at HPV-DNA likevel kan detekteres i perifert blod. De fleste funn er gjort hos kreftpasienter og det er tidligere antatt at påvisning av HPV-DNA i blod har sin opprinnelse fra kreftceller. En nyere studie har derimot påvist HPV-DNA i plasma hos kvinner med nylig oppdagede celleforandringer i livmorhalsen.

Hensikten med denne studien var å undersøke om tilstedeværelse og mengde av HPV-DNA i serum korrelerer med lesjonsgrad i livmorhalsen, og dermed kan benyttes som en potensiell biomarkør for progresjon av dysplasi. Studien er basert på analyse av serumprøver fra kvinner henvist til gynekolog med unormale funn ved cytologisk prøve fra livmorhalsen. Kvinnene som ble inkludert i denne studien ble påvist med HPV 16, 31 og/eller 45 i livmorhalsen, uavhengig av lesjonsgrad, samt kvinner med påvist adenokarsinom in situ (ACIS), eller livmorhalskreft, uavhengig av HPV-type i livmorhalsen (n=149). Det ble etablert metoder for ekstraksjon og påvisning før prøvene ble screenet for ti HPV-typer med real-time PCR (qPCR) (6, 16, 18, 31, 33, 42, 45, 52, 58 og 73) og mer målrettet, for de mest karsinogene HPV-typene med droplet digital PCR (ddPCR).

Resultatene viser at HPV-DNA kunne påvises i serum hos 1 av 159 (0,6 %) kvinner ved hjelp av qPCR og 2 av 149 (1,3 %) med ddPCR. HPV-DNA kunne ikke detekteres i serumprøvene fra kvinnene med ACIS eller livmorhalskreft. Resultatene fra denne studien viser at det ikke foreligger korrelasjon mellom deteksjon og alvorlighetsgrad, og

viser at HPV-DNA i serum ikke ser ut til å være egnet som biomarkør for progresjon av dysplasi i livmorhalsen. Mer kunnskap om HPV's tilstedeværelse i blodbanen er nødvendig for å kunne identifisere den optimale blodfraksjonen for deteksjon av HPV. Deretter kan det avgjøres hvorvidt HPV-DNA i gjeldende blodfraksjoner kan benyttes som en biomarkør for å identifisere de kvinnene med dysplasi i livmorhalsen, som har høyere risiko til å utvikle livmorhalskreft.

## Abstract

A persistent infection with human papillomavirus (HPV) may lead to the development of dysplasia and cervical cancer, which causes 270 000 deaths worldwide yearly. The introduction of a national screening program in 1995 in Norway led to a decrease in number of cervical cancer cases, where close to 30 000 women are diagnosed with some grade of dysplasia, and approximately 3000 undergo conization for cervical dysplasia every year. In more than 90 % of the cases, the infection will regress without the need of treatment, but it is not possible to identify which women among those with dysplasia who actually will develop cervical cancer. This results in an overtreatment where many conizations could have been avoided. Identification of biomarkers for progression could have great potential to optimize screening and treatment, and simultaneously lower the number of overtreatment, as conization can cause complications for women in later pregnancies. It has previously been assumed that HPV does not lead to viremia, but several studies have shown that HPV-DNA can still be detected in peripheral blood. Most of the positive findings have been made in cancer patients, and it is assumed that detection of HPV-DNA in the bloodstream originates from cancer cells. A study, however, has newly shown the presence of HPV-DNA in the plasma of women with a recent history of cervical dysplasia.

The aim of this study was to investigate whether or not the presence and load of HPV-DNA in the serum correlates with the severity of cervical dysplasia, and thus could be used as a potential biomarker for progression. The study is based on the analysis of serum from women referred to a gynecologist due to abnormal cytological findings in their cervix. The women who were included in this study were positive for HPV 16, 31 and/or 45 in the cervix, regardless of the grade of dysplasia. Methods of extraction and detection were established before samples were screened for a panel of ten HPV-types (6, 16, 18, 31, 33, 42, 45, 52, 58 and 73) with real-time PCR (qPCR), and for the most oncogenic types with droplet digital PCR (ddPCR).

The results indicate that HPV-DNA could be detected in serum in 1 of 159 (0,6 %) women using qPCR and 2 of 149 (1,3 %) with ddPCR. HPV DNA could not be detected in serum samples from women with ACIS or cervical cancer. The results of this study indicate that there is no correlation between detection and the severity grade suggesting that HPV-DNA in serum is not suitable as a biomarker for progression of cervical

dysplasia. However, more knowledge on the mechanisms for HPV's presence in the bloodstream is necessary to identify the optimal blood fraction for the detection of HPV, and determine whether HPV-DNA in current blood fractions can be used as a biomarker to identify those women with cervical dysplasia who are at higher risk of developing cervical cancer.



## Ordliste og måleenheter

ACIS	Adenokarsinoma in situ
AGUS	Atypiske sylinder/kjertelceller av usikker betydning
ASC-H	Atypiske skvamøse celler, kan ikke utelukke HSIL
ASC-US	Atypiske skvamøse celler av usikker betydning
ASC-US+	Atypiske skvamøse celler av usikker betydning, eller verre
BBQ	BlackBerry Quencher (BlackBerry Slukker)
Bp	Basepar
CfDNA	Sirkulerende cellefritt fritt DNA
CIN	Cervical intraepitelial neoplasi
Ct	Cycle threshold (Terskelsyklus)
CtDNA	Sirkulerende cellefritt tumor DNA
ddPCR	Droplet digital PCR
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotidtrifosfat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
E gen/protein	Tidlige «Early» gener/proteiner i HPV-replikasjon
EGFR	Epidermal vekstfaktor-reseptor
FAM	6-karboksyfluoresin
FCDIIB	Fokal kortikal dysplasi IIB
g (= rcf)	Relative centrifugal Force (Relativ sentrifugeringskraft)
HBB	Humant betaglobin
HCl	Hydrogenklorid
HEX	Heksaklorfluoresin
HIV	Humant immunsviktivirus
HPV	Humant papillomavirus
HR	Høyrisiko
HSIL	Høygradig skvamøs intraepitelial lesjon
HSPG	Heparansulfat proteoglykan
IPC	Intern positiv kontroll
Kbp	Kilo barepar

LB	Luria-Bertani
L gen/protein	Sene «Late» gener/proteiner i HPV-replikasjon
LR	Lavrisiko
LSIL	Lavgradig skvamøs intraepitelial lesjon
miRNA	Mikro ribonukleinsyre
mRNA	Messenger ribonukleinsyre (Budbringer RNA)
NCBI	Nasjonalt senter for bioteknologi informasjon
NILM	Negativ for intraepitelial lesjon eller malignitet
NK-celle	Naturlig drepecelle
NTC	Negativ templat kontroll
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Mononukleære celler i perifert blod)
PCR	Polymerase kjede reaksjon
pRB	protein Retinoblastoma
PV	Papillomavirus
qPCR	Real-time PCR
REK	Regional Etisk Komite
Rpm	Revolutions per minute (Omdreininger per minutt)
RRP	Residiverende respiratorisk papillomatose
SD	Standardavvik
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natrium dodekyl sulfat)
TAMRA	Tetrametylrhodamin
TE	Tris-EDTA
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
pg	Pikogram
ng	Nanogram
μg	Mikrogram
g	Gram
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
nm	Nanometer

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	<b>1</b>
1.1	Opprinnelse av papillomavirus	1
1.2	Humant papillomavirus	2
1.2.1	Fylogeni og klassifisering	4
1.2.2	Genital HPV-infeksjon	5
1.2.2.1	Lesjonsprogresjon	6
1.2.2.2	Screeningprogrammet i Norge	9
1.2.3	Livssyklus og mekanismer ved karsinogenese i livmorhalsen	11
1.2.4	Immunrespons	16
1.2.5	Aktuelle progresjons biomarkører	17
1.3	Påvisning av HPV-DNA i blod	19
<b>2</b>	<b>Formålet med studien</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Materialer og metoder</b>	<b>23</b>
3.1	Studiepopulasjon	23
3.2	Optimalisering, validering og verifisering av ekstraksjons metoder og DNA utbytte fra serum	26
3.2.1	Optimalisering av ekstraksjon	27
3.2.1.1	Optimalisering fra maksimalt 500 µl serum	27
3.2.1.1.1	Ekstraksjonsprotokoller med NucleSENS easyMAG	27
3.2.1.1.1.1	Effekt av forbehandling av serum og elueringsvolum for ekstraksjon med Generic 2.0.1 protokoll fra easyMAG	28
3.2.1.1.1.2	Sammenligning av ulike protokoller på easyMAG	29
3.2.1.1.1.3	Sammenligning av EasyMAG ekstraksjon med andre ekstraksjonsmetoder	29
3.2.1.1.2	Optimalisering fra 1000 µl serum	31
3.2.1.1.3	Validering av DNA-utbyttet ved langtidslagring av serum og undersøkelse av mulige inhibitorer i serumprøvene fra studien	32
3.3	Primer- og probeassay	33
3.3.1	Primer- og probedesign for HPV 42 og HPV 73	33
3.3.2	Primere og prober benyttet i studien	35
3.4	Tillaging av HPV-kontroller ved kloning	36
3.4.1	Tillaging av PCR-produkt	37

3.4.2	Kloning inn i pCR®2.1 .....	37
3.4.3	One Shot® kjemisk transformering .....	38
3.4.4	Analysering av positive kloner.....	38
3.4.5	Isolering av plasmid .....	39
3.4.6	Verifisering av insert ved Sanger sekvensering.....	39
3.4.7	Konsentrasjonsmåling med Qubit® 3.0 Fluorometer.....	40
3.4.8	Tillaging av fortynningsrekker .....	41
3.5	Etablering av protokoll for qPCR og ddPCR .....	42
3.5.1	Optimalisering av qPCR-protokoll.....	42
3.5.1.1	Valg av mastermiks .....	42
3.5.1.2	Primer og probe konsentrasjon .....	42
3.5.1.3	Eluat-mengde i qPCR.....	43
3.5.1.4	Verifisering av deteksjonsgrense .....	43
3.5.1.5	Enkel, dupleks eller multipleks qPCR .....	43
3.5.2	Droplet digital PCR-protokoll.....	45
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>48</b>
4.1	Optimalisering av ekstraksjon .....	48
4.1.1	Optimalisering fra maksimalt 500 µl serum.....	48
4.1.1.1	Effekt av forbehandling av serum og elueringsvolum for ekstraksjon med Generic 2.0.1 protokoll fra easyMAG.....	48
4.1.1.2	Sammenligning av ulike protokoller på EasyMAG.....	49
4.1.1.3	Sammenligning av EasyMAG ekstraksjon med andre ekstraksjonsmetoder .....	50
4.1.2	Optimalisering fra 1000 µl serum.....	51
	.....	52
4.1.3	Validering av DNA-utbyttet ved langtidslagring av serum og undersøkelse av mulige inhibitorer i pasientprøvene.....	52
4.1.4	Ekstraksjonsprotokoll for screening av pasientprøvene.....	53
4.2	Optimalisering av qPCR-protokoll .....	53
4.2.1	Valg av mastermiks.....	53
4.2.2	Primer og probe konsentrasjon.....	54
4.2.3	Eluat-mengde i qPCR .....	54
4.2.4	Verifisering av deteksjonsgrense.....	55
4.2.5	Enkel, dupleks eller multipleks qPCR.....	56

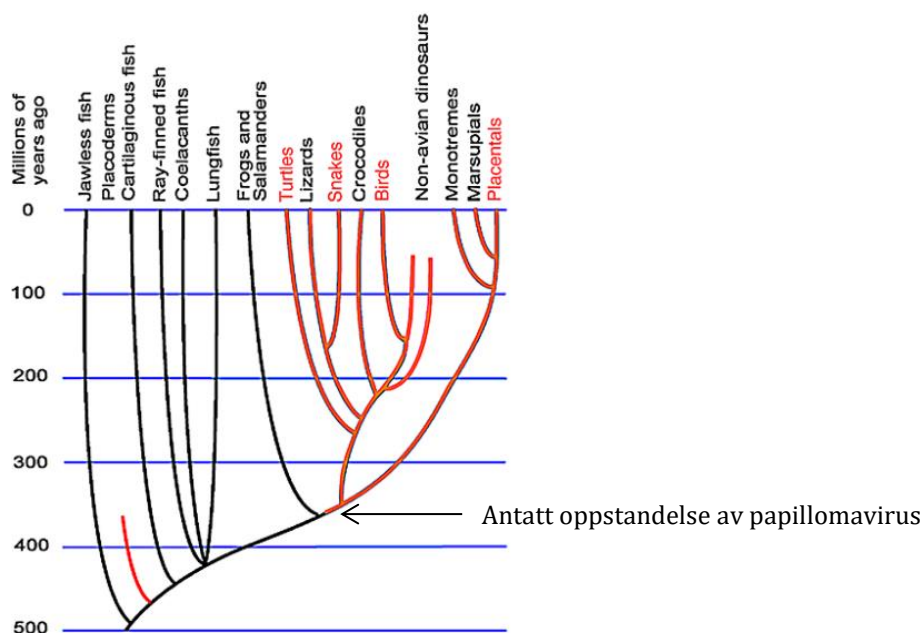
4.3	Verifisering av deteksjonsgrense i ddPCR.....	57
4.4	Screening av prøvematerialet .....	57
4.4.1	Screening med qPCR.....	58
4.4.2	Screening og kvantitering med ddPCR .....	61
4.4.2.1	Kvantitering av positive funn gjort ved screening med qPCR.....	61
4.4.2.2	Målrettet Screening.....	62
4.4.2.2.1	Kvinner diagnostisert med ACIS og kreft.....	62
4.4.2.2.1.1	Kvinner med HPV 16, 31 og/eller 45 påvist i livmorhalsen, samt kvantitering av positive funn. ....	62
4.4.2.2.2	Kvinner med HPV 18 og/eller 33 påvist i livmorhalsen .....	63
4.4.2.3	Oppsummering av positive funn etter målrettet screening med ddPCR. ....	64
4.5	Sammenlagte resultater fra HPV-DNA undersøkelse med qPCR og ddPCR i serumprøver .....	65
<b>5</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Referanser.....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Vedlegg.....</b>	<b>83</b>



# 1 Innledning

## 1.1 Opprinnelse av papillomavirus

Papillomavirus (PV) tilhører familien *Papillomaviridae*, en gruppe virus som infiserer epitelceller i hud og slimhinner hos både mennesker og dyr og stammer trolig fra reptiler som levde for 350 millioner år siden. Den evolusjonære opprinnelsen av PV kan spores tilbake til opprinnelsen av amniotene, og viruset har sannsynligvis utviklet seg i takt med sine respektive verter. Dette har ført til en stor utbredelse av viruset, som i dag er å finne hos både fugler, reptiler, pungdyr og pattedyr (figur 1). Forskjeller i nukleotidkomposisjon av individuelle genotyper er generelt liten, noe som gjenspeiler en lav mutasjonsrate hos viruset. PV er vertsspesifikke virus som ofte opptrer i en latent livssyklus. De forårsaker ofte kroniske lesjoner fremfor alvorlige sykdommer, noe som oftest sees for virus som har gjennomgått en langvarig utvikling i samvær med sine respektive verter. Enkelte PV gir også symptomer og kan medføre sykdom. <sup>1-5</sup>



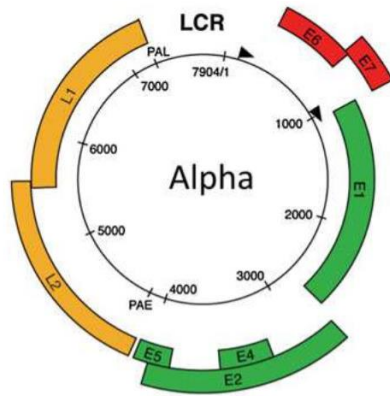
**Figur 1: Evolusjonært tre**, som viser papillomavirusets antatte oppstandelse og evolusjonære utvikling i samvær med verten. Papillomavirus er påvist hos alle arter vist med rød tekst. Modifiser illustrasjon fra Doorbar et al. 2015 <sup>3</sup>.

## 1.2 Humant papillomavirus

Over 200 ulike typer humant papillomavirus (HPV) er funnet til å smitte menneskers hud og slimhinner. De fleste HPV-typer er ikke assosiert med sykdom, men persisterende infeksjon med visse typer kan være knyttet til utvikling av enkelte kreftformer, der livmorhalskreft er den vanligste <sup>3,6</sup>. Årsakssammenhengen mellom HPV og livmorhalskreft ble først erkjent sent på 1970-tallet <sup>7,8</sup>. På verdensbasis registreres rundt 530 000 tilfeller hvert år <sup>9</sup> og i Norge fikk 370 kvinner påvist livmorhalskreft i 2015 <sup>10</sup>. På verdensbasis dør omlag 270 000 kvinner hvert år av denne kreftformen, der 85 % av tilfellene forekommer i utviklingsland <sup>9</sup>. HPV er også assosiert med kreft i hode og halsregionen (tonsillekreft), samt kreft i vagina, vulva, penis og anus <sup>11</sup>. Andre sykdommer som forårsakes av HPV er Residiverende respiratorisk papillomatose (RRP) <sup>12,13</sup>, Epidermodysplasia verruciformis (EV) <sup>12,14</sup> og Fokal epitelial hyperplasi <sup>12</sup>, samt vorter, derav både papillomer og kondylomer <sup>4,12,15</sup>. Det er nylig blitt vist at HPV også kan være assosiert med en bestemt type epilepsi hos barn <sup>16</sup>.

HPV er små, nakne viruspartikler som danner en mangekantet proteinkappe på mellom 50 og 60 nm i diameter. Proteinkappen består av 72 kapsomer, der hver enkelt er bygget opp av fem L1-molekyler. Partiklene består også av et varierende antall L2 molekyler, der kun den N-terminale delen av proteinet er eksponert ved overflaten. Virusets genom består av sirkulært dobbeltrådet DNA på rundt 8000 basepar (bp) og kan deles inn i tre funksjonelle regioner, en ikke-kodende region (LCR) og 8 gener fordelt på to kodede regioner, tidlige (E) og sene (L) <sup>3,4,8,17</sup> (figur 2).





**Figur 2: Genomorganiseringen for *Alfa pillomavirus*.** Genomet er på rundt 8000 bp, og består av en ikke-kodende region (LCR) og åtte gener, som deles inn i tidlige (E) og sene (L). Pilene markerer promotorenes posisjon og PAE/ PAL viser tidlig og sent polyadenyleringssignal. Illustrasjon fra Doorbar et al. 2015 <sup>3</sup>.

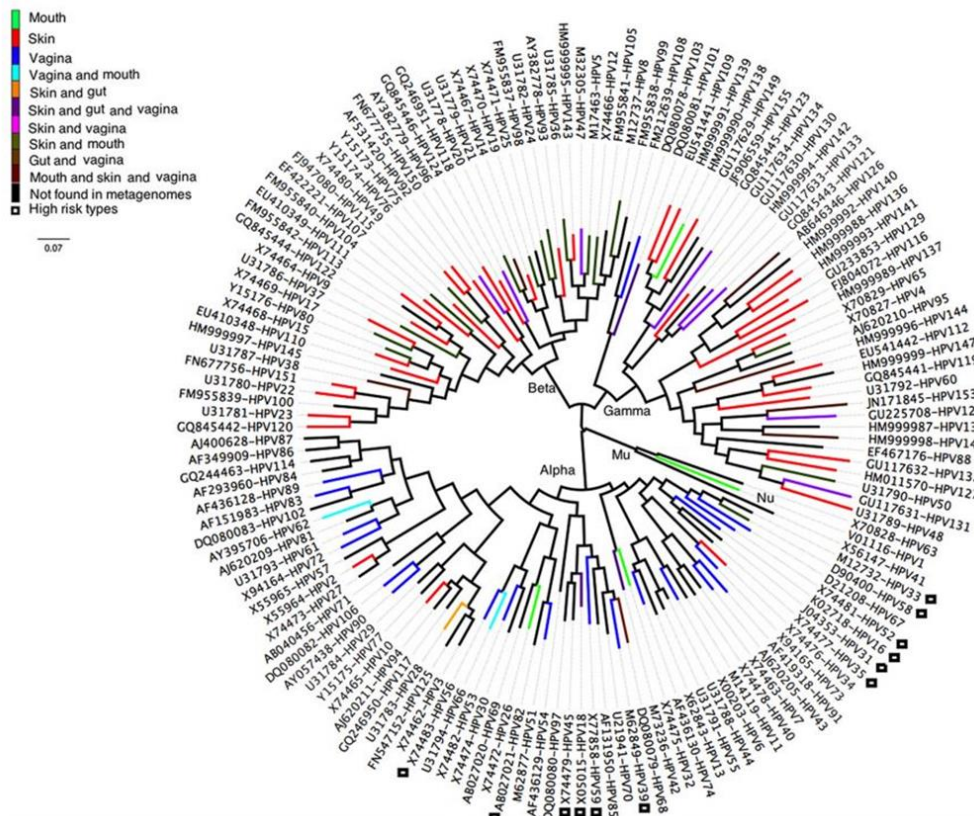
De tidlige og sene genene hos viruset kan igjen deles i to grupper, der E1 og E2 sammen med L1 og L2 utgjør en gruppe av «kjernegener», som på tross av variasjon i størrelse og antall åpne leserammer (ORFs), er godt konserverte hos alle kjente typer av HPV. Dette er gener som er involvert i replikasjon (E1 og E2) og pakking (L1 og L2) av genomet. Disse genene har vært til stede under evolusjonen av PV og er derfor konservert i både sekvens og funksjon mellom ulike typer. Når det gjelder de resterende genene (E4, E5, E6 og E7), så er det større diversitet mellom de ulike HPV-typer. Dette er gener som har ulike funksjoner blant annet i regulering av cellesyklusen hos vertscellen, immunregulering og frigjøring av viruspartikler. Sekvens og funksjon varierer mellom ulike HPV-typer, men de koder alle for proteiner som generelt er involvert i å modifisere det cellulære miljøet for å tilrettelegge for virusets replikasjonsyklus og bidrar til virulens og patogenese <sup>3, 18</sup>.

Genuttrykket hos HPV er tett assosiert med cellenes differensieringsstatus i det smittede epitelet, der de tidlige genene (E-genene) uttrykkes i de basale delene av epitellaget, mens de sene genene (L-genene) og E4 uttrykkes i de øvre delene av epitelet <sup>19</sup>.

E6 og E7 er onkogener og deres uttrykk er assosiert med utvikling av kreft for noen HPV-typer. Disse genene koder for vekststimulerende proteiner og hemmer tumorundertrykkende gener. De har utviklet seg for å lette virusets replikasjon i stratifisert epitel, men de finnes ikke hos alle HPV-typer. Genproduktene utgjør en større variasjon både funksjonelt og på aminosyrenivå, enn hva som er tilfelle hos E1 og E2 <sup>2, 17, 18</sup>.

## 1.2.1 Fylogeni og klassifisering

Papillomavirus er hierarkisk klassifisert i genus, art og type basert på nukleotidlikhet. Klassifisering av PV baseres på sammenligning av gensekvens i L1, der det må være minst 90 % homologi mellom to sekvenser for at ulike PV klassifiseres som samme type. Ulike genera deler mindre enn 60 % av nukleotidsekvensen i L1, i tillegg må det være 23 – 43 % homologi i hele genomet. Arter innen en genus har mellom 60 og 70 % homologi i nukleotidsekvens i L1. Nomenklaturen for genusinndelingen er basert på det greske alfabetet, og PV er i dag inndelt i mange ulike genera. HPV er funnet hos fem av disse; *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* og *Nu*. *Gamma* er den største (80 typer) etterfulgt av *Alfa* (65), *Beta* (51), *Mu* (3) og *Nu* (1). De HPV-typene av størst medisinsk betydning tilhører genus *Alfa* PV, og klassifiseres som høyrisiko (HR) og lavrisiko (LR) basert på deres karsinogene egenskaper <sup>1, 2, 4, 6, 20</sup>. HPV's fylogenetiske inndeling <sup>21</sup> er vist i figur 3.



**Figur 3: Fylogenetisk tre for humant papillomavirus.** Treet viser fordelingen av HPV i 5 ulike genera; *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* og *Nu*, basert på homologi i L1. De ulike fargene representerer infeksjonssteder i ulike organer, som vist øverst til venstre i figuren. De 12 HR-HPV er markert med svarte bokser. Det fylogenetiske treet er fra 2012, og viser 148 typer. I dag er mer enn 200 HPV-typer funnet til å kunne smitte epitelet i hud og slimhinner hos mennesker. Modifiser illustrasjon fra Ma et al. 2014 <sup>21</sup>.

## 1.2.2 Genital HPV-infeksjon

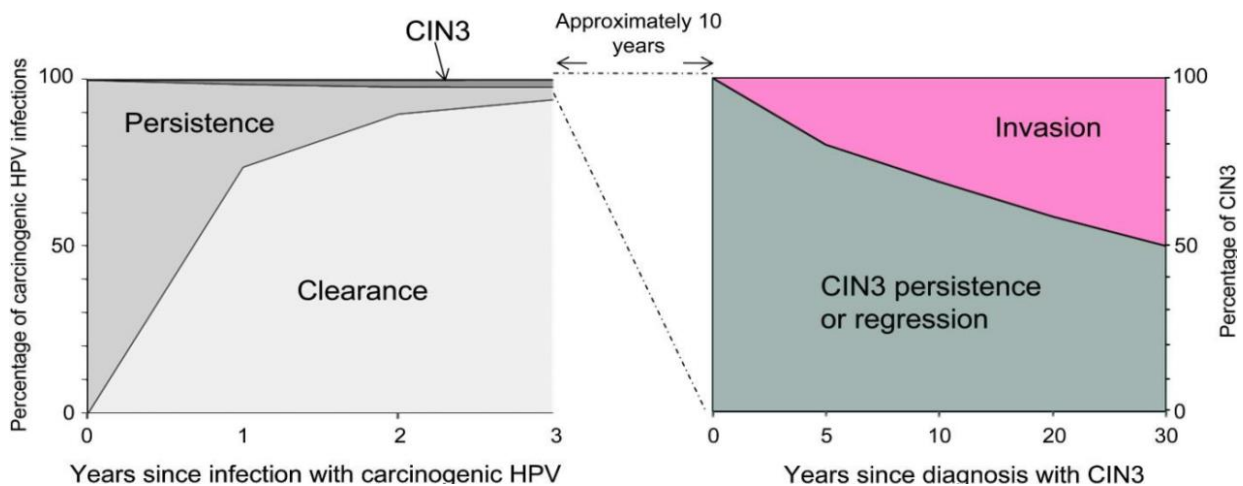
Genital HPV-infeksjon er den vanligste seksuelt overførbare infeksjonen blant kvinner. 10 % av befolkningen antas å være smittet til enhver tid, samtidig som mer enn 70 % av seksuelt aktive vil få en HPV-infeksjon i løpet av livet<sup>1, 22</sup>. Mer enn 40 HPV-typer, som alle tilhører genus *Alfa PV*, infiserer de genitale områdene, der slimhinnen i livmorhalsen, vagina, vulva, anus og penis er utsatt<sup>23</sup>. Av disse er det 12 typer som er klassifisert som HR (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, og 59); en type som sannsynlig HR (HPV 68) og 12 typer som mulige HR (HPV 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97), med bakgrunn i deres karsinogene egenskaper. De øvrige genitale HPV, deriblant HPV-typene 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 90 og 91 klassifiseres som LR<sup>24</sup>. 70 % av tilfellene av livmorhalskreft på verdensbasis forårsakes av HPV 16 og 18 (55 og 16 %), etterfulgt av HPV 33, 45, 31 og 58. LR-HPV-typene 6 og 11 forårsaker 90 % av anogenitale kondylomer<sup>25, 26</sup>.

HPV-infeksjon har høyest prevalens blant unge kvinner<sup>27</sup>. En norsk studie som undersøkte insidens hos uvaksinerte jenter, viste at mellom 15 og 20 % av 17 åringene og 45 % av 21 åringene som deltok i studien var positive for HPV i urin<sup>28</sup>. Både insidens og prevalens av HPV-infeksjon ser ut til å synke med alderen. Det er likevel vist en økning i prevalens blant eldre kvinner (65 år +), noe som kan blant annet skyldes svekket immunforsvar, som potensielt fører til reaktivering av latente infeksjoner<sup>27, 29</sup>. Multiple infeksjoner med HPV detekteres hyppig<sup>28, 30</sup>.

Genital HPV smitter ved seksuell kontakt, både ved samleie og berøring. Risikoen for infeksjon øker med antall seksualpartnere og tidlig seksuell debutalder<sup>27, 31</sup>. Perinatal smitte av genital HPV er også vist, der barnet kan smittes via fødselskanalen, eller ved vertikal smitte under svangerskapet. HPV er detektert i både i placenta og navlestrengsblod. En studie som har tatt for seg prevalens av HPV i livmorhalsen hos friske gravide kvinner, viste at 5 % av spedbarna var positive for HPV, der fødsel var gjennomført både vaginalt og ved keisersnitt<sup>32</sup>. HPV hos spedbarn kan ofte påvises i nasofarynks aspirater og i munnens slimhinner, der infeksjon med HPV 6 og 11 kan føre til RRP med utvikling av papillomer ved strupehodet. I 1 % av tilfellene vil alvorlige manifestasjoner i lungeparenkymet utvikles<sup>13</sup>.

### 1.2.2.1 Lesjonsprogresjon

I mer enn 90 % av tilfellene vil en HPV-infeksjon gå i regress innen 24 måneder, men i opptil 10 % av tilfellene kan infeksjonen vedvare og kan føre til celleforandringer i livmorhalsen. De fleste lesjoner i livmorhalsen går tilbake av seg selv, men hos noen kvinner vil de utvikle seg videre til kreft (figur 4). Fra en HPV-infeksjon etableres i livmorhalsen til høygradige celleforandringer kan detekteres vil det normalt ta mellom 7 og 15 år. I enkelte tilfeller kan høygradige celleforandringer utvikles i løpet av få måneder, men invasiv kreft utvikles normalt over en lang periode via forstadier, hvor det foregår en akkumulering av sekundære genetiske endringer over tid <sup>19, 22, 26, 27, 33, 34</sup>



**Figur 4: Persistens og progresjonsrisiko ved HPV-infeksjon.** Grafen til venstre viser en prosentvis andel av HR-HPV-infeksjoner som i løpet av de første tre årene enten vil klareres, persistere, eller utvikles til høygradige celleforandringer. Grafen til høyre viser andelen infeksjoner som vil videreutvikles til livmorhalskreft, ved mangel av behandling Illustrasjon fra Schiffman et al. 2011 <sup>34</sup>.

Celleforandringer graderes fra lavgradige til høygradige og navngis basert på funn ved cytologi og histologi (tabell 1). Celleforandringer påvist ved celleprøve utført ved cytologisk undersøkelse betegnes som skvamøse intraepitele lesjoner (SIL), mens celleforandringer påvist i vevsprøver ved histologisk undersøkelse klassifiseres som Cervical intraepitelial neoplasier (CIN) <sup>22, 35, 36</sup>.

CIN graderes etter alvorlighetsgrad fra CIN1 til CIN3, der CIN2/ 3 betegnes som alvorlige forstadier til kreft <sup>22, 35, 36</sup>. 20 % av tilfellene av CIN1 vil utvikles til CIN2, rundt 30 % av CIN2 tilfellene vil utvikles til CIN3, og uten behandling vil anslagsvis 40 % videreutvikles til kreft <sup>19</sup>.

**Tabell 1: Gradering av cytologi og histologi.** Tabellen er utarbeidet fra kreftregisterets flytskjema for masseundersøkelse mot livmorhalskreft og Pedersen et al. <sup>35, 36</sup>.

<b>Gradering av cytologi og histologi</b>	
<b>Cytologi</b>	
NILM	Negativ for intraepitelial lesjon eller malignitet
*ASC-US	Atypiske skvamøse celler av usikker betydning
*LSIL	Lavgradig skvamøs intraepitelial lesjon
*ASC-H	Atypiske skvamøse celler, kan ikke utelukke HSIL
*HSIL	Høygradig skvamøs intraepitelial lesjon
**AGUS	Atypiske sylindere/ kjertelceller av usikker betydning
**ACIS	Adenokarsinoma in situ
***Kreft	Kreft
<b>Histologi</b>	
Normal	Uten påviste neoplastiske forandringer
CIN1	Cervical intraepitelial neoplasi grad 1
CIN2	Cervical intraepitelial neoplasi grad 2
CIN3	Cervical intraepitelial neoplasi grad 3
**ACIS	Adenokarsinoma in situ
***Kreft	Kreft

\* Skvamøse celler representerer plateepitelceller. \*\*Celleforandringer i Sylinderepitelet. \*\*\* plateepitelkarsinom eller adenokarcinom

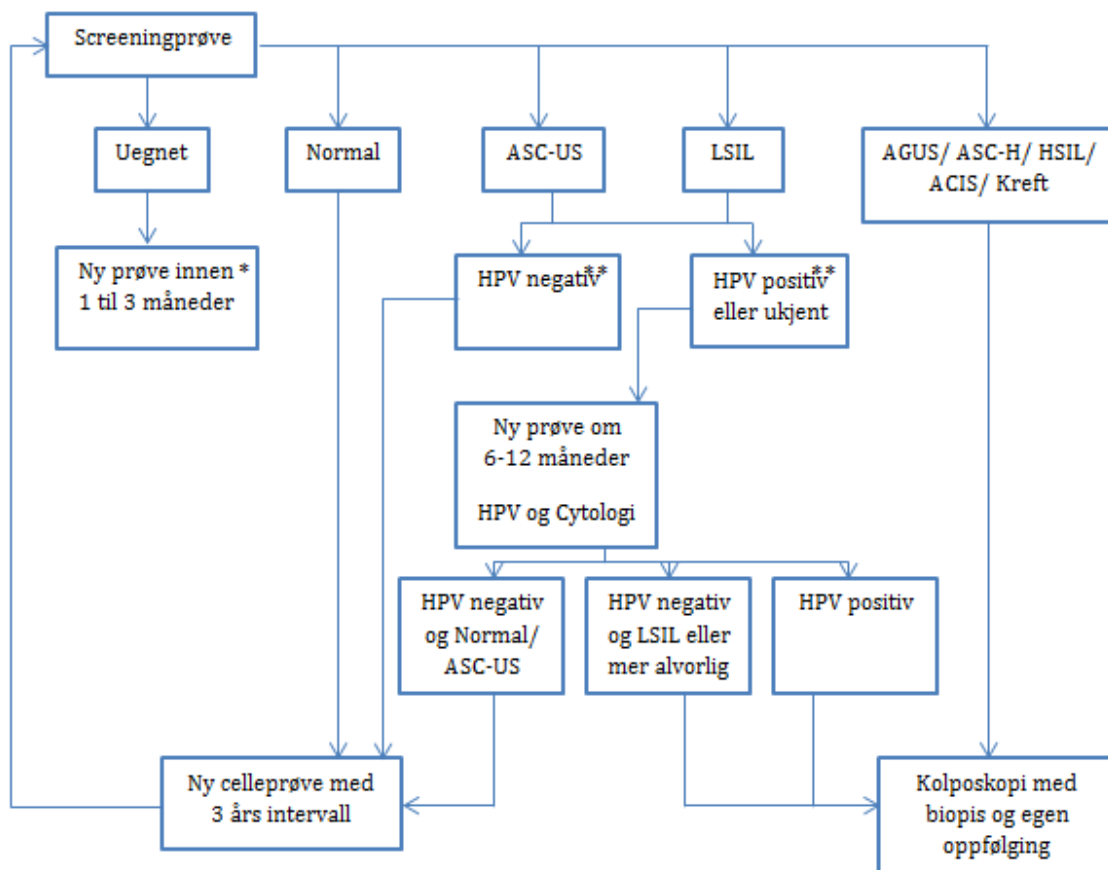
En persisterende HPV-infeksjon er en nødvendig faktor for utvikling av livmorhalskreft, men er ikke alene en tilstrekkelig årsak <sup>17</sup>. Det finnes flere kofaktorer som påvirker karsinogenesen, blant annet røyking og langtidsbruk av hormonbaserte prevensjonsmidler <sup>15, 19, 25, 26</sup>. I tillegg er det vist at multippel HPV-infeksjon, koinfeksjon med andre seksuelt overførbare agens, samt faktorer som påvirker immunresponsen, også kan være risikofaktorer for kreftutviklingen <sup>25</sup>.

Det finnes ingen målrettet behandling av infeksjoner med HPV, og alvorlige forstadier i livmorhalsen fjernes ved kirurgisk behandling i en prosedyre kalt konisering. Ved konisering fjernes en kjegleformet bit av livmorhalsen, med det området der infeksjonen sitter <sup>22</sup>.

I 2009 ble den kvadrivalente HPV-vaksinen Gardasil innført i barnevaksinasjonsprogrammet. Denne gir beskyttelse mot smitte med HPV 16 og 18, samt kondylomassosierte HPV 6 og 11. Det estimeres at denne vaksinen har potensiale til å forebygge rundt 90 % av høygradige celleforandringer forårsaket av HPV-type 16 og 18. Selv med vaksinerings vil screening fremdeles være viktig for å forebygge kreft assosiert med de HPV-typer som ikke er inkludert i vaksinen, og som forårsaker 30 % av alle tilfeller av livmorhalskreft <sup>37, 38</sup>. En nivalent vaksine; Gardasil<sup>®</sup>9, som beskytter mot flere HPV-typer (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) har nylig fått markedsføringstillatelse i Europa, men er foreløpig ikke valgt i barnevaksinasjonsprogrammet i Norge <sup>39</sup>. Fra høsten 2017, i forbindelse med nytt flerårig tilbud, vil den bivalente vaksinen Cervarix gis i barnevaksinasjonsprogrammet. Denne beskytter mot HPV 16 og 18 <sup>39, 40</sup>.

### 1.2.2.2 Screeningprogrammet i Norge

I Norge gjennomføres det masseundersøkelse mot livmorhalskreft, der det gjennomføres en cytologi-basert screening av kvinner mellom 25 og 69 år med tre års intervall. Det er om lag 70 % oppslutning om livmorhalsprogrammet, og det tas årlig rundt 430 000 celleprøver, der i underkant av 30 000 får påvist celleforandringer. Ved påvisning av ASC-US eller LSIL utføres det en HPV-test direkte på samme prøve (reflekstesting), men dersom ASC-H eller HSIL påvises, henvises kvinnen til kolposkopi med biopsi. Sistnevnte er også tilfelle ved vedvarende LSIL eller persisterende HPV-infeksjon, slik angitt i nasjonale retningslinjer (figur 5). Dersom histologisk undersøkelse påviser CIN2/3, blir kvinnen som regel behandlet med konisering <sup>36, 41</sup>.



**Figur 5: Screeningprogrammet ved masseundersøkelsen mot livmorhalskreft.** Cytologi-basert screening av kvinner mellom 25 og 69 år med tre års intervall, samt oppfølgingsprogram ved funn av celleforandringer eller uegnet prøve. Tettere oppfølging er anbefalt for kvinner i risikogruppen. \*Ved repeterte uegnede celleprøver er det anbefalt å henvise til gynekolog. \*\*HPV-analyse utført på væskebasert primærprøve. Ved uegnet prøve tas ny celleprøve for cytologi og HPV-test i løpet av 6-12 måneder. Flyttdiagram laget etter mal fra Kreftregisteret <sup>35</sup>.

Bruken av HPV-test i screeningprogrammet ble endret i 2014. Tidligere ble ikke kvinner HPV-testet umiddelbart etter påvisning av ASC-US/LSIL, men henvist til cytologi og HPV-test etter 6-12 måneder (utsatt testing). Ved HPV positivitet og cytologigrad ASC-US+ ble kvinnene henvist til kolposkopi med biopsi, i henhold til de eldre retningslinjene.<sup>41</sup>

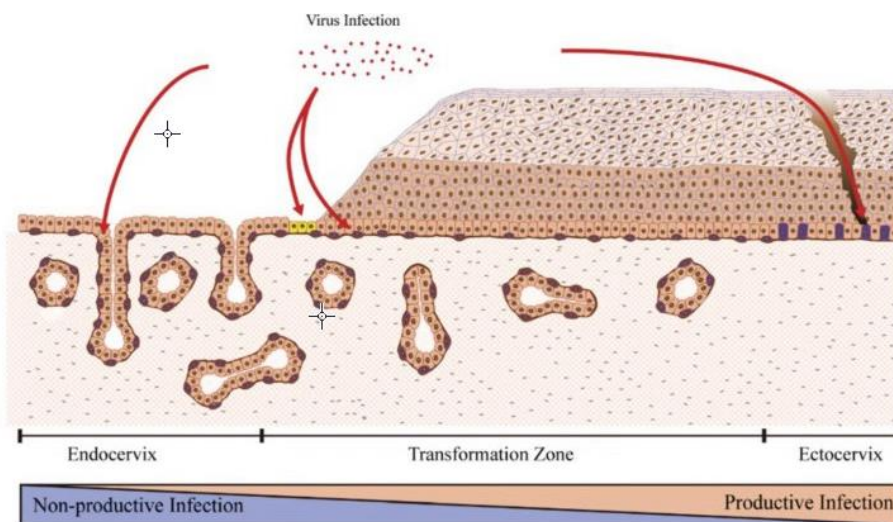
I Norge gjennomføres det rundt 3000 koniseringer årlig, der kvinnenes medianalder ligger på 35 år<sup>41</sup>. Forekomsten av livmorhalskreft har gått ned etter innføring av screeningprogrammet i 1995, men programmet innebærer også visse svakheter. Utvikling av livmorhalskreft kan forekomme på tross av tidligere rapporterte normale funn ved cytologiscreening. Dette kan blant annet skyldes dårlig prøvetakning med for få, eller ikke representative celler, eller det faktum at cytologisk vurdering gjøres visuelt av ulike fagpersoner med ulik grad av erfaring. Ved biopsitakning kan det samtidig også hende at den aktuelle lesjonen ikke kommer med når det ikke er noe synlig på kolposkopi<sup>36, 38</sup>. Mellom 30 og 50 % av tilfellene av livmorhalskreft forekommer hos kvinner som har fulgt screeningprogrammet og hatt normale celleprøver. Det er i tillegg vanskelig å oppdage adenokarsinom med cytologibasert screening. Innføring av screening-programmet har ikke vist noen nedgang for denne kreftformen, som utgjør 20 % av livmorhalskrefttilfellene<sup>22</sup>. Det foregår nå en implementering av HPV-test i primærscreeningen, som forventes å forebygge flere tilfeller av livmorhalskreft<sup>41, 42</sup>.

Til gjengjeld vil de fleste tilfeller av celleforandringer gå tilbake av seg selv. En konisering av alle kvinner med CIN2/3 medfører derfor også en behandling av kvinner som ikke ville utviklet livmorhalskreft. Det er uvisst hvor stor andel av koniseringstilfellene som kunne vært unngått dersom en kunne skille lesjoner som vil progrediere fra de som vil gå i regress, men Kreftregisteret anslår at mer enn 2200 årlige tilfeller representerer en overbehandling. Konisering kan forårsake redusert fertilitet, senabort og prematur fødsel. Risikoen for perinatal dødelighet er også større, sammenlignet med svangerskap hos kvinner som ikke er konisert<sup>22, 36, 38</sup>. Selv om innføringen av screeningprogrammet har bidratt til en nedgang i antall tilfeller av livmorhalskreft, er det ikke mulig å skille kvinnene som kommer til å utvikle livmorhalskreft fra de som har en infeksjon som vil gå i regress basert på morfologiske undersøkelser eller HPV-test. Identifisering av gode biomarkører for sykdoms-progresjon vil ha stort potensiale for å bedre treffsikkerheten av behandlingen<sup>29, 36</sup>.



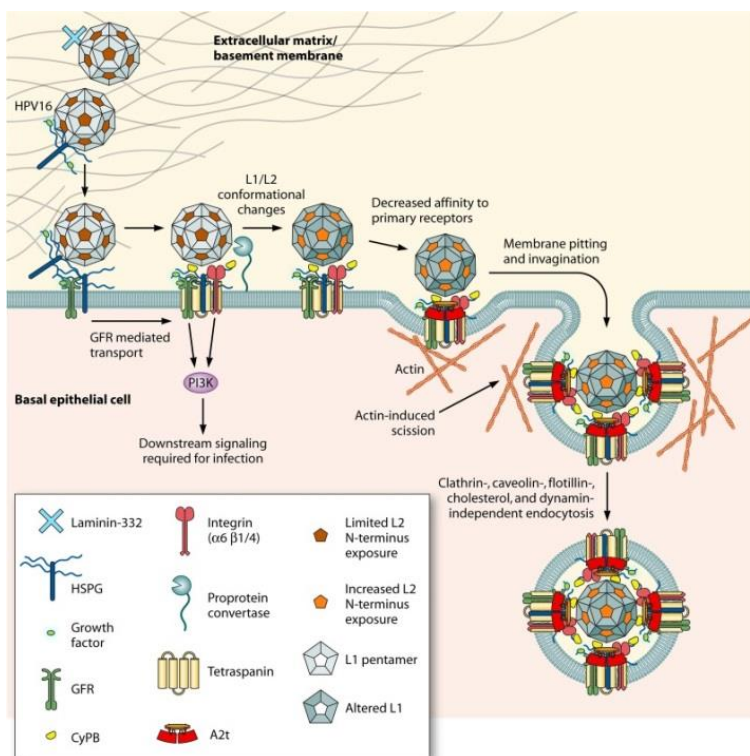
### 1.2.3 Livssyklus og mekanismer ved karsinogenese i livmorhalsen

Virusets livssyklus og genuttrykk reguleres under celledifferensieringen i det smittede epitelet. Målcellene i epitelet for HPV-smitte er de basale cellene, ettersom viruset er avhengig av replikerende celler for å starte sin egen replikasjon<sup>8, 18</sup>. Viruset koder ikke for noen replikaser og er derfor avhengig av vertscellens DNA polymerase, som kun uttrykkes i prolifererende celler. Det antas at viruset får tilgang til basalcellene via små rifter i epitelet, og spesielt stamcellene i det basale epitellaget er assosiert med langvarig infeksjon og latens. Fornyelse av epitelet oppnås ved produksjon av celler som prolifererer et begrenset antall ganger før de differensierer fra stamcellene. De differensierte cellene skyves opp mot ytre del av epitelet av nye celler som produseres på undersiden, og når de når overflaten vil de gå inn i terminal fase. Epitelcellene i transformasjonssonen mellom plateepitel og sylinderepitel i livmorhalsen er spesielt utsatt for infeksjon, da viruset her får lettere tilgang til de basale cellene. I livmorhalsen er både cylinderepitelceller, cellene i squamocolumnar junction, de basale cellene i transformasjonssonen mellom cylinder og plateepitel, samt basalcellene i plateepitel mottagelige for HPV-infeksjon (figur 6)<sup>3, 17, 18</sup>.



**Figur 6: Målceller for HPV-infeksjon.** En HPV-infeksjon kan oppstå enten i endocervix, i transformasjonssonen eller i ektocervix, der ikke-produktive infeksjoner er vanligst i endocervix og produktive infeksjoner oftest forekommer i ektocervix. De fleste tilfeller av livmorhalskreft utvikles i transformasjonssonen. Både cylinderepitelceller, cellene i squamocolumnar junction, de basale cellene i transformasjonssonen mellom cylinder og plateepitel, samt basalcellene i plateepitel er mottagelige for HPV-infeksjon. Frie viruspartikler er vist som røde prikker og de røde pilene indikerer de ulike infeksjonssetene. Modifisert illustrasjon fra Egawa et al. 2015<sup>18</sup>.

Når HPV binder til målcellen vil partiklene tas sakte opp i cellen, en prosess som innebærer en serie av interaksjoner mellom virusets kapsidproteiner og flere reseptorer på celleoverflaten <sup>19, 43, 44</sup>. Virusets primære bindingsreseptor er Heparansulfat proteoglykan (HSPG), men andre koreseptorer som  $\alpha 6$ -integrin og annexin A2-heterotetramer er også nødvendige for cellesmitte, og er involvert i selve opptaket. HSPG er en konserverv reseptor som finnes på overflaten hos de fleste celler, i tillegg til i den ekstracellulære matriksen (EMC) <sup>19, 45</sup>. Virusets binding til reseptorene fører til konformasjonsendringer i det virale kapsidet som er nødvendige for infeksjon. Konformasjonsendringer fører til eksponering av den N-terminale enden av L2-proteinet som innehar et furin-kløyvingssete som er konserverv blant alle HPV-typer. Kløyving av L2 ved hjelp av furin medfører eksponering av tidligere skjulte deler av L1 som utgjør bindingssete for en sekundær reseptor. Affiniteten for HSPG senkes, noe som resulterer i overføring til den sekundære reseptoren, og påfølgende endocytisk opptak i cellen <sup>44-46</sup> (figur 7).



**Figur 7: HPVs binding til reseptorer og opptak i målcellen.** HPV 16 overføres til HSPG på målcellens overflate via Laminin-322 i den ekstracellulære matriks. Under prosessen kan ulike cellulære vekstfaktorer aktiveres av binding mellom viruset og HSPG, noe som igjen kan påvirke intracellulære signaler som er nødvendig for infeksjon. Binding til reseptoren innleder samtidig konformasjonsendringer i viruskapsidet, som gjør det mulig for viruset å binde til  $\alpha 6$  integrin og andre ko-reseptorer som leder til virusets opptak i cellen via endocytose. Illustrasjon fra Raff et al. 2013 <sup>44</sup>.

Avkapsling av viruset foregår i det sene endosomet, før L2-bundet genom frigjøres omlag 10 – 16 timer etter opptak i cellen. For at viruset skal kunne replikere må dette L2-genomkomplekset tas opp i cellekjernen, en prosess som utføres når den smittede cellen deler seg, og kjernemembran brytes ned under mitosen. Celledeling er dermed nødvendig for etablering av HPV-infeksjon med replikasjon og uttrykk av det virale genomet <sup>46</sup>.

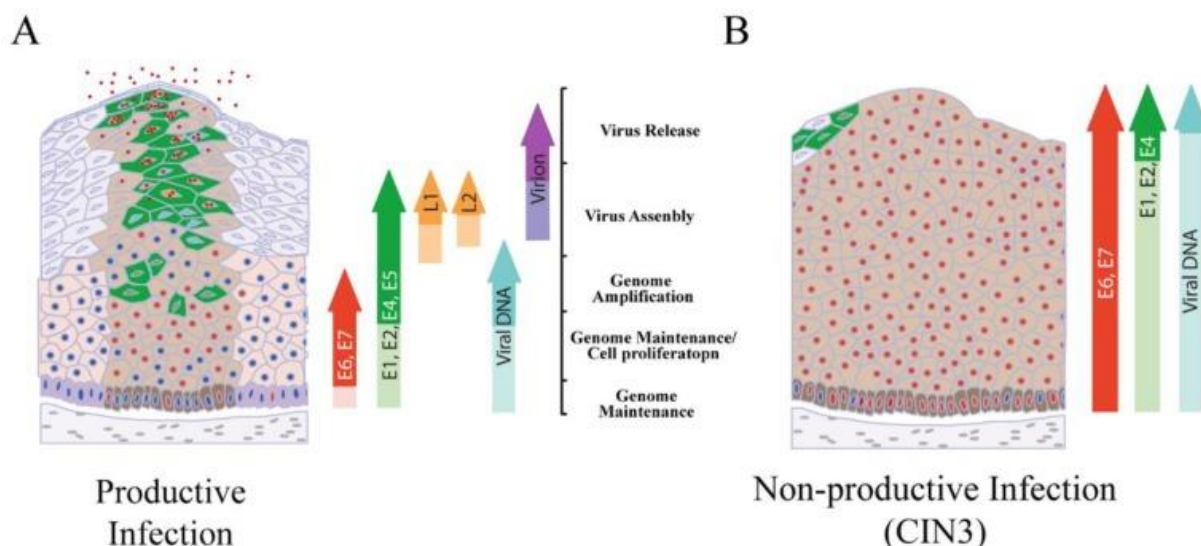
Det går lang tid fra viruset binder til cellen, til det virale genomet uttrykkes. En HPV-infeksjon inntreffer i områder der det er oppstått rifter eller skade i epitelet, noe som oftest trigger vertens immunrespons. Det er spekulert i hvorvidt den forsinkede infeksjøs prosessen hvor oppstarten av virale genuttrykk utsettes, kan være en evolusjonær utvikling av HPV for å unngå den innledende immunresponsen mot infeksjonen <sup>46</sup>.

I det basale cellelaget er det kun de tidlige genene som uttrykkes. Replikasjonssyklusen innledes med en fase der det virale genomet replikeres episomalt til et relativt lavt antall (50-200 kopier/celle) inne i kjernen til prolifererende celler. I denne prosessen er E1 og E2 essensielle, der E1 er involvert i selve DNA-replikasjon, mens E2 er involvert både i replikasjon og i transkripsjonsregulering av de virale genene <sup>5, 8, 25</sup>.

Viruset må aktivere cellesyklusen under differensiering av cellen, som en del av sin livssyklus i epitelet. Når de smittede cellene når det øvre epitellaget modifiseres det cellulære miljøet slik at det legges til rette for amplifisering av det virale genomet, hovedsakelig ved å fremme gjeninntreden inn i S-fasen av cellesyklusen. Selve amplifiseringen av genomet gjennomføres når cellen går fra S- til G2-fasen i cellesyklusen <sup>3, 18</sup>. De virale genene E6 og E7 er involvert i de prosessene som fører til proliferasjon av epitelceller, som normalt skulle ha sluttet å dele seg. I denne prosessen danner de virale proteinene interaksjoner med flere cellulære proteiner, der spesielt interaksjonen med proteinene Retinoblastoma (pRB) og p53 er hovedmekanismene for deregulering av celledeling. PRB og p53 er tumorundertrykkende proteiner som er sentrale i kontroll av cellesyklus. E7 binder til pRB og aktiverer transkripsjonsfaktoren E2F som vil trigge uttrykk av proteiner som er nødvendig for celleproliferasjon og DNA replikasjon. E7 kan også binde og degradere p105 og p107, som kontrollerer inngang til cellesyklus i det basale epitellaget, i tillegg til p130 som er involvert i gjeninntreden av cellesyklusen i det øvre epitellaget. E6 binder til p53 og fører til proteolytisk

degradering av dette proteinet, noe som hindrer p53-mediert apoptose av celler med DNA-skade. Kombinasjon av aktiviteten til E6 og E7 kan medføre genomisk ustabilitet og akkumulering av onkogene mutasjoner, og dette kan til slutt lede til utvikling av kreft. Funksjonelle variasjoner i E6 og E7 representerer en viktig forskjell i patogenese mellom ulike LR- og HR-HPV-typer. Nevnte interaksjoner med pRB og p53 er antatt å være avgjørende for HR-HPVs evne til å føre til utvikling av kreft. Uttrykk av E6 og E7 er normalt strengt regulert i HPV's replikasjonsyklus, blant annet ved E2 proteinet, som inhiberer transkripsjon av E6 og E7 <sup>3, 5, 18, 25</sup>.

Ved en prolifererende infeksjon, aktiveres den sene promotoren i de øvre epitellagene, slik at kapsidproteinene (L1 og L2) uttrykkes, og det amplifiserte virale genomet kan pakkes til viruspartikler. E4-proteinet har en primær funksjon i frigjøring av viruspartiklene og/eller transmisjon ved å forstyrre cellens keratinnettverk. Viruset er ikke lytisk, og viruspartiklene frigjøres fra cellene i det ytterste epitellaget når cellene utstøtes som følge av den naturlige prosessen ved fornying av epitelet. Viruset har fullført sin livssyklus og nye viruspartikler kan infisere nye celler. I motsetning til den produktive replikasjonsyklusen oppstår det i noen tilfeller forstyrrelser i uttrykk av de tidlige genene i løpet av prosessen, noe som fører til at den komplette virale replikasjonsyklusen ikke blir gjennomført, slik at nye viruspartikler ikke produseres. I slike tilfeller kan høygradige lesjoner utvikles. En økning i nivået av E6 og E7, også i øvre deler av epitellaget, er direkte relatert til økende alvorlighetsgrad av lesjoner i livmorhalsen, og fører til transformerende, ikke-produktive infeksjoner <sup>4, 18, 19, 25</sup> (figur 8).



**Figur 8: Regulering og deregulering av livssyklus hos HR-HPV.** Virusets genuttrykk reguleres under celledifferensieringen, der genene som er uttrykt i de ulike fasene av replikasjonsyklus i epitelet er vist i form av piler til høyre. Cellene markert med rød kjerne, er celler som drives inn i celledyklus ved uttrykk av E6/E7. Grønne celler med rød kjerne representerer celler der det foregår en oppregulering av de virale proteinene som er nødvendig for amplifisering av genomet. **(A)** Viser en produktiv HPV-infeksjon med frigjøring av viruspartikler fra overflaten av epitelet. **(B)** Viser en ikke produktiv infeksjon, der det ikke lenger foregår uttrykk av E5, L1 eller L2, og heller ingen frigjøring av viruspartikler. Illustrasjon fra Egawa et al. 2015<sup>18</sup>.

Integrasjon av det virale episomet i vertens DNA er ofte assosiert med økt uttrykk av E6/E7 ved at lineariseringsprosessen av det virale genomet bryter ned E2 genområdet. Dette vil resultere i tap av negativ regulering av transkripsjon av E6 og E7, som igjen vil medføre et økt uttrykk av de aktuelle genene<sup>3, 4, 17, 25</sup>. Integrasjon av HPV-genomet er ikke alltid nødvendig for karsinogenese. Integrerte sekvenser vises i rundt 70 % av krefttilfellene forårsaket av HPV 16, i motsetning til i nesten 100 % av krefttilfellene forårsaket av HPV 18<sup>3</sup>. Andre faktorer, slik som epigenetiske modifiseringer, kan også være assosiert med økt uttrykk av E6 og E7<sup>4</sup>.

Transformerende infeksjoner ses hyppigst i transformasjonssonen i livmorhalsen som ikke har et fullt lag med plateepitel<sup>26</sup>. Forstadiene til kreft rangeres fra CIN1-3 i plateepitel før plateepitelkarsinom, mens det i tilfeller der HPV persisterer i sylinderepitel vil det kunne oppstå ACIS som forstadier til adenomkarsinom.

## 1.2.4 Immunrespons

Utvikling av høygradige celleforandringer og livmorhalskreft krever en persisterende HPV-infeksjon, noe som forutsetter at viruset klarer å skjule seg for immunforsvaret over en lengre periode. Flere HPV-typer har utviklet en rekke strategier som gjør det mulig å unngå immunsystemet. Virusinfeksjonen er ikke lytisk og fremmer derfor ikke inflammatoriske respons i det smittede vevet. Infeksjonen i epitelet ledsages heller ikke av viremi, og epitelets dendritiske celler blir ikke rekruttert til infeksjonssetet<sup>3</sup>. De tidlige proteinene som medierer celleproliferasjon i de nedre epitellagene er antatt å uttrykkes på nivåer som er lavere enn hva som er nødvendig for å trigge en effektiv immunrespons hos verten. Selv om en HPV-infeksjon ikke medfører celledød, og dermed ikke fører til et klart faresignal som varsler immunforsvaret, så vil cellen normalt skille ut type 1 interferoner ved infeksjon. E6/E7 hos HR-HPV har derimot evne til å hindre interferonsignalisering ved å danne interaksjoner med komponenter involvert i signalveien. Dette vil også hindre aktivering av dendritiske celler<sup>19,47</sup>.

Målbare nøytraliserende antistoffer (rettet mot L1) påvises kun hos omlag 50 % av de smittede<sup>48</sup>, og når infeksjonen er etablert er det den cellulære immunresponsen som er viktig for bekjempelsen av infeksjon.

Det er vist at tilbakegang av kondylomer er mediert av en CD4+ T-lymfocyttdominert immunrespons. Stimulering av en cellemediert immunrespons ser ut til å være avhengig av kryssbinding av dendritiske celler med de ulike virale antigener uttrykt i keratinocytter. Ved tilfeller av livmorhalskreft vises ofte en redusert eller ikke eksisterende T-lymfocyttdominert respons mot den HPV-typen som er assosiert med utviklingen av kreft hos pasienten. Dette kan tyde på generell nedsatt immunrespons, eller immuncellers manglende evne til spesifikk gjenkjennelse av E6/E7 onkogener<sup>3,19</sup>. Ved en aktiv HPV-infeksjon er det L1 som uttrykkes i store mengder, og vil tas opp av immuncellene ved en eventuell immunrespons. Ved tilfeller av kreft foregår det ikke lenger en aktiv infeksjon, og heller ingen uttrykk av L1, slik at tidligere immunrespons rettet mot L1 ikke vil kunne være effektiv i bekjempelse av transformerende infeksjoner og kreft.

### 1.2.5 Aktuelle progresjons biomarkører

Progresjons biomarkører vil ha potensiale til å optimalisere screening og behandling, og samtidig senke tallet av overbehandling. Ulike markører kan benyttes for å skille risiko for sykdomsprogresjon ved ulike faser av HPV-assosiert neoplas. Tidlige biomarkører, som skiller mellom CIN1 infeksjoner som vil progrediere til CIN2/3 fra de som mest sannsynlig vil gå i regress, kan utgjøre et godt supplement til cytologi og HPV-testing. Tidlige biomarkører kan utgjøre en mer objektiv diagnostisk kriterie som vil føre til mindre usikkerhet for pasienten, samt til færre totalkostnader assosiert med repeterte tester. Andre biomarkører kan derimot være nyttige senere i progresjonen, og spesielt sene biomarkører vil kunne identifisere kvinner med stor risiko for metastaser ved påvist invasiv livmorhalskreft <sup>49-51</sup>.

Potensielle biomarkører av interesse er cellulære proteiner hvor mengde påvirkes av aktiviteten til de virale onkoproteinene <sup>50</sup>. Flere slike aktuelle cellulære markører er involvert i regulering av cellyklus, som blant annet p16 (p16<sup>INK4a</sup>) som over-uttrykkes som følge av E7-mediert inaktivering av pRb, og Ki-67 som er en celleproliferasjonsmarkør. Det er antatt at tilfeller av CIN1 der p16 kan detekteres har større sjanse til å utvikle høygradige celleforandringer enn tilfeller der p16 ikke kan detekteres <sup>49, 51</sup>. Flere studier har undersøkt effekten av å kombinere p16 og Ki-67 deteksjon i samme celle som en markør for forstyrrelse i cellyklus <sup>52</sup>. Innføring av p16/Ki-67 deteksjon i screeningprogrammet er estimert til å kunne halvere tilfellene av kolposkopi <sup>50</sup>.

Andre proteiner som er ansett som mulige biomarkører er ProEx C, som er involvert i DNA replikasjon under cellyklus, samt flere proteiner som reguleres av det virale E5-proteinet, slik som p21, p27, Cyclooxygenase (COX-2), Vascular endothelial vekstfaktor (VEGF) og Caveolin-1 (Cav-1). E5 kan også danne interaksjoner med Epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR) på celleoverflaten, noe som fører til en aktivering av ulike signalveier i cellen som blant annet er involvert i proliferasjon og apoptose. Det er vist at EGFR er overuttrykt i 70 – 90 % av tilfellene av livmorhalskreft <sup>50</sup>.

Feilregulering av mikroRNA (miRNA) ved livmorhalskreft er blitt koblet til persisterende HPV-infeksjon, og endret uttrykk i miRNA er også ansett som mulig lovende biomarkør ved HPV-infeksjon <sup>53, 54</sup>.

Andre markører som epigenetiske og genetiske hendelser er også blitt undersøkt i forbindelse med karsinogenese og spesielt differensiell metylering av flere viktige cellulære gener er påvist ved progresjon til livmorhalskreft <sup>55, 56</sup>.

Tidlig oppdagelse av kreft er en av de viktigste faktorene av betydning for sykdomsprognose. Hos kreftpasienter vil tumorvekst føre til en konstant tilførsel og akkumulering av tumormateriale, både cellerester og DNA, som frigis i blodbanen. Aktiv frigjøring av DNA til blodbanen hos kreftpasienter representerer også spontan frigjøring av DNA fragmenter fra levende kreftceller, vevsbundet eller sirkulerende. Det er uvisst hvorfor dette forekommer, men en teori er at kreftcellene frigjør onkogen DNA for å påvirke transformasjon av celler i flere organer <sup>57, 58</sup>. En metode som derfor nå benyttes i større grad er væskebiopsi, der sirkulerende fritt tumor-DNA (ctDNA) detekteres i blod. En væskebiopsi gjør det mulig å detektere tilfeller av kreft; både primære tilfeller og metastaser, ved hjelp av en blodprøve. ctDNA er frigjort tumor-DNA som sirkulerer i blodbanen, og muliggjør deteksjon og karakterisering av tumoren på et tidlig stadium <sup>57</sup>

Studier har vist at HPV-DNA kan detekteres i perifert blod hos kreftpasienter, og tilstedeværelse av HPV 16 og 18 E6 mRNA i perifert blod har blitt foreslått som en tidlig biomarkør for identifisering av pasienter med størst risiko for å utvikle metastase ved livmorhalskreft <sup>59, 60</sup>.



### 1.3 Påvisning av HPV-DNA i blod

HPV-infeksjon i epitelceller fører til en lokal infeksjon, uten viremisk fase, og det har derfor tidligere vært antatt at viruset ikke går over i blodbanen. Flere studier har nå vist at HPV-DNA likevel kan detekteres i perifert blod, inkludert fullblod <sup>61</sup>, serum <sup>62-67</sup>, plasma <sup>64, 66, 68-71</sup> og mononukleære celler (PBMC). <sup>43, 65, 72, 73</sup>. PBMC inkluderer lymfocytter, monocytt og naturlig drepeceller (NK-celler).

Det er ikke kjent hvorvidt HPV-DNA som detekteres i blod er cellefritt DNA (cfDNA) som skilles ut fra smittede celler ved apoptose eller nekrose, eller aktivt fra kreftceller. Om det er pakket genom i frie viruspartikler, eller i assosiasjon med antigenpresenterende celler, slik som PBMC. For sistnevnte kan HPV være bundet til cellenes overflatereseptorer, være tatt opp via endocytose og transportert uten aktiv viral replikasjon i blodbanen, eller skyldes replikasjon av viruset inne i cellene.

Det er tidligere antatt at påvisning av HPV-DNA i blod har sin opprinnelse fra kreftceller og at det virale DNAet som påvises hovedsakelig finnes integrert i vertsgenomet, noe som er bekreftet ved flere studier hos pasienter med ulike HPV-assosierte kreftformer. Det er blant annet gjennomført en rekke studier på deteksjon av HPV-DNA i blod ved livmorhalskreft og ved tonsillekreft. Ved livmorhalskreft er HPV-DNA påvist både i fullblod <sup>61</sup>, plasma <sup>64, 69-71</sup> og serum <sup>64, 67</sup>, med en prevalens på mellom 6,9 og 83 %. Ulike studier har vist varierende resultater i forhold til om deteksjon og konsentrasjon av HPV DNA i blod korrelerer med kreftens stadium <sup>64, 69-71</sup>. Enkelte rapporterer at deteksjon av HPV-DNA i blod korrelerer med metastase og dårlige prognoser <sup>70, 71</sup>, og derfor kan være en egnet prognosebiomarkør. Korrelasjon av HPV-type i blod og i livmorhalsen er også vist i varierende grad, der enkelte har bekreftet en korrelasjon på mellom 64 og 100 % ved sekvensering <sup>69, 70</sup>.

Når det gjelder HPV-assosiert tonsillekreft er det ved ulike studier vist en prevalens av HPV-DNA i serum <sup>62-64</sup> og plasma <sup>68</sup> på mellom 6 og 100 % (8/8). Flere studier har også i denne sammenheng vist en korrelasjon mellom deteksjon av HPV-DNA i blod og kreftens kliniske stadium <sup>63, 68</sup>. Resultatene fra en av studiene viste at 85 % av pasientene med HPV-DNA detektert i blod hadde et alvorlig stadium av kreft <sup>62</sup>. Det er derimot vist varierende resultater i forhold til hvorvidt HPV-DNA i blod korrelerer med tumorens størrelse og om deteksjon kunne benyttes som en markør for tilbakefall.

HPV-DNA i blod er også påvist ved et tilfelle hos en pasient med HPV 11-assosiert RRP, som hadde utviklet plateepitelkarsinom i begge lungene. Høye konsentrasjoner av HPV 11 ble detektert i både fullblod og plasma, men kunne ikke detekteres i cellefraksjoner av leukocytter og erytrocytter. Negative plasmaprøver som følge av nuklease behandling bekreftet at det var fritt HPV-DNA i plasma som var påvist, fremfor DNA i viruspartikler <sup>13</sup>.

En rekke studier har vist sammenheng mellom funn av HPV-DNA i ulike blodfraksjoner med livmorhalskreft og andre kreftformer, men få har påvist HPV-DNA i blod ved forstadier til kreft. I flere studier der HPV-DNA er undersøkt i blod hos kvinner med forstadier til kreft og kreft, er HPV-DNA ikke påvist i hverken fullblod <sup>61</sup>, plasma eller serum <sup>64, 70</sup> hos kvinnene med forstadier, mens HPV-DNA kunne påvises hos en del av kreftpasientene.

En nyere studie utført på en populasjon av kvinner med nylig oppdagede celleforandringer i livmorhalsen har derimot vist en prevalens av HPV-DNA i plasma på 34,2 %, der 20,8 % var positive for HR-HPV i både livmorhalsen og i plasma. Plasmaprøvene ble screenet for HPV-typene 16, 18, 31, 33, 45, 51 og 52, der HPV 45 var den mest prevalente typen (46,2 %), etterfulgt av HPV 51 (30,8 %) og HPV 16 (17,3 %), mens ingen var positive for HPV 31 eller 33. Denne studien ble presentert på en konferanse i 2016, men er foreløpig ikke publisert <sup>66</sup>.

I en tidligere studie med 25 kvinner bekreftet HPV-positive i livmorhalsen for HPV-typene 6, 11, 16 og/eller 18 (med ukjent grad av cervikale lesjoner) ble det påvist HPV-DNA i serum hos to av kvinnene, en med HPV 6 og en med HPV11. Prevalensen av HPV-DNA for de 4 HPV-typene var derimot på totalt 52 % i PBMC <sup>65</sup>.

I de ulike studiene er det inkludert kontrollgrupper av kvinner som verken har fått påvist HPV-infeksjon eller celleforandringer i livmorhalsen. I enkelte av disse studiene er HPV-DNA likevel detektert i fullblod <sup>61</sup> og plasma <sup>69</sup> hos disse kvinnene, med en prevalens på i gjennomsnitt 1,5 %.

HPV 16 E6 DNA, mRNA og protein er også detektert i hjernen hos barn i assosiasjon med Fokal kortikal dysplasi IIB (FCDIIB), som er en misdannelse som oppstår under utvikling av hjernebarken, og som er assosiert med barneepilepsi. Det er antatt at FCDIIB oppstår ved utvikling av hjernen på embryostadiet og studier har vist at misdannelser kan

detekteres allerede ved 24 ukers svangerskap <sup>16</sup>. Med bakgrunn i manglende mulighet for direkte smitte mellom ulike organer der HPV er påvist er det antatt at PBMC kan være bærere av HPV. Ved etablering av en infeksjon vil PBMC rekrutteres, der de tar opp mikroorganismer i både vevet og i blodbanen. PBMC kan derfor muligens fungere som en HPV-kilde for videre smitte i kroppen fra en infeksjon i epitelceller, og på den måten bidra til deres ikke seksuelle spredning via blodbanen <sup>72</sup>.

Deteksjon av HPV-DNA i assosiasjon med PBMC er påvist hos Humant immunsvikt virus (HIV) smittede pasienter med en prevalens på 14 %. Samme studie viste en prevalens på 15,8 % (3/19) hos friske blodgivere, der DNAet som ble påvist var i episomal form i lave konsentrasjoner <sup>72</sup>. HPV-DNA er også påvist i PBMC hos friske mannlige australske blodgivere med en prevalens på 8,3 % ved screening for et bredt spekter av HPV-typer fra flere genera. Prevalensen for HR-HPV i den aktuelle studien var på 1,7 %. En videre undersøkelse av blodcellefraksjonen hos en av de HPV-positive blodgiverne viste at HPV-DNA kunne detekteres i B-lymfocytter, NK-celler og nøytrofiler. Det ble samtidig vist at HPV sannsynligvis ikke var tatt opp i cellene, men bundet til reseptorer på utsiden, da HPV-DNA ikke lenger kunne detekteres etter trypsin-behandling av cellene <sup>73</sup>.

HPV-DNA er også funnet i PBMC hos 4 av 16 (25 %) menn som hadde oppsøkt en infertilitetsklinikk i Italia og som var positive for HPV 16 i sine sædprøver. Både E6 og L1 proteiner ble detektert i cellene, hovedsakelig i cytoplasma, der 60 % av de positive funnene ble påvist i NK-celler, 35 % i B-lymfocytter og 5 % i CD8+ T-lymfocytter. Hvorvidt HPV smitter PBMC eller tas opp ved immunmediert endocytose er ikke kjent, men både B-lymfocytter og NK-celler rekrutteres ved virale infeksjoner. Funn av L1 protein i cytoplasma kan settes i sammenheng med opptak i cellen via endocytose, relatert til immunrespons. E6 uttrykkes under en aktiv infeksjon, og er ikke en del av HPV-partikkelen. Funnet av E6 protein hos B-lymfocytter, som uttrykker HSPG reseptorer, samt hos NK-celler, kan tyde på at de kan representere mulige målceller for en HPV-infeksjon <sup>43</sup>.

Ved påvisning av HPV-DNA i blod er ulike metoder og betingelser for ekstraksjon, prøvevolum, og deteksjon benyttet ved ulike studier. De fleste er basert på påvisning med spesifikke primere og prober kun for HPV 16 og 18 i E6/ E7 med real-time PCR <sup>61-64, 68, 69, 72</sup>, mens generiske primere for alphavirus (MY09/MY11) <sup>62, 70</sup> eller enda flere HPV-

typer (FAP59/FAP64) <sup>73</sup> er benyttet i andres studier for påvisning av det konserverte genet L1. Andre spesifikke primere <sup>66</sup> eller kommersielle kitt er også benyttet i enkelte studier <sup>43</sup>. Ekstraksjonsprotokoller, samt påvisningsmetoder og antall HPV-typer som er undersøkt antas å påvirke resultatene. Droplet digital PCR (ddPCR) ble blant annet vist å være mer sensitiv for deteksjon av HPV-DNA i serum, spesielt for eldre materiale, i forhold til qPCR (87 % mot 68,6 % positivitet) <sup>64</sup>.

## **2 Formålet med studien**

Formålet med studien var å undersøke om tilstedeværelse av HPV-DNA i serum hos kvinner med ulik grad av celleforandringer i livmorhalsen er assosiert med lesjonsgrad og dermed kan benyttes som biomarkør for å identifisere kvinner med størst progresjonsrisiko.

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Studiepopulasjon

Materialet benyttet under denne studien er serumprøver som er samlet av gynekolog Ingrid Baasland ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim i tidsrommet 2010 – 2012, som en del av hennes doktorgrad. Prosjektet er godkjent av de Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK Vest 2010/420), og omhandler 304 kvinner som er henvist til gynekolog for kolposkopi og biopsi etter unormale cytologifunn i celleprøver fra livmorhalsen. Dersom histologisvaret fra biopsi viste at kvinnene hadde behandlingstrengende lesjoner ble de konisert og histologisvaret ble også registrert fra koniseringspreparatet. I videre omtale av histologidiagnose er det den alvorligste diagnosen (fra biopsi eller konisering) som benyttes ved diskrepans. Under legebesøket ble det også tatt celleprøve fra livmorhalsen for cytologi og HPV-testing, samt serumprøve fra alle kvinnene. Serumet ble prosessert etter rutiner ved det aktuelle laboratoriet, og frosset ved -80 °C til det ble tatt i bruk i denne studien. Celleprøvene ble HPV-testet med en kommersiell genotype test; Anyplex™ II HPV28 detection (Seegene, Seoul, Korea, katalognummer: HP7S00X) som påviser og genotyper 28 ulike HR- og LR-HPV-typer. Median alder i populasjon var 35 år (19 – 75 år).

Av de 304 pasientene ble 216 diagnostisert i histologiske prøver, med ulike grader av celleforandringer eller kreft, der 203 viste positivt resultat for minst en HPV-type. 87 pasienter hadde normale celleprøver, men også her var 45 positive for HPV. Fordelingen av diagnoser og HPV-positivitet er vist i tabell 2.

**Tabell 2: Diagnostisk fordeling av 304 kvinner etter histologisk undersøkelse med tilknyttet HPV-test resultat.** Resultatene for HPV-positivitet i livmorhalsen er vist med fordeling av enkle og multiple infeksjoner (enkel/multippel)

<b>Diagnose</b>	<b>Antall</b>	<b>Positiv for HPV</b>
Normal	88	47 (28 / 19)
CIN1	37	25 (7 / 18)
CIN2	33	32 (12 / 20)
CIN3	138	137 (58 / 79)
ACIS	5	5 (5 / 0)
Kreft	3	3 (0 / 3)
<b>Totalt</b>	<b>304</b>	<b>249 (110 / 139)</b>

Pasientene som hadde positiv HPV-test for HPV 16, 31 og/eller 45 ble valgt ut til å inngå i dette prosjektet, uavhengig av om HPV-typerne var tilstede som enkel- eller multippel infeksjon. Det ble samtidig valgt ut en kontrollgruppe med ti pasienter med normale prøver og negativ HPV-test. I tillegg til nevnte prøver ble det valgt å inkludere alle pasienter som ble diagnostisert med ACIS eller kreft på grunnlag av alvorlighetsgrad, uavhengig av HPV-type påvist i livmorhalsen. De tre kreftpasientene hadde alle plateepitelkarsinom på tidligste stadium (stadium 1A). Totalt ble 159 serumprøver undersøkt i prosjektet. Medianalder i denne undergruppen var 30 år (19-60 år).

HPV 16 og 31 ble valgt ut på grunnlag av høy prevalens i livmorhalsen ved ulike grader av celleforandringer i denne studiepopulasjonen, både i form av enkel og multippel infeksjon. Totalt 86 prøver var positive for HPV 16, og 52 var positive for HPV 31. HPV 45 ble valgt ut på grunnlag av hyppige funn i plasma ved en tidligere utført studie i Italia<sup>74</sup>. Totalt 21 pasienter var positive i livmorhalsen for HPV 45 i denne studiepopulasjonen. De tre HPV-typeres prevalens blant de ulike diagnosene er vist i tabell 3.

**Tabell 3: HPV-prevalens blant de ulike diagnosene.** HPV-positivitet er vist ved totalt antall, samt fordeling av enkel og multippel infeksjon (enkel/multippel) ved de ulike gradene av lesjoner i livmorhalsen.

<b>Diagnose</b>	<b>HPV 16</b>	<b>HPV 31</b>	<b>HPV 45</b>
Normal	7 (3 / 4)	7 (5 / 2)	3 (1 / 2)
CIN1	6 (1 / 5)	5 (1 / 4)	2 (0 / 2)
CIN2	10 (3 / 7)	8 (1 / 7)	0 (0 / 0)
CIN3	61 (24 / 37)	31 (12 / 19)	15 (7 / 8)
ACIS	1 (1 / 0)	0 (0 / 0)	1 (1 / 0)
Kreft	1 (0 / 1)	1 (0 / 1)	0 (0 / 0)
<b>Totalt</b>	<b>86 (32 / 54)</b>	<b>52 (19 / 33)</b>	<b>21 (9 / 12)</b>

Ved analyse av prøvene og screening av HPV, ble det valgt å ta utgangspunkt i de 7 HR HPV-typer som inngår i den nivalente vaksinen, og som forårsaker over 90 % av alle tilfeller av livmorhalskreft (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 og 58). Vaksinen inkluderer i tillegg to lavrisikotyper HPV 6 og 11, som forårsaker kondylomer. HPV 6 ble inkludert i screeningen, mens HPV 11 ble utelatt grunnet generell lav prevalens i befolkningen <sup>28,30</sup>, i tillegg til at kun to var positive i livmorhalsen med denne typen blant de 304 kvinnene i denne studien. I tillegg til disse, ble det screenet for to andre HPV-typer, HPV 73 som er en mulig høyrisikotype, og HPV 42, som er en høyprevalent lavrisikotype <sup>28</sup>.

Kvinnene diagnostisert med livmorhalskreft ble kun screenet for de HPV-typer som var påvist i livmorhalsen hos den aktuelle kvinnen. Det samme var gjeldende for kvinnene med ACIS, der HPV 16, 31 eller 45 ikke var påvist.

### 3.2 Optimalisering, validering og verifisering av ekstraksjons metoder og DNA utbytte fra serum

Det ble utarbeidet en ekstraksjonsprotokoll for å ekstrahere HPV-DNA fra serum før pasientprøvene ble behandlet. Til optimaliseringen av ekstraksjonsprotokollen ble det benyttet serum fra anonyme blodgivere som ble slått sammen og tilsatt kommersiell DNA kontroll fra ulike HPV-typer. HPV-DNA som ble benyttet til de innledende utprøvingene, besto av oppdyrkede humane celler transfektert med full-lengde episomalt DNA fra HPV 16, 18 eller 51, blandet med friske humane celler, og bevart i en bufret metanolløsning (SeraCare Life Sciences, Massachusetts, USA, katalognummer: QSH701). Hver av de tre HPV-typene, var tilgjengelig i separate kontroller. Ved tilsetning av HPV-DNA ble ulike volum tilsatt til forskjellige partier med serum, både samlet og separat, og det ble også laget fortynningsrekker for å undersøke metodenes sensitivitet ved lave konsentrasjoner. Da konsentrasjon av HPV-DNA ikke var oppgitt av produsentene for de ulike kontrollene, ble det benyttet bestemte volum som ble alikvotert til de ulike analysene, slik at samme spikede parti med serum ble benyttet i tilfeller der ulike metoder og protokoller er sammenlignet.

For optimalisering av ekstraksjonsprotokoll, ble hver ekstraksjonsbetingelse som skulle sammenlignes i ett oppsett, hovedsakelig satt opp i triplikater. Mengden DNA ekstrahert fra serum var for lav til å kunne måles, og real-time PCR (qPCR) ble derfor benyttet for å vurdere ekstraksjonsutbytte for de ulike protokollene. Alle prøvene ble satt opp i qPCR for humant beta-globin (HBB) (for påvisning av humant DNA), og/eller qPCR spesifikk for de spikede HPV-DNA kontrollene. HBB er et såkalt «housekeeping» gen som er til stede i alle celler og som også kan påvises fra cellefrie prøver slik som serum for kontroll av prøvenes egnethet. TaqMan Gene Expression mastermiks (Applied Biosystems™, Foster city, USA, katalognummer: 4369016) ble benyttet under qPCR-reaksjonene, som ble kjørt på Aria MX real-time PCR maskiner (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) med følgende program; 50 °C i 2 minutter, 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 50 sykluser bestående av denaturering ved 95 °C i 15 sekunder, og hybridisering ved 60 °C i 1 minutt. 25 µl reaksjonsmiks ble benyttet. Reaksjonsmiksen bestod av 12,5 µl TaqMan Gene Expression mastermiks, 0,30 µM forward og revers primer, 0,20 µM probe, 5µl DNA og 7,1 µl nukleasefritt vann.



Der det var mulig, ble statistiske analyser beregnet på Ct-verdier fra resultatene fra qPCR, med tosidig T-test, enveis ANOVA, eller toveis ANOVA, avhengig av oppsett, ved hjelp av Microsoft Excel og SPSS.

### **3.2.1 Optimalisering av ekstraksjon**

#### **3.2.1.1 Optimalisering fra maksimalt 500 µl serum**

Innledende utprøvinger ble utført med ekstraksjon fra maksimalt 500 µl serum, da prøvematerialet var begrenset i studien, og det samtidig var ønsket å ivareta eventuelle rester av serumet til andre fremtidige studier.

##### **3.2.1.1.1 Ekstraksjonsprotokoller med NucliSENS easyMAG**

På grunnlag av semi-automatisk protokoll, kapasitet per ekstraksjon (24 prøver) og prøvevolum (mulighet for å ekstrahere fra opptil 1 ml prøve) ble nukleinsyre ekstraksjon med NucliSENS easyMAG fra BioMérieux (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Frankrike) valgt som utgangspunkt under optimalisering av ekstraksjon. Det finnes 3 aktuelle protokoller for ekstraksjon fra serum på easyMAG (Generic 2.0.1, Specific A 1.0.2, og Specific B 2.0.1). Felles for alle protokollene er ett on-board lyseringstrinn i 2 ml lyseringsbuffer som består av det kaotropiske saltet guanidinthiocyanat, tilsetning av paramagnetiske silikakuler som binder nukleinsyrer ved kaotropiske betingelser, ulike vasketrinn ved hjelp av to ulike vaskebuffer og eluering av nukleinsyre fra silika i elueringsbuffer <sup>75</sup>. Under ekstraksjon ble det utført noen manuelle trinn som; pipettering av prøvematerialet over til ekstraksjonskassetene, tilsetning av silika og avpipettering av eluatene over til oppbevaringsrør.

Følgende betingelser ble sammenlignet; for Generic ble effekt av elueringvolum og forbehandling av serum med proteinase K løsning undersøkt, mens for de spesifikke protokollene ble effekt av ulike mengder silika undersøkt.

### 3.2.1.1.1.1 Effekt av forbehandling av serum og elueringsvolum for ekstraksjon med Generic 2.0.1 protokoll fra easyMAG

Generic er den grunnleggende easyMAG protokollen, som omfatter fem vasketrinn. Protokollen har mulighet for fleksibelt elueringsvolum, mellom 25 µl og 110 µl, der elueringen utføres ved 60 °C i 5 minutter. Ved bruk av denne protokollen skal 50 µl silika benyttes. Protokollen er beregnet for prøvemateriale med en lav konsentrasjon av nukleinsyrer, hvor det anbefales å benytte et høyt prøvevolum, et lavere silikavolum, og et lite elueringsvolum for å oppnå best mulig resultat <sup>75</sup>.

For ekstraksjon av serumprøver med easyMAG er det utarbeidet en pre-ekstraksjonsprotokoll der prøvene blir forbehandlet med en proteinase K-løsning, som består av 1 mg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, katalognummer: L3771), 0,5 % SDS (Sigma-Aldrich, katalognummer: P2308) og 20 mM Tris-HCl med pH 8 (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen, katalognummer: 15568025).

Effekt av denne forbehandlingen ble undersøkt samtidig med effekt av elueringsvolum. 500 µl proteinase K buffer ble satt til 500 µl serum tilsatt HPV 16 DNA. Miksen ble inkubert i 15 minutter ved 55 °C og blandet hvert 5 minutt. Prøvene ble deretter satt til ekstraksjon på instrumentet, og ekstraksjonsutbytte ble sammenlignet med ekstraksjon av 500 µl serum uten forbehandling. Elueringsvolumene ble satt til 25 og 60 µl for begge betingelser (Generic med forbehandling (heretter omtalt Generic M) og Generic uten forbehandling (heretter omtalt Generic U)).

Effekt av å fortynne eluatet 1:2 fra ekstraksjon i 25 µl ble sammenlignet med eluering i 50 µl. Dette ble undersøkt for å avgjøre om det var best å eluere i lavt volum og fortynne i etterkant, dersom det var behov for mer prøve, eller om det var best å eluere i høyere volum med en gang.

### 3.2.1.1.1.2 Sammenligning av ulike protokoller på easyMAG

Ekstraksjonsprotokollen Specific A er utviklet for ekstraksjon av prøver med mange mulige inhibitorer, slikt som avføring og urin. Denne protokollen benytter også 5 vasketrinn, men til forskjell fra Generic 2.0.1, utføres eluering ved 70 °C i 10 minutter og elueringsvolum kan kun settes til enten 70 eller 110 µl <sup>75</sup>.

Ekstraksjonsprotokollen Specific B er utviklet for ekstraksjon av DNA rike prøver, slik som fullblod. Denne protokollen benytter 11 vaskesteg i renseprosessen, og som ved bruk av Specific A, utføres eluering ved 70 °C i 10 minutter. Det er fleksibelt elueringsvolum mellom 40 og 110 µl med denne protokollen <sup>75</sup>.

For både Specific A og Specific B protokollene kan det tilsettes silikamengder mellom 50 og 140 µl <sup>75</sup>.

500µl serum, tilsatt HPV 16 DNA, ble ekstrahert med Specific A og Specific B i duplikater, tilsatt 50 og 140µl silika. De ulike protokollene ble sammenlignet med Generic M. Elueringsvolumet for Generic M og Specific B ble satt til 60 µl, og 70 µl ble benyttet for Specific A.

### 3.2.1.1.1.3 Sammenligning av EasyMAG ekstraksjon med andre ekstraksjonsmetoder

Generic M ble sammenlignet med en full-automatisk ekstraksjonsmetode og to manuelle ekstraksjonskit, alle fra Qiagen. For den full-automatiske EZ1 Advanced XL metoden, ble Virus Mini Kit v2.0 og protokollkort EZ1 Advanced XL Virus Card v2.0 (heretter omtalt som EZ-Virus) benyttet (Qiagen, Hilden, Tyskland, katalognummer: 955134). De manuelle kittene som ble tatt i bruk var QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (heretter omtalt som Circulating) (Qiagen, katalognummer: 55114) og QIAamp DNA Blood Mini Kit (heretter omtalt som DNA Blood) (Qiagen, katalognummer: 51104). Ekstraksjon ble utført på serum tilsatt HPV 18, der Generic M først ble sammenlignet med EZ-Virus og Circulating. DNA Blood ble inkludert ved undersøkelse av metodenes sensitivitet ved ekstraksjon av fortynningsrekke av HPV 18 i serum (1:100, 1:500, 1:2500, og 1:12500). Ekstraksjon med Generic M ble utført på 500 µl serum, eluert i 50 µl ved de første

forsøkene, mens 40 µl elueringsvolum ble benyttet ved ekstraksjon av fortynningsrekken.

EZ-virus, som easyMAG, baserer seg på ekstraksjon med paramagnetiske silikapartikler, der protokollen er beregnet for rensing av virale nukleinsyrer fra et vidt spekter av prøvemateriell <sup>76</sup>. Ekstraksjon ble utført med input volum på 400 µl (maksimalt mulig volum) og elueringsvolum på 60 µl (minimums elueringsvolum). Prosedyren ble utført både med og uten forbehandling av serum for å sammenligne hva som ga best resultat. Ved forbehandling ble en modifisert prosedyre for ekstraksjon fra fullblod benyttet, der 300 µl serum ble tilsatt til 100 µl ATL buffer, før prøven ble plassert i EZ1-ekstraktoren.

Begge de manuelle kittene er basert på rensing av nukleinsyrer ved hjelp av en silikamembran, i en mini spinn kolonne, som binder nukleinsyrer ved tilstedeværelse av kaotropiske salter i løsningen. Prinsippet er likt for begge kittene, ved at det tilsettes en løsning med kaotropiske salter til serumprøvene, før de settes på mini spinn kolonner, og sentrifugeres. De membranbundne nukleinsyrene vaskes i to omganger med etanolholdige løsninger, og elueres i sine respektive elueringsløsninger ved siste sentrifugering <sup>77,78</sup>.

Circulating er utviklet for rensing og ekstraksjon av frie, sirkulerende nukleinsyrer fra cellefrie kroppsvæsker, der kolonnene er tilpasset til å binde fragmenter så korte som 20 baser. Kittets protokoll for ekstraksjon fra serum og plasma ble fulgt. Protokollen er beregnet for ekstraksjon av sirkulerende nukleinsyrer fra 1, 2 eller 3 ml ved bruk av vakuum <sup>78</sup>, men ved dette forsøket ble 500 µl benyttet i kombinasjon med sentrifugering.

DNA Blood er beregnet for rensing og ekstraksjon av DNA fra alle blodfraksjoner (herunder plasma og serum). Spinnprotokoll for DNA rensing fra blod og kroppsvæsker ble benyttet <sup>77</sup>. Også her ble 500 µl serum tilsatt ved samtlige forsøk.

Ved bruk av begge de manuelle kittene ble reagensenes volum tilpasset etter tilsetning av 500 µl serum. Det ble gjennomført en forlenget inkubering på 5 minutter av kolonnene etter tilsetning av elueringsbuffer, i forhold til standard protokoll. Sentrifugering ble deretter gjennomført i to runder med reapplisering av eluatet fra sentrifugeringsrunde 1 i runde 2. Begge tilpasninger ble gjort for å øke utbyttet av DNA i

eluert. Eluering ble utført i 50 µl med begge metoder, og ekstraksjon ble ellers utført etter produsentens anvisning.

### 3.2.1.1.2 Optimalisering fra 1000 µl serum

For å oppnå en lavere deteksjonsgrense ble ytterligere forsøk utført med et økt prøvevolum. Ekstraksjon med Generic M, fra 500 µl serum, eluert i 40µl, ble sammenlignet med ekstraksjon fra 1000 µl serum (maksimalt volum) med Specific B, med et silikavolum på 140 µl og et elueringsvolum på 100 µl. Forsøket ble utført på serum uten tilsatt HPV.

Ekstraksjon fra 1000 µl serum med og uten tilsatt HPV 18 DNA, ble deretter utført med både Generic U og Specific B. Ekstraksjon med Generic U ble utført uten forbehandling med proteinase K, da forbehandling innebærer en 1:1 fortykning av primærprøven, og dermed kun tillater ekstraksjon fra maksimum 500 µl serum. Begge ekstraksjonsprotokoller ble sammenlignet med eluering i 60 og 100 µl.

Resultatene fra optimaliseringen førte til valg av ekstraksjonsprotokoll som ble benyttet ved ekstraksjon av prøvematerialet fra studiepopulasjonen. Gjeldende protokoll kommer frem av resultatene i punkt 4.1, der endelig protokoll er beskrevet i punkt 4.1.4.

For å sikre at ekstraksjon var vellykket i alle serumprøvene fra studiepopulasjonen (utbytte og fjerning av inhibitorer), ble det tilsatt en intern positiv kontroll (IPC) til hver prøve etter lyseringstrinnet under ekstraksjon. IPC ble ikke benyttet ved optimalisering av ekstraksjonsmetoden. TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, by, land, katalognummer 4308323) er internkontrollen som ble benyttet i studien. Ved analyse av pasientprøvene ble 0,5 µl IPC tilsatt prøvene, og en dupleks qPCR med HBB og TaqMan® Exogenous Internal Positive Control probeassay ble satt opp i en 20µl reaksjon. Reaksjonen bestod av 10 µl TaqMan Gene Expression mastermiks, 0,30 µM av hver HBB primer, 0,20 µM HBB probe, 2 µl TaqMan® Exogenous Internal Positive Control probeassay, 2 µl DNA og 5,7 µl nukleasefritt vann. Ved alle oppsett av qPCR ble det også inkludert en templatfri kontroll av 2 µl nukleasefritt vann og en reaksjon av 0,4 µl IPC.

### **3.2.1.1.3 Validering av DNA-utbyttet ved langtidslagring av serum og undersøkelse av mulige inhibitorer i serumprøvene fra studien**

Serumprøvene fra kvinnene i studien har vært lagret ved – 80 °C siden prøvetakning i 2010 – 2012. For å undersøke om langvarig lagring av prøvematerialet kunne ha noen betydning for DNA-kvaliteten ved analysering, ble DNA-kvaliteten sammenlignet mellom langtidslagrede og nye serumprøver fra laboratoriet. HBB og IPC qPCR ble satt opp for serum-ekstrakter fra 16 anonyme serumprøver fra 2012, og 16 anonyme serumprøver fra 2017. Samtlige prøver var lagret ved -20 °C siden prøvetakning.

Tilstedeværelse av inhibitorer i serumprøvene fra kvinnene i studien ble også undersøkt. Seks serumprøver fra studien som tidligere var testet negative for HPV ble benyttet. Serumprøvene og triplikater av TE-buffer ble tilsatt HPV 16 plasmid (klonet kontroll beskrevet i punkt 3.4) før ekstraksjon, for å gi en sluttkonsentrasjon på 100 kopier/µl eluat ved 100 % effektiv ekstraksjon. Ekstraksjonsutbyttet fra serumprøvene ble sammenlignet med ekstraksjon fra TE-buffer for å avdekke mulige inhibitorer i eldre prøver.

Under valideringsforsøkene ble prøvene ekstrahert med samme protokoll som serumprøvene fra kvinnene i studien (se punkt 4.1.4). qPCR ble satt opp for HBB og IPC ved validering av langtidslagring (se punkt 3.2.1.1.2). Ved undersøkelse av inhibitorer ble qPCR for HPV satt opp som beskrevet i punkt 3.2.

## 3.3 Primer- og probeassay

### 3.3.1 Primer- og probedesign for HPV 42 og HPV 73

For å unngå konkurranseforhold under påvisningen av HPV-DNA i serum ble det besluttet å benytte spesifikke primer- og probeassay for hver HPV-type som skulle analyseres i denne studien. Tidligere publiserte primere og prober ble benyttet for alle HPV-typer <sup>79</sup> med unntak av HPV 42 og 73, der det ikke ble funnet publiserte primere og prober i E6/E7 området av genomet. I protokollen fra Lindh et al. er alle assayene designet i E6/E7 delen av genomet. Ved å legge assayene i E6/E7, unngås falske negative prøver som følge av genomtap ved integrering under transformasjon, ettersom E6/E7 regionen gjenstår uansett hvilken fase (episomalt eller integrert DNA) viruset er i <sup>17</sup>. Det ble derfor valgt å designe assay i denne genomregionen også for HPV 42 og 73.

Referansesekvens for hver HPV-type ble hentet fra det internasjonale HPV-referanse senteret på Karolinska instituttet (Stokholm, Sverige) <sup>80</sup> før E6/E7 regionen ble valgt ut. Sekvensen ble lastet opp i NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <sup>81</sup> der det ble foretatt et søk i nukleotiddatabasen, etter lignende sekvenser.

Ved design av primere og prober var det nødvendig å benytte et område som er godt konservert mellom ulike varianter av samme HPV-type, men som samtidig varierer fra andre genotyper. E6 og E7 fra referansesekvensene ble sammenstilt med treffsekvenser av samme genotype fra nukleotiddatabasen ved hjelp av Clustal Omega, EBI (The European Bioinformatics Institute) <sup>82</sup>, Referansesekvensene ble også sammenstilt mot andre nært beslektede HPV-typer, funnet ved databasesøk, og i henhold til det fylogenetiske treet til HPV *alphavirus* <sup>21</sup>. Primere og prober ble utarbeidet fra de mest konservative områdene i E6 eller E7, innad for samme genotype, som samtidig varierte fra andre genotyper.

De utvalgte regionene ble lastet opp i Primer3 v.0.4.0 <sup>83,84</sup> der det ble tatt utgangspunkt i standardinnstillinger, med noen modifikasjoner rundt smeltepunkts temperatur (T<sub>m</sub>), primer-/probelengde og produktlengde <sup>85</sup>. Ved design av primere og prober ble det valgt ut områder som i størst mulig grad tilfredstilte kravene for optimal primer og probedesign, og som samtidig ga produkter under 100 basepar for å sikre effektiv amplifisering.

Ved funn av aktuelle primere og prober ble disse igjen sjekket opp mot nukleotiddatabasen, for å kontrollere at det var overenstemmelse med ønsket HPV-type, og ikke med andre genotyper. Primere og probe for HPV 42 og 73 ble designet i henholdsvis E6 og i E7 regionen, og er vist i tabell 4.

**Tabell 4: Designede primere og probe for HPV 42 og 73.** Assayene ble innledningsvis validert med FAM merkede prober, men ved screening av prøvene i studien ble HEX merkede prober benyttet. PCR produktets størrelse (Prd.str) er vist som antall basepar (bp).

Mål	Oligo	Sekvens	Prd.str
HPV 42	F	5' -TGTAAGGAATTTGGGCTGACAT-3'	74 bp
	R	5' -CTCTGCGCCTGTTAAGTGCT-3'	
	P	5' -FAM/HEX-TTACAGATTTCTGCATTTGGTGCAA-BBQ-3'	
HPV 73	F	5' -GACAGACAAGCTGAACGAGAGTGTT-3'	92 bp
	R	5' -GCTTTGTTGCTTTCAATGGCA-3'	
	P	5' -FAM/HEX-TGCACGAAGTGTCAGTGCACAGTATGCC-BBQ-3'	

F = Forward primer, R = Reversprimer, P = probe.

Designede primere og prober ble testet ved å sette opp qPCR med kjente positive prøver fra andre prosjekter, screenet med Anyplex™ II 28HPV detection kit. Hvert assay ble satt opp for flere positive prøver for den aktuelle HPV-typen, samt positive prøver for andre nært beslektede typer. PCR-produktene ble deretter satt opp i QIAxcel Advanced System (Qiagen), et høyoppløselig kapillær elektroforese system <sup>86</sup>, for å kontrollere at amplifiseringen var vellykket. Ved samtlige oppsett på QIAxcel Advanced er kittet QIAxcel DNA Screening (Qiagen, katalognummer 929004) benyttet, i kombinasjon med alignmentmarkør fra 15 bp til 5 kbp (Qiagen, katalognummer 929524). Metoden som ble benyttet var AM320 med eksport profilen default DNA V2 screening. Prosessen er utført i henhold til QIAxcel Advances brukermanual (03/2016, V1.5).



### 3.3.2 Primere og prober benyttet i studien

Designede og publiserte primere og prober benyttet i denne studien ble bestilt fra Tibmolbiol. Probene består av en fluorescerende reporter farge i 5' ende, samt en quencher i 3' ende som tar opp det fluorescerende signalet når de begge er bundet til proben <sup>87</sup>. Samtlige HPV-prober som er benyttet under optimalisering av ekstraksjon, kloning, validering av deteksjonsgrenser og ddPCR er merket med den fluorescerende reporter fargen FAM og «dark quencheren» BBQ. For HPV 6, 18, 42, 45 og 73 ble prober merket med den fluorescerende reporterfargen HEX benyttet i qPCR screening av serumprøvene i studiepopulasjonen for å kunne sette opp dupleksreaksjoner med FAM merkede typer.

Tidligere publiserte primere og probe for HBB ble også benyttet i denne studien <sup>88</sup>. Proben for HBB var merket med den fluorescerende reporterfargen FAM, og dark quencheren TAMRA.

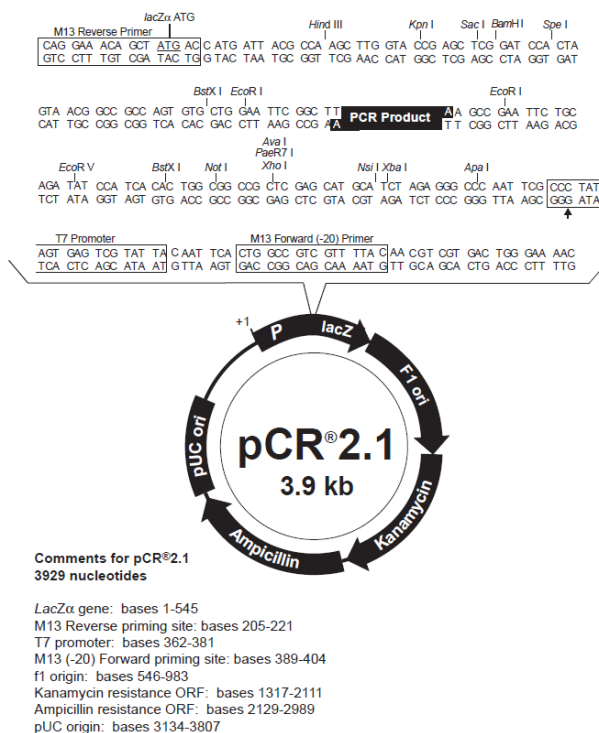
Alle benyttede primere og prober er vist i tabell V1 i vedlegg.

### 3.4 Tillaging av HPV-kontroller ved kloning

Deteksjonsgrensen for de ulike HPV-typene, som skulle benyttes under screeningen, ble bestemt på HPV-DNA kontroller laget i kloningsforsøk.

TA-kloning er en enkel og effektiv metode for kloning av PCR-produkter <sup>89</sup>. Kloningen ble utført på amplikoner laget med Taq polymerase som templat-uavhengig legger til en enkelt deoksyadenosine (A) på den 3' enden av PCR-produktet. Produktet kan deretter liggeres inn i en lineærisert vektor som har et enkelt 3' deoksytymidin (T) overheng. Dette gjør det mulig for PCR-insertet å ligere effektivt med vektoren.

Kloningen ble gjennomført med et TA-kloning kitt med pCR<sup>®</sup>2.1 vektor og One Shot<sup>®</sup> INVαF' kjemisk kompetente *Escherichia coli* celler (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, katalognummer K200001). pCR<sup>®</sup>2.1 vektoren med tilhørende kloningssete er vist i figur 9.



**Figur 9: Plasmidvektor, pCR<sup>®</sup>2.1 med tilhørende kloningssete.** Vektoren består av 3929 bp, og er bærer av både Ampicillin- og Kanamycinresistente gener. Vektoren har et 3'-T overheng for ligering av PCR-produkt, og innehar også bindingssteder for M13 primerpar og en rekke restriksjonsenzymmer. Plasmidet er også i besittelse av et LacZ gen, som vil kløyves ved ligering av PCR-produktet inn i vektoren. Kløyving av LacZ genet fører til at X-gal ikke lenger kan spaltes, og dyrkning på skål med X-gal, vil gjøre det mulig å skille ut cellene som har tatt til seg plasmidet med det ligerte PCR-produktet. Illustrasjon fra Original TA cloning kit user guide <sup>90</sup>.

### 3.4.1 Tillaging av PCR-produkt

Det ble benyttet anonyme livmorhals- og urinprøver som tidligere har blitt påvist som sterkt positive med Anyplex™ II HPV28 detection kittet for de ulike HPV-typer som skulle klones. PCR-produkter for hver HPV-type ble syntetisert ved hjelp av spesifikke primere og DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, katalognummer EP702). De kliniske prøvene benyttet for amplifisering av PCR produkter til kloning var fortrinnsvis kun positive for den aktuelle HPV-typen. PCR ble utført i 50 µl reaksjoner bestående av 5 µl 10x DreamTaq buffer, 0,2 mM av hver dNTP, 1 µM av hver primer, 0,25 µl DreamTaq DNA polymerase, (1,25 units), og 2 µl DNA, samt nukleasefritt vann til totalvolumet. Det hele ble satt opp på SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) med et innledende denatureringssteg på 95 °C i 2 minutter, etterfulgt av 30 sykluser av 95 °C i 30 sekunder, 60 °C i 30 sekunder og 72 °C i 1 minutt, avsluttet med et forlengelsessteg på 72 °C i 10 minutter.

PCR-programmet ble tilpasset hver enkelt HPV-type, og ved oppsett av HPV 6, 16, 33, 42, 45, 52 og 73 ble 35 sykluser, heller enn anbefalte 30 sykluser, benyttet for å oppnå tilstrekkelig mengder PCR-produkt. For å undersøke at PCR-produktet hadde riktig størrelse, og at kun et bånd var tilstede, ble produktene undersøkt med QIAxcel Advanced, før liggering inn i pCR®2.1 ble satt i gang.

### 3.4.2 Kloning inn i pCR®2.1

For optimal liggeringseffektivitet er det anbefalt bruk av ferskt PCR-produkt, dette fordi det single 3' overhengen på PCR-produktet vil degraderes over tid. Kloning inn i pCR®2.1 vektor ble utført fortløpende etter at PCR-reaksjonen var fullført. En 10 µl liggeringsreaksjon ble laget av 2 µl 5X ExpressLink™T4 DNA Ligase Buffer, 2 µl pCR®2.1vektor (25 ng/µl), 1 µl ExpressLink™T4 DNA Ligase (5 units), 2,5 µl PCR-produkt og 2,5 µl sterilt vann. Det er viktig med forsiktig behandling av pCR®2.1 vektoren, da tap av 3' T-overheng vil føre til blunt-end selv-liggering av vektoren, og dermed også en reduksjon i liggeringseffektiviteten. Liggeringsreaksjonen ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur før de ble sentrifugert og plassert på is.

### 3.4.3 One Shot® kjemisk transformering

pCR®2.1 vektoren, med det ligerte insertet, ble transformert inni kjemisk kompetente *E. coli* One Shot celler på følgende måte; 2 µl av hver ligeringsreaksjon ble tilsatt til cellene og inkubert i 30 minutter på is. Cellene ble deretter gitt ett varmesjokk i 30 sekunder ved 42 °C, før de igjen ble plassert på is. 250 µl romtemperert S.O.C medium ble tilsatt og cellene ble inkubert ved 37 °C ved risting ved 300rpm i 1 time.

De transformerte cellene ble strøket ut på støpte LB-skåler inneholdende 50 µg/ml X-gal og 100 µg/ml ampicillin. (imMedia™, ThermoFisher, katalognummer Q60102). Hver av transformasjonsmiksene ble strøket ut på to skåler, 50 µl på en skål, og det resterende på den andre. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 18 timer. Ampicillinresistens hos vektoren gjør det mulig for de transformerte cellene å vokse på skålene tilsatt ampicillin, samtidig som vekst av andre bakterier hindres.

### 3.4.4 Analysering av positive kloner

Etter inkubering ble skålene overført til 4 °C i 2 – 3 timer for bedre fargeutvikling. Transformerte celler ble gjenkjent ved en hvit farge på koloniene. Ved ligering av PCR-produktet inn i vektoren kløyves LacZ genot som koder for enzymet beta-galaktosidase. Enzymet har evnen til å spalte X-gal, som er tilsatt i mediet, noe som medfører en blå farge på kolonien. Ved opptak av vektoren med innsatt PCR-produkt vil bakterien dermed ikke kunne produsere enzymet, og kolonien vil heller ikke utvikle den blå fargen<sup>90</sup>.

Inntil ti kolonier ble plukket fra hver av skålene og dyrket videre i hver sine rør med 5 ml LB-medium inneholdende 100 µg/ml ampicillin (imMedia™, ThermoFisher, katalognummer Q60020). Rørene ble inkubert i 18 timer ved 37 °C.

### 3.4.5 Isolering av plasmid

De oppdyrkede cellene ble høstet ved å sentrifugere 3 ml LB-medium ved 5000 rpm i 5 minutter, før alt medium ble fjernet. For isolering av de klonede plasmidene ble det benyttet et Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, katalognummer K210011) med PureLink® spin kolonner bestående av en silikamembran som selektivt binder plasmid DNA. Prosessen er utført i henhold til kittets protokoll, og eluering ble utført i 75 µl TE-buffer.

### 3.4.6 Verifisering av insert ved Sanger sekvensering

De rensede plasmidene ble undersøkt på QIAxcel Advanced for å bekrefte tilstedeværelse av DNA. En PCR reaksjon ble utført på mellom tre og ti kloner for hver HPV-type. I denne PCRen ble det benyttet Amplitaq Gold® 360 mastermiks (Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, katalognummer 4398881), og M13 primere (M13F: 5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-G-3', M13R: 5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3', Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Katalognummer N52002/N53002). Følgende reaksjon ble satt opp: 10 µl mastermiks, 0,5 µM av hver primer, 2 µl DNA, og nukleasefritt vann til et totalvolum på 20 µl. PCR-reaksjonen ble satt opp på T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) med et innledende aktiveringssteg på 95 °C i 10 minutter, før det ble utført 30 sykluser av 95 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder, og 72 °C i et minutt. Et endelig polymeriseringssteg ble avslutningsvis utført ved 72 °C i 7 minutter.

PCR-produktene ble kontrollert med QIAxcel Advanced, prøvene med riktig båndstørrelse ble rensert ved bruk av CleanSweep PCR™ purification (Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, katalognummer A29895), slik at overflødige primere ble hydrolysert og resterende dNTPs ble defosforylert. 2 µl CleanSweep ble tilsatt til 5 µl PCR-produkt, og kjørt på følgende PCR-program: 37 °C i 15 minutter, etterfulgt av 80 °C i 15 minutter.

For å verifisere at riktig produkt var satt inn, ble de rensede PCR-produktene sekvensert med BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, katalognummer 4337455). Sekvenserings-PCR med totalvolum på 10 µl

bestående av 0,5 µl BigDye® Terminator v3.1 ready reaksjonsmiks, 1,75 µl 5x BigDye® sekvenseringsbuffer, 0,5 µM M13 forward eller revers primer, 2 µl DNA og 5,25 µl sterilt vann ble satt opp på T100™ Thermal Cycler med følgende PCR-program; 95 °C i 1 minutt, etterfulgt av 25 sykluser av 95 °C i 10 sekunder, 50 °C i 5 sekunder, og 60 °C i 3 minutter.

Rester av BigDye® terminatorer og salter ble fjernet med BigDye XTerminator® Purification kit (Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, katalognummer 437687), der 45 µl SAM™ løsning og 10 µl BigDye® XTerminator™ løsning ble tilsatt til hver av prøvene fra PCR-reaksjonen, før platen ble forseglet og satt til resting i 30 minutter ved 3000 rpm. Platen ble sentrifugert ved 1000 xg i 2 minutter, for deretter å bli sekvensert på 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, katalognummer 4405673) med protokollen BDxStdseq50\_POP7\_Z. Sekvensene ble analysert med BioEdit Sequence Alignment Editor <sup>91</sup>. For hver HPV-type ble en klon som var bekreftet med sekvensering valgt videre for tillaging av positive kontroller til HPV-spesifikke PCR'er.

### 3.4.7 Konsentrasjonsmåling med Qubit® 3.0 Fluorometer

DNA-konsentrasjonen for hvert plasmid-DNA ble målt ved hjelp av Qubit 3.0 fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), som i kombinasjon med ulike kitt, benytter fluorescerende farger som er spesifikke for målet og kun vil avgi signal når det er bundet <sup>92</sup>. Qubit ds HS (High Sensitivity) kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, katalognummer Q32851), spesifikt for deteksjon av dobbeltrådig DNA i prøver med konsentrasjoner mellom 10 pg/µl og 100 ng/µl, ble benyttet i dette forsøket <sup>93</sup>. Analysen ble utført etter oppgitt protokoll med små modifikasjoner; 10 µl av hver prøve ble benyttet, og avlesningen ble utført etter 2 minutters inkubasjon. Alle prøvene ble igjen målt etter 1 time, som kontroll.

Som en ekstra kontroll, ble det foretatt en kutting av plasmidene ved hjelp av restriksjonsenzymet BamHI (Thermo Fisher Scientific, katalognummer ER0051) for å utelukke for lave målinger grunnet eventuelt supercoilet plasmid. BamHI gjenkjenner G<sup>^</sup>GATCC seter, et kuttsete som er tilstede hos plasmidvektoren som er benyttet <sup>94</sup>. Før kutting, ble det undersøkt at kuttsetet ikke var tilstede hos noen av insertene, slik at

alle plasmidene ble kuttet kun en gang. Det ble laget en miks av 2 µl 10x BamHI buffer, 1 µl BamHI restriksjonsenzym og 16 µl nukleasefritt vann, før 5 µl DNA ble tilsatt. Restriksjonskuttingen ble utført ved 37 °C i 2 timer før det ble foretatt en ny konsentrasjonsmåling.

### 3.4.8 Tillaging av fortynningsrekker

Avogadros konstant ( $6,02214199 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) og molvekt for dobbeltrådig DNA (660 g/mol) ble benyttet for å estimere antall kopier per mikroliter <sup>95</sup>. Beregningene ble gjort på følgende måte for hver HPV-type, her vist for HPV 16 som ble målt til 6,1 ng/µl.

Beregning av molekylvekt i gram per mol for plasmid med insert:

pCR 2.1 plasmidvektor: 3929 bp

HPV 16 insert: 113 bp

$3929 \text{ bp} + 113 \text{ bp} = \underline{4042 \text{ bp}}$

$4042 * 660 \text{ g/mol} = \underline{2667720 \text{ g/mol}}$

Beregning av antall kopier per mikroliter løsning:

$$\frac{(6,10 \text{ ng / } \mu\text{l}) * (6,022 * 10^{23} \text{ kopier/mol})}{(10^9 \text{ ng / g}) * (2667720 \text{ g / mol})} = \underline{14 * 10^8 \text{ kopier / } \mu\text{l}}$$

Etter at antall kopier per mikroliter av plasmid med HPV-insert som var tilstede i løsningen var beregnet, ble det laget en ti ganger fortynningsrekke fra  $10^6$  til  $10^{-1}$  kopier per mikroliter. Fortynningsseriene ble laget med 1 x TE-buffer bestående av 10 mM Tris-HCl med pH 8 (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen, katalognummer: 15568025), 1 mM EDTA med pH 8 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, katalognummer: 15575020), samt nukleasefritt vann. Disse fortynningsseriene ble benyttet til å bestemme deteksjonsgrense for hver PCR-assay, både qPCR og ddPCR.

## 3.5 Etablering av protokoll for qPCR og ddPCR

### 3.5.1 Optimalisering av qPCR-protokoll

qPCR er en hurtig og meget sensitiv metode for påvisning av DNA ved bruk av spesifikke primere og probe. Metoden benyttes i mikrobiologisk diagnostikk til blant annet påvisning av de fleste virus. AriaMX real-time PCR-system ble benyttet ved samtlige kjøring der spesifikke primere og probe ble benyttet.

#### 3.5.1.1 Valg av mastermiks

For å oppnå best mulig følsomhet ved påvisning av HPV ble to typer mastermiks sammenlignet. De to typene var TaqMan Gene Expression mastermiks og QuantiNova Pathogen mastermiks (Qiagen, Katalognummer 208652). qPCR ble satt opp for begge mikser med fortynningsrekker av HPV 18 og 51 i henhold til miksenes anbefaling (beskrevet i punkt 3.2). Oppsett av reaksjoner med 2x TaqMan Gene Expression mastermiks ble utført som beskrevet i punkt 3.2. Reaksjonsmiksen med QuantiNova Pathogen mastermiks utgjorde et totalvolum på 20 µl per reaksjon, og var bestående av 5 µl 4x pathogen mastermiks, 0,1 µl QN ROX reference dye, 0,8 µM av hver primer, 0,25 µM probe, 5 µl DNA og 9,16 µl nukleasefritt vann. Reaksjonen ble satt opp med følgende program: 50 °C i 10 minutter, 95 °C i 2 minutter, 50 sykluser bestående av 95 °C i 5 sekunder og 60 °C i 30 sekunder.

#### 3.5.1.2 Primer og probe konsentrasjon

For Gene Expression mastermiksen ble det videre gjort forsøk for å se om det kunne oppnås høyere sensitivitet ved å øke konsentrasjonen på primere og probe. Konsentrasjoner på mellom 0,30 µM – 0,90 µM for primere og 0,20 µM – 0,25 µM for probene ble benyttet. Forsøket ble utført på eluater fra serum tilsatt HPV-kontroll og anonyme langtidslagrede DNA-prøver fra laboratoriet (ekstrahert fra urin), som tidligere var vist positive for HPV.



### 3.5.1.3 Eluat-mengde i qPCR

For å undersøke om det var mulig å oppnå en like sensitiv deteksjon med et lavere volum av eluat ble to ulike mengder eluat/qPCR-reaksjonsmiks evaluert (2 µl eluat i 18 µl reaksjonsmiks og 5 µl i 20 µl reaksjonsmiks). Forsøket ble utført på eluater av fortynningsrekke av HPV 18 og 51, med TaqMan Gene Expression mastermiks, i henhold til miksens anbefaling som beskrevet i punkt 3.2 for 25 µl reaksjon. For 20 µl reaksjoner ble reaksjonsmiks satt opp som beskrevet i punkt 3.2.1.1.2, der IPC probeassay ble erstattet med et økt volum av nukleasefritt vann.

### 3.5.1.4 Verifisering av deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen for hver HPV-type ble undersøkt med de klonede HPV-kontrollene. Det ble satt opp paralleller med 5 µl fra hver fortykning fra 1 000 000 kopier/µl til 0,1 kopi/µl. qPCR-reaksjonene ble utført med TaqMan Gene Expression mastermiks i 25 µl reaksjoner som beskrevet over (punkt 3.2). Ulike hybridiseringstemperaturer ble forsøkt for noen av HPV-typene, men alle typene oppnådde en deteksjonsgrense på 1 kopi/µl med standard betingelser.

### 3.5.1.5 Enkel, dupleks eller multipleks qPCR

For å kunne screene for så mange HPV-typer som mulig med tilgjengelig eluatmengde ble det undersøkt om assayene kunne duplekses. Ved oppsett av qPCR ble det valgt å duplekse typer som ikke var for nært beslektet med hverandre. Ettersom HPV-type 16, 31, 33, 52 og 58 alle tilhører alphavirus artsgsgruppe 9, ble disse fordelt i 5 ulike assay, og duplekset med en av de andre HPV-typene (6, 18, 42, 45 og 73). Probene til HPV-typene fra artsggruppe 9 var FAM merket i dupleks analysene, mens de resterende typer var HEX merket. Følgende dupleks reaksjoner ble satt opp; HPV 16 og 18, 31 og 45, 33 og 42, 52 og 73 samt 58 og 6. Deteksjon i dupleks ble sammenlignet med enkelt qPCR for hver type, der det ble satt opp triplikater av to ulike plasmidkonsentrasjoner ved nedre deteksjonsgrense (10 og 100 kopier/µl). 5 µl DNA ble benyttet til hver reaksjon som ble utført i 25 µl reaksjoner med TaqMan Gene Expression mastermiks som beskrevet i

punkt 3.2 Ved dupleks qPCR ble primere (0,30  $\mu$ M) og prober (0,20  $\mu$ M) for begge de aktuelle HPV-typerne tilsatt i reaksjonsmiksen, sammen med 12,5  $\mu$ l mastermiks og 6,7  $\mu$ l nukleasefritt vann.

For å begrense bruken av prøvematerialet og screene for mange HPV-typer fra et lavt volum av eluat ble det også forsøkt å benytte ett kommersielt multipleks kitt; Anyplex™II HPV28 deteksjon, som gjør det mulig å detektere totalt 28 HPV-typer i to separate PCR-reaksjoner, 19 HR (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82), og 9 LR (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70). Forsøket ble utført på fortynningsrekke av HPV 18 og 51 (1:100 – 1:12500) i henhold til kittets brukermanual (01/2015, V1.06), i kombinasjon med CFX96™ real-time PCR-system (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany). Resultatene ble sammenlignet med spesifikke TaqMan Gene Expression qPCR assay.

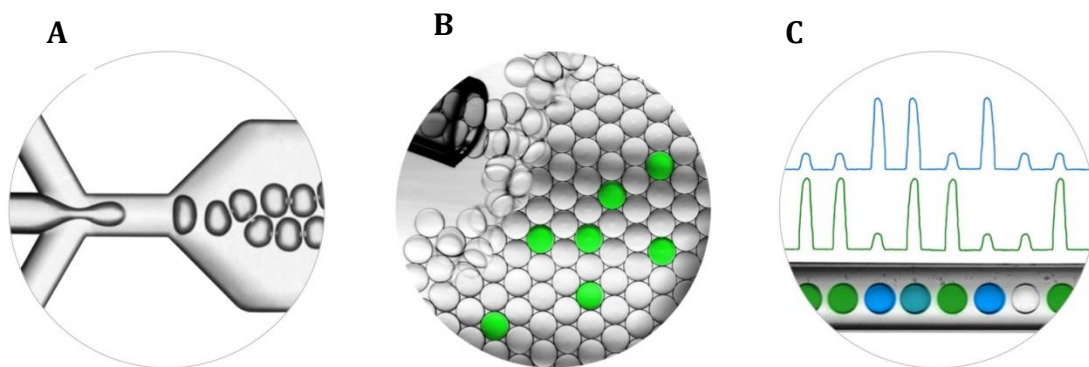
Betingelser for qPCR benyttet ved screening av prøvematerialet kommer frem på bakgrunn av resultatene vist i punkt 4.2 før endelig protokoll er vist i punkt 4.4.

Ved oppsett av qPCR til screening av prøvematerialet ble en templatfri kontroll (nukleasefritt vann) og en positiv kontroll satt opp for hver reaksjonsmiks i samtlige kjøring.

### 3.5.2 Droplet digital PCR-protokoll

Droplet digital PCR (ddPCR) er en digital PCR-metode basert på vann-olje emulsjon, der det genereres opptil 20 000 dråper i nanoliter størrelse fra hver prøve. Alle dråpene inneholder primere, probe, dNTP og enzym, men ikke alle vil inneholde DNA. Dersom det er mye DNA i prøven bør den fortynnes, slik at det finnes negative dråper, som benyttes i en Poisson-fordelingsformell til å bestemme den absolutte DNA konsentrasjonen i den originale prøven. Etter generering av dråpene utføres det en PCR-reaksjon av emulsjonen som fører til separate amplifiseringer i hver av dråpene der DNA er tilstede. Dråpene i prøven analyseres deretter enkeltvis gjennom et to-farge deteksjonssystem som avgjør hvorvidt de er positive eller negative <sup>96</sup> (figur 10).

To-farge deteksjonssystemet gjør det mulig å multiplekse ulike målsekvenser i samme prøve, men ved dette forsøket ble kun en reporter farge (FAM) benyttet. Det ble bestemt å undersøke prøvene mer målrettet med ddPCR, mot få utvalgte HPV-typer (16, 31, 45, 18, 33) som var påvist i livmorhalsen hos den aktuelle kvinnen, fremfor å screene alle prøver for alle typer slik det ble gjort med qPCR. I tillegg ble serumprøver fra kvinnene diagnostisert med ACIS og kreft undersøkt spesifikt for de typene de var positive for i livmorhalsen (HPV 16, 18, 31, 33, 45 og/eller 52).



**Figur 10: Droplet digital PCR-flyt.** (A) Basert på vann-olje emulsjon fordeles hver prøve til opptil 20 000 dråper. (B) Separate PCR-reaksjoner gjennomføres i hver enkelt dråpe. (C) Dråpene analyseres enkeltvis gjennom et to-farge deteksjonssystem, som avgjør om hver enkelt dråpe er positiv eller negativ. Illustrasjon fra splice-bio.com <sup>97</sup>.

Eventuelle positive funn gjort med qPCR ble også kvantitert ved bruk av ddPCR. Det foreligger visse begrensninger ved bruk av qPCR når det gjelder kvantitering, da metoden benytter indirekte kvantitering, og er avhengig av validerte standardkurver. ddPCR benytter direkte kvantitering, uten behov for standardkurve ved å bestemme fraksjonen av positive dråper i prøven. Denne metoden er i tillegg mer tolerant mot små endringer i PCR-effektiviteten, ettersom det er endepunkt produkt som avleses i hver dråpe på slutten av PCR-reaksjonen, fremfor stigningen underveis slik som er tilfelle ved qPCR<sup>98-100</sup>.

Deteksjonsgrense for hvert assay ble bestemt med oppsett av fortynningsrekke for de klonede HPV-kontrollene, der det ble satt opp triplikater av hver fortykning fra 10.000 kopier/ $\mu$ l, til 0,1 kopi/ $\mu$ l. Optimale positive kontroller til oppsett av prøvene ble samtidig plukket ut. 45 sykluser, fremfor 40, ble prøvd ut for å vurdere effekt på fluorescens intensitet. Ved kjøring av prøvene ble det for hvert oppsett inkludert duplikater med HPV-spesifikke negative kontroller, som besto av klonet HPV 51 DNA i 100 kopier/ $\mu$ l, samt templatfrie kontroller bestående av nukleasefritt vann. De negative kontrollene var avgjørende ved fastsettelsen av en terskelverdi mellom positive og negative dråper. Det ble også satt opp duplikater av positive kontroller i ulike konsentrasjoner.

Analysen ble utført med Bio-Rad's QX200 ddPCR-system (Bio-Rad). Det ble laget en separat reaksjonsmiks for hver HPV-type som skulle analyseres, der ddPCR-supermiks for prober (uten dUTP) (Bio-Rad, katalognummer 1863024) ble benyttet. Reaksjonsmiksen ble laget ut i fra 11  $\mu$ l 2x ddPCR-supermiks, 0,90  $\mu$ M av hver primer og 0,25  $\mu$ M probe, samt nukleasefritt vann til et totalvolum på 17  $\mu$ l. 5  $\mu$ l DNA ble benyttet. Prosessen med å generere dråper ble utført med QX200 dråpegenerator, og PCR ble utført med C100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), med PCR-program etter anbefaling for ddPCR-supermiks. Programmet var som følger: enzymaktivering ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 40 sykluser bestående av denaturering ved 94 °C i 30 sekunder og hybridisering ved 60 °C i 1 minutt. Avslutningsvis ble det gjennomført et enzymdeaktiveringssteg på 98 °C i 10 minutter. Hele prosessen ble gjennomført med en ramp rate på 2 °C per sekund. Platen ble overført til QX200 dråpeleser etter endt PCR.

Prøvene ble kjørt enkeltvis i en innledende screening. Mulig positive prøver bestående av dråper med lav fluorescens ble kjørt om igjen i duplikater. For at prøven skulle analyseres som positiv måtte begge paralleller være positive, eller minst en dråpe måtte ligge på samme fluorescensnivå som de positive kontrollene.

Resultatene ble analysert ved hjelp av QuantaSoft version 1.7.4 analysis software (Bio-Rad), samt ddpcRquant <sup>98</sup>. Sistnevnte er et program som benytter grunnlinje korreksjon og ekstremverdi teori for å sette terskelen mellom positive og negative dråper ved tilfeller der kun en fluorefor er benyttet. Kvantitering ble utført med QuantaSoft, der resultatene ble oppgitt i form av kopier per mikroliter i den originale prøven ved bruk av følgende formel <sup>101</sup>;

$$C = \frac{-\ln\left(\frac{N_{\text{neg}}}{N}\right)}{V_{\text{dråper}}}$$

C = Kopier per dråpe

N<sub>neg</sub> = Antall negative dråper

N = Totalt antall dråper

V<sub>dråpe</sub> = Volum i dråpene

## 4 Resultater

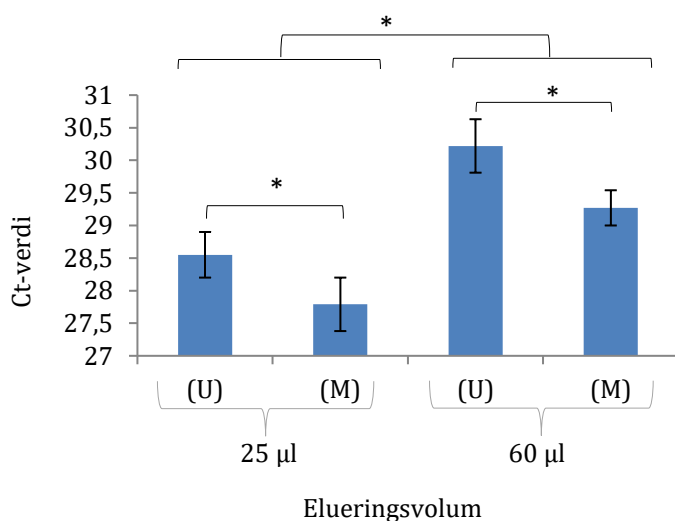
Ettersom tidligere studier har vist motstridende resultater om hvorvidt HPV-DNA finnes i blod/serum hos kvinner med forstadier til kreft, ble det lagt stor vekt på å optimalisere både ekstraksjon og PCR-protokollene benyttet i denne studien. Dette for å oppnå lavest mulig deteksjonsgrense slik at falske negative resultater unngås i størst mulig grad.

### 4.1 Optimalisering av ekstraksjon

#### 4.1.1 Optimalisering fra maksimalt 500 µl serum

##### 4.1.1.1 Effekt av forbehandling av serum og elueringsvolum for ekstraksjon med Generic 2.0.1 protokoll fra easyMAG

Resultatene viste at lavt elueringsvolum ga signifikant lavere Ct-verdier for påvisning av tilsatt HPV 16 DNA ( $p < 0,0001$ ). Det samme gjaldt ved forbehandling med proteinase K, der det ble påvist signifikant lavere Ct-verdier der forbehandling var utført ( $p = 0,001$ ). Ved statistisk beregning med en to-veis ANOVA test ble det samtidig vist at det ikke var noen signifikant interaksjonseffekt mellom elueringsvolum og forbehandling med proteinase K ( $p = 0,672$ ), og de to faktorene bedrer dermed utbyttet, uavhengig av hverandre. Resultatene er vist i figur 11.



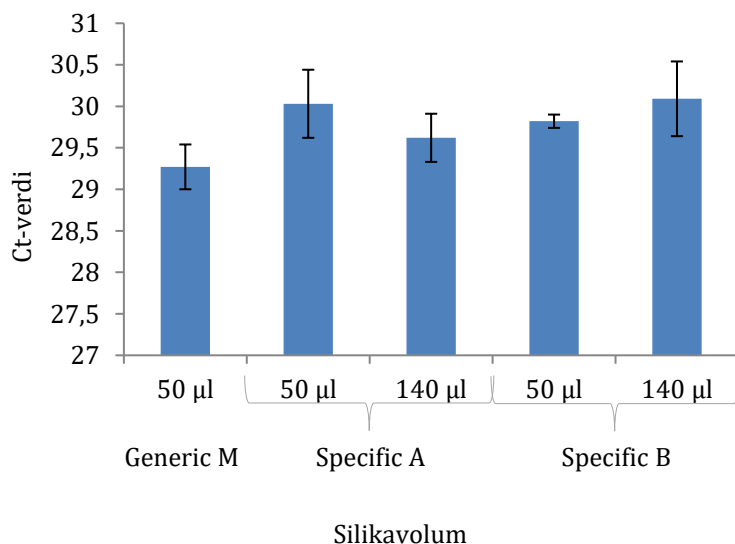
**Figur 11: HPV 16 DNA påvisning ekstrahert med Generic.** Elueringsvolumet ble satt til 25 og 60 µl, uten (U) og med (M) proteinase K forbehandling. \* signifikant forskjell  $p < 0.05$

Med tanke på alle HPV-analysene som skulle utføres på ekstraktene var eluering i 25 µl potensielt ikke tilstrekkelig til alle aktuelle analyser, og effekt av å fortynne eluatet 1:2 ble sammenlignet med eluering i 50 µl. Ingen signifikant forskjell ble vist ( $p = 0,66$ ) og det ble valgt å eluere i et høyere volum.

Protokollen som ble benyttet til videre sammenligner besto av ekstraksjon fra 500 µl serum forbehandlet med 500 µl proteinase K løsning, eluert i 40 til 60 µl.

#### 4.1.1.2 Sammenligning av ulike protokoller på EasyMAG

Resultatene viste en gjennomsnittlig lavere Ct-verdi ved ekstraksjon med Generic M eluert i 60 µl enn med de to spesifikke protokollene (figur 12). Mengde silika tilsatt hadde lite betydning for utbytte. Både spesifikk A og spesifikk B ga tilsvarende Ct-verdier som Generic U beskrevet i punkt 4.1.1.1 (Ct = 30,22 SD = 0,41). Forsøket ble utført på duplikater, og ingen videre statistikk er beregnet.

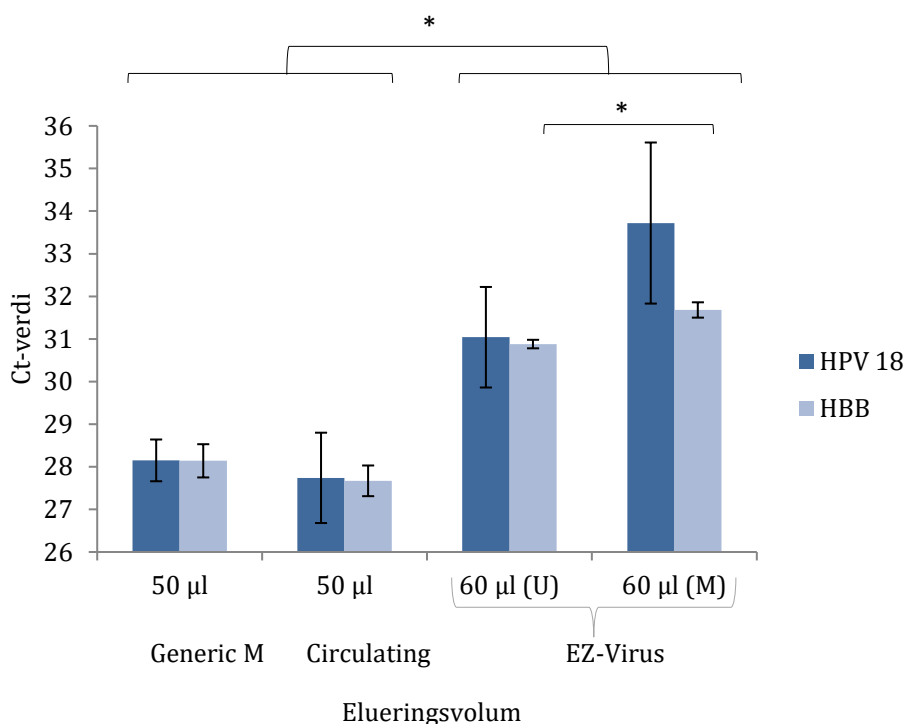


**Figur 12: HPV 16 DNA påvisning ekstrahert med ulike protokoller på easyMAG.** Silikavolum ble satt til 50 og 140 µl. Elueringsvolum for Generic M og Specific B var på 60 µl, og for Specific A på 70 µl.

### 4.1.1.3 Sammenligning av EasyMAG ekstraksjon med andre ekstraksjonsmetoder

Ved sammenligning av Generic M med EZ-Virus og Circulating, viste resultatene et signifikant lavere DNA-utbytte ved ekstraksjon med EZ-Virus i forhold til de to andre protokollene ( $p \leq 0,027$ ) ved to-veis ANOVA test. Ingen signifikant forskjell ble vist mellom Generic M og Circulating ( $p \geq 0,974$ ). På grunn av begrensninger i kittet, ble et lavere serumvolum benyttet i EZ-Virus enn med de andre kittene, men det var over 3 Ct'er i forskjell mellom Generic M eller Circulating og EZ-virus, noe som tilsier en 10 ganger lavere mengde eluert DNA.

Ved ekstraksjon med EZ-Virus vistes signifikant lavere Ct-verdier for HBB ved ekstraksjon uten forbehandling, i forholdt til med forbehandling ( $p = 0,017$ ). For påvisning av HPV 18 var det derimot ingen signifikant forskjell ( $p = 0,077$ ). Resultatene er vist i figur 13.



**Figur 13: Påvisning av HPV 18-, og HBB-DNA ekstrahert med ulike metoder.** Eluering ble utført i 50 µl ved ekstraksjon med Generic M og Circulating, og 60 µl ved bruk av EZ - Virus. Ekstraksjon med EZ - Virus ble utført uten (U) og med (M) forbehandling med ATL buffer, der maksimum tillat volum på 400 µl serum er tilsatt uten forbehandling, og 300 µl ble tilsatt ved forbehandling. Ved Generic M og Circulating ble 500 µl prøvevolum benyttet. \* signifikant forskjell  $p < 0.05$ .



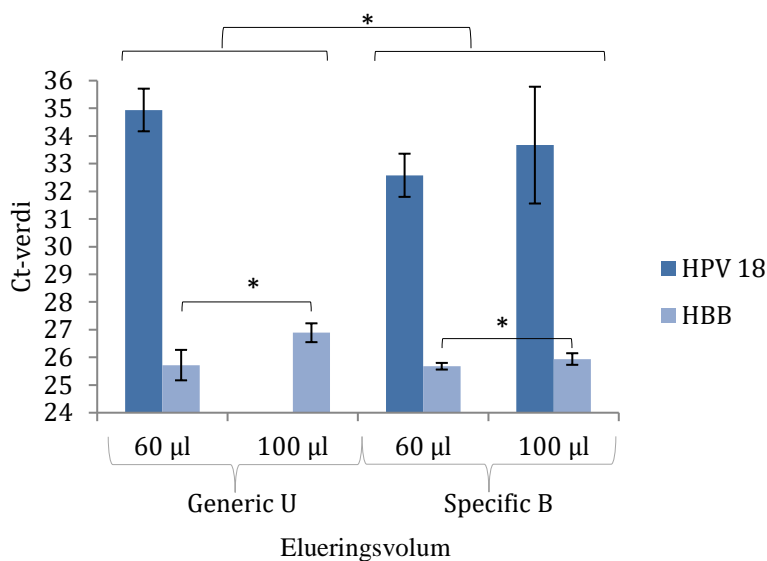
Ved undersøkelse av metodenes sensitivitet ved ekstraksjon fra triplikater av serum tilsatt HPV 18 DNA i fortynningsrekke, var det mulig å detektere alle 3 paralleller ned til 1:500 med Generic M, men kun ned til 1:100 med Circulating. Tilsvarende var det kun en av tre paralleller som var PCR-positiv ved 1:500 fortykning ved ekstraksjon med DNA Blood. Resultatene viste lavest deteksjonsgrense ved ekstraksjon med Generic M.

#### 4.1.2 Optimalisering fra 1000 µl serum

For de tre kvinnene i studien som var diagnostisert med kreft ble Generic M med eluering i 40 µl benyttet til ekstraksjon fra 500 µl prøvemateriale i en innledende fase av studien. Prøvene ble analysert for de HPV-typene som kvinnene hadde fått påvist i livmorhalsen. Med bakgrunn i tidligere publiserte funn av HPV-DNA i blod fra kvinner med kreft, var det forventet mulig positivt resultat, selv om kvinnene var i tidlig kreftstadium. Ingen HPV-typer ble påvist i noen av prøvene. For resten av populasjonen ble bestemt å utføre ekstraksjon med maksimalt tilsetningsvolum i easyMAG (1000 µl), for å få en lavere deteksjonsgrense for påvisning, basert på protokollen etablert ved den italienske gruppen som kunne påvise høye prevalenser av HPV-DNA i plasma prøver <sup>74</sup>.

1000 µl serum ekstrahert med Specific B med elueringsvolum på 100 µl, ble sammenlignet med Generic M protokollen som ble benyttet ved ekstraksjon av kreftprøvene. Resultatene viste at Specific B med et prøvevolum på 1000 µl ga et signifikant høyere DNA-utbytte enn ekstraksjon fra 500 µl serum med Generic M (29,19 (SD = 0,01) mot 30,45 (SD = 0,19)  $p=0,007$ ).

1000 µl serum tilsatt lav mengde HPV 18 DNA ble ekstrahert med Generic U og Specific B, med elueringsvolum på 60 og 100 µl. Resultatene er vist i figur 14. Resultatene for HBB viser en signifikant interaksjonseffekt mellom protokoll og elueringsvolum ( $p = 0,05$ ), og viser at effekt av protokoll på Ct-verdi avhenger av elueringsvolum. Resultatene viser også signifikant lavere Ct-verdier ved ekstraksjon med Specific B ( $p = 0,036$ ) og ved eluering i lavere volum ( $p = 0,007$ ), i en to-veis ANOVA test. HPV 18 ble kun påvist i to av tre prøver ekstrahert med begge protokoller ved et elueringsvolum på 60 µl, der lavere Ct verdier ble vist ved ekstraksjon med Specific B. Ved eluering i 100 µl kunne HPV 18 ikke detekteres ved ekstraksjon med Generic U, mens to av tre prøver ble funnet positive ved ekstraksjon med Specific B.



**Figur 14: HPV 18 HBB DNA påvisning ekstrahert med Generic U og Specific B.** Eluering ble utført i 60 og 100 µl. \* signifikant forskjell  $p < 0.05$

#### 4.1.3 Validering av DNA-utbyttet ved langtidslagring av serum og undersøkelse av mulige inhibitorer i pasientprøvene

Resultatene fra forsøket om effekt av langtidslagring viser at DNA-utbyttet (HBB) i prøvene fra 2012 ikke er signifikant forskjellige (Ct = 27,90 (SD = 1,90)) fra prøvene tatt i 2017 (Ct = 28,12 (SD = 0,78)) ( $p = 0,68$ ). For å måle mulig inhibisjon ble det kjørt en qPCR på IPC tilsatt ved ekstraksjon. Resultatene viste heller ingen signifikant forskjell mellom langtidslagrede (Ct = 30,84 (SD = 1,20)) og nyere prøver (Ct = 30,77 (SD = 0,37)) ( $p = 0,83$ ).

Det ble heller ikke påvist inhibitorer i serumprøvene fra studien, etter sammenligning med ekstraksjon fra TE-buffer. Ingen signifikant forskjell i Ct-verdi ble vist for HPV 16, HBB eller IPC etter analyse med en-veis ANOVA test ( $p \geq 0,18$ ).

#### **4.1.4 Ekstraksjonsprotokoll for screening av pasientprøvene**

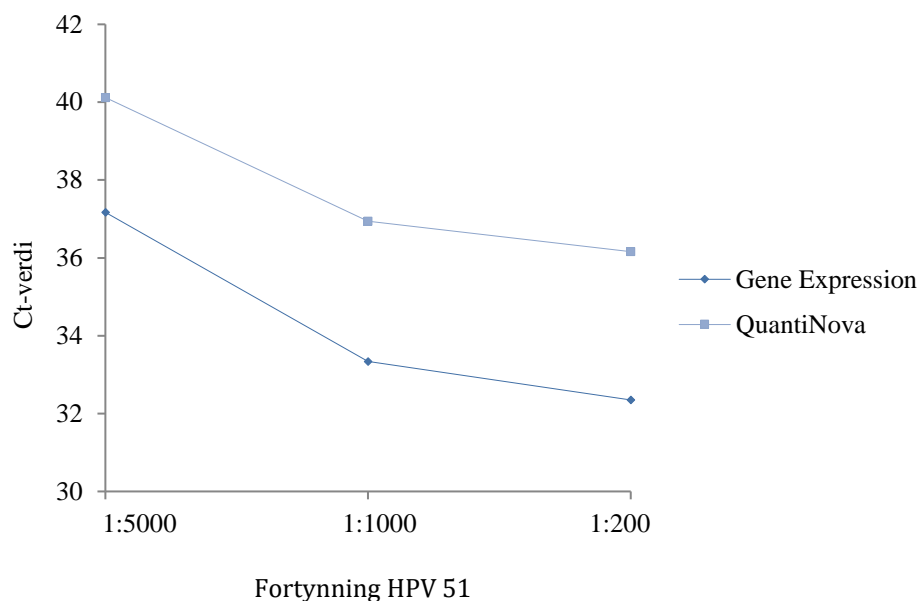
Ut fra resultatene for utprøving og optimalisering ble Specific B 2.0.1 protokoll fra NucliSENS easyMAG på 1000 µl serum, tilsatt 140 µl silika og med elueringsvolum på 60 µl benyttet til ekstraksjon av alle pasientprøvene i studien, med unntak av de tre pasientene diagnostisert med kreft. Som beskrevet i punkt 4.1.2, ble prøvene fra de tre kreftpasientene ekstrahert i en innledende fase i prosjektet, og for disse prøvene ble ekstraksjonen utført på 500 µl serum med protokollen Generic 2.0.1 med forbehandling (Generic M), og eluering i 40 µl.

## **4.2 Optimalisering av qPCR-protokoll**

### **4.2.1 Valg av mastermiks**

TaqMan Gene Expression- og QuantiNova Pathogen mastermiks ble sammenlignet. Forsøket ble utført på en fortynningsrekke av HPV 18 og 51 ekstrahert i serum. Resultatene er grafisk fremstilt i figur 15 for HPV 51, og viser en lavere Ct-verdi ved bruk av Gene Expression mastermiks ved samtlige fortynninger ned til 1:5000.

HPV 18 ble kun påvist i laveste fortykning for begge miksene, men også der var Ct-verdien lavere ved bruk av Gene Expression mastermiks (Ct 34,71 (SD = 1,39)) enn med QuantiNova (Ct 36,96 (SD = 1,03)). Alle videre qPCR-forsøk i studien er utført med TaqMan Gene Expression mastermiks.



**Figur 15: HPV 51 deteksjon ved oppsett av qPCR med TaqMan Gene Expression- og QuantiNova Pathogen mastermiks.** Påvisning ble foretatt i fortynningsrekke av HPV 51 i serum.

#### 4.2.2 Primer og probe konsentrasjon

Bruk av høy primer/probe konsentrasjon (0,90  $\mu\text{M}$ /0,25  $\mu\text{M}$ ) i PCR-miksen ga ingen signifikant forskjell i forhold til lav primer/probe konsentrasjonen (0,30  $\mu\text{M}$ /0,20  $\mu\text{M}$ ) ved oppsett av qPCR på et utvalg HPV-typer ( $p = 0,98$  ved to-sidig T-test). Lave primer/probe-konsentrasjoner ble derfor benyttet ved samtlige analyser utført med qPCR, både under optimalisering av metoder, og ved screening av prøvematerialet.

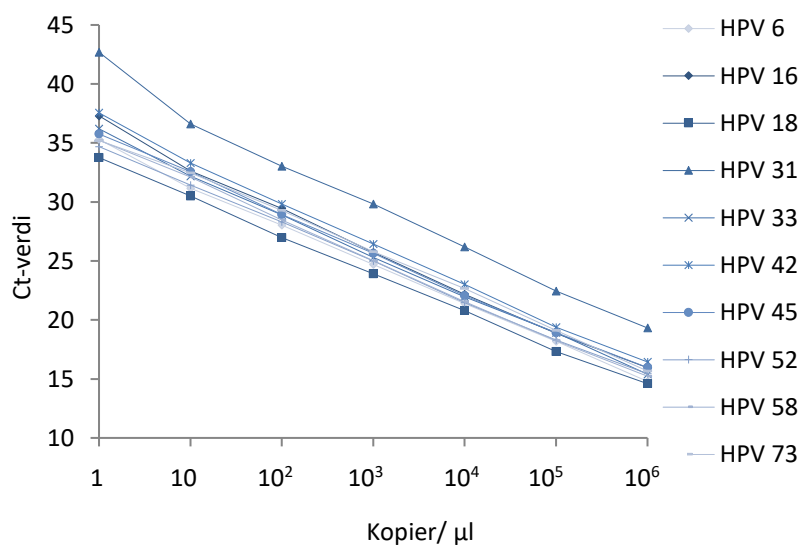
#### 4.2.3 Eluat-mengde i qPCR

Det ble benyttet fortynningsrekker av HPV-DNA, tilsatt og ekstrahert fra serum, hvor 2 og 5  $\mu\text{l}$  eluat ble tilsatt per qPCR-reaksjon. Resultatene viste at de høyeste fortynningene gikk tapt ved å benytte 2  $\mu\text{l}$  fremfor 5. For videre arbeid i studien ble derfor 5  $\mu\text{l}$  eluat ble benyttet til samtlige analyser der det ble screenet etter HPV.

#### 4.2.4 Verifisering av deteksjonsgrense

Sekvensering av de klonede HPV-typene viste at samtlige hadde rett produkt. To HPV-typer (HPV 31 og 42) hadde en mismatch til proben i den probebindende sekvensen. Resultatene er vist i tabell V2 i vedlegg.

Hver fortynning ble satt opp i duplikater med spesifikke primere og prober i separate qPCR-reaksjoner. Resultatene viser at hver HPV-type kunne detekteres ned til 1 kopi/ $\mu$ l ved bruk av den valgte qPCR-protokollen. Resultatene er vist i figur 16.



**Figur 16: Verifisering av deteksjonsgrense for hver HPV-type med qPCR.** Fortynningsrekker av hver HPV-type fra  $10^6$  til  $10^{-1}$  kopier/ $\mu$ l, utarbeidet fra klonede HPV-kontroller. Hver av fortynningene er vist med Ct-verdi ved påvisning.

Resultatene viser en lineær stigning i Ct-verdi fra  $10^6$  til 1 kopi/ $\mu$ l plasmid i reaksjonen for de ulike assayene. Deteksjonsgrense for HPV 31 var lik som for de andre typene, men Ct-verdiene var høyere ved hver fortynning. Assayene designet i denne studien viste samme deteksjonsgrense som de publiserte.

Ved en deteksjonsgrense i qPCR på 1 kopi/ $\mu$ l eluat vil en tilsetning av fem mikroliter tilsvare en deteksjonsgrense på 60 kopier/60  $\mu$ l eluat, altså 60 kopier/ml ekstrahert serum, dersom ekstraksjonsutbytte er på 100 %.

## 4.2.5 Enkel, dupleks eller multipleks qPCR

For å ha tilstrekkelig mengde eluat til å screene for alle ønskede HPV-typer med 5 µl eluat i hver PCR-reaksjon, og i tillegg kunne sette opp for utvalgte typer i ddPCR, ble muligheten for å multiplekse ulike assay undersøkt.

Oppsett med det kommersielle multiplekskittet Anyplex™II HPV 28 detection, resulterte i deteksjon av HPV 18 i middels styrke (++) ved hundre ganger fortykning. Ved femhundre ganger fortykning kunne HPV 18 detekteres i to av tre replikater, men ingen videre påvisning ble gjort. HPV 51 ble ikke påvist ved noen anledning.

Resultatene ved oppsett i enkelt- og dupleks-qPCR er vist i tabell 5. Det var ingen signifikante forskjeller mellom enkelt og dupleks-qPCR-påvisning for de fleste HPV-typer etter beregning med to-sidig T-test. For HPV 6, 18 og 73 ble det vist signifikant lavere Ct verdier ved enkelt oppsett enn i dupleks-reaksjon for 100 kopier/µl, mens kun HPV 6 var signifikant forskjellig ved 10 kopier/µl. Ingen prøve ble negativ i PCRen ved den lave HPV-DNA konsentrasjonen som følge av dupleksing.

**Tabell 5: DNA utbytte ved påvisning av HPV i enkelt- og dupleks qPCR-reaksjoner.** Klonede HPV-kontroller bestående av 100, og 10 kopier/µl ble satt opp i begge reaksjoner for hver HPV-type. Gjennomsnittlig Ct-verdi er vist med standardavvik (SD) for oppsett i enkelt- og dupleks-qPCR. Signifikante forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom enkelt- og dupleks-qPCR ble beregnet ved utførelse av T-test for hver HPV-type (p).

HPV	Real-time PCR										
	100 kopier / µl					p	10 kopier / µl				
	Enkelt-PCR		Dupleks-PCR		Enkelt-PCR		Dupleks-PCR		p		
Ct	SD	Ct	SD	Ct	SD	Ct	SD	Ct		SD	
6	28,79	0,38	29,45	0,27	0,05	31,53	0,36	32,27	0,25	0,05	
16	29,92	0,24	29,48	0,40	0,19	32,59	0,30	32,37	0,20	0,35	
18	27,88	0,13	28,80	0,12	0,001	31,08	0,59	31,61	0,45	0,27	
31	34,04	0,07	33,99	0,20	0,72	35,25	0,13	35,35	0,24	0,58	
33	29,49	0,05	29,52	0,16	0,78	31,99	0,51	31,94	0,44	0,91	
42	31,11	0,27	31,14	0,25	0,92	33,29	0,56	33,66	0,40	0,46	
45	29,80	0,07	30,27	0,22	0,06	32,85	0,54	32,25	0,40	0,20	
52	28,95	0,15	29,06	0,23	0,52	32,10	0,20	32,51	0,46	0,26	
58	29,25	0,16	29,28	0,13	0,77	31,75	0,33	31,51	0,73	0,72	
73	30,13	0,10	30,74	0,09	0,001	33,47	0,90	34,67	0,31	0,14	

Ved HPV-screening av studiematerialet med qPCR ble dupleksreaksjoner benyttet. Ved målrettet screening med ddPCR ble reaksjonene satt opp enkeltvis.

### 4.3 Verifisering av deteksjonsgrense i ddPCR

De klonede HPV-kontrollene ble satt opp i triplikater fra  $10^4$  til  $10^{-1}$  kopi/ $\mu$ l. Denne verifiseringen ble kun utført på HPV 16, 31 og 45, da det var disse typene det i første omgang skulle screenes for med ddPCR. Resultatene viste at alle tre typer kunne detekteres ned til 1 kopi/ $\mu$ l. Deteksjonsgrense for HPV 6, 18, 33 og 52 ble undersøkt i ettertid på duplikater av klonede kontroller fra  $10^2$  til 1 kopi/ $\mu$ l. Samtlige typer oppnådde en deteksjonsgrense ved 1 kopi/ $\mu$ l, med unntak av HPV 6 der 1 kopi/ $\mu$ l kun ble detektert i en av tre replikater. Det ble undersøkt på et utvalg av prøver med dråper med lav fluorescens hvorvidt 45 sykluser ville øke fluorescens intensiteten, men økning av antall sykluser ga ikke høyere fluorescens. 40 sykluser ble dermed benyttet ved samtlige oppsett på studiematerialet.

### 4.4 Screening av prøvematerialet

Totalt ble 159 serumprøver undersøkt i denne studien. Alle kvinner som var positive for HPV 16, 31 og/eller 45 i livmorhalsen ble inkludert uansett lesjonsgrad (N=145). I tillegg ble alle kvinnene med ACIS (N=5) og kreft (N=3) inkludert, uavhengig av hvilke HPV-typer de var påvist med i livmorhalsen. Det ble også inkludert ti kvinner med negativ HPV-test og normal celleprøve.

#### 4.4.1 Screening med qPCR

IPC ble tilsatt til alle serumprøvene i studien for å sikre at ekstraksjon var vellykket. qPCR for HBB og IPC ble satt opp som beskrevet i punkt 3.2.1.1.2. Resultatene viser at HBB (31,82 (SD = 2,29)) og IPC (32,47 (SD = 1,38)) ble påvist i samtlige prøver, og at prøvene dermed var egnet for videre analyse.

Prøvene fra kvinnene positive for HPV 16, 31 og/eller 45 i livmorhalsen, samt de 10 prøvene fra HPV-negative kvinner ble undersøkt for ti HPV-typer i dupleksreaksjoner (HPV 16 og 18, 31 og 45, 33 og 42, 52 og 73, samt 58 og 6) med spesifikke primere og prober. For kvinnene med ACIS, som ikke var HPV-positive i livmorhalsen for HPV 16, 31 eller 45, ble serumprøvene kun undersøkt for typene som var påvist. Kvinnene med kreft ble også kun undersøkt for påviste HPV-typer i livmorhalsen.

HPV-screening ble utført ved oppsett av dupleksreaksjoner med TaqMan Gene Expression mastermikser som beskrevet i punkt 3.2 der 5 µl DNA fra hver prøve ble satt til fem ulike reaksjonsmikser med 0,30 og 0,20 µM av primer og probe. qPCR ble utført med program beskrevet i punkt 3.2 Ved samtlige oppsett ble det tilsatt en positiv kontroll for hver av reaksjonsmikserne, bestående av de to respektive HPV-typene, som assayet var satt opp for. De klonede HPV-kontrollene ble benyttet, der hver av de to var fortynnet til 100 kopier/µl i TE- buffer.

Resultatene fra den brede screeningen med qPCR er vist i tabell 6, og viser at kun 1 av 153 testede serumprøver ble positiv under screening med qPCR. Den aktuelle prøven var HPV 6 positiv.

Ingen av de seks kvinnene med ACIS eller kreft, som kun ble screenet for de HPV-typer de hadde i livmorhalsen, fikk påvist HPV-DNA i serum (tabell 7).

Samtlige positive og negative kontroller stemte overens med forventet resultat. Positive kontroller for HPV 31 og 42 viste en lavere fluorescens.



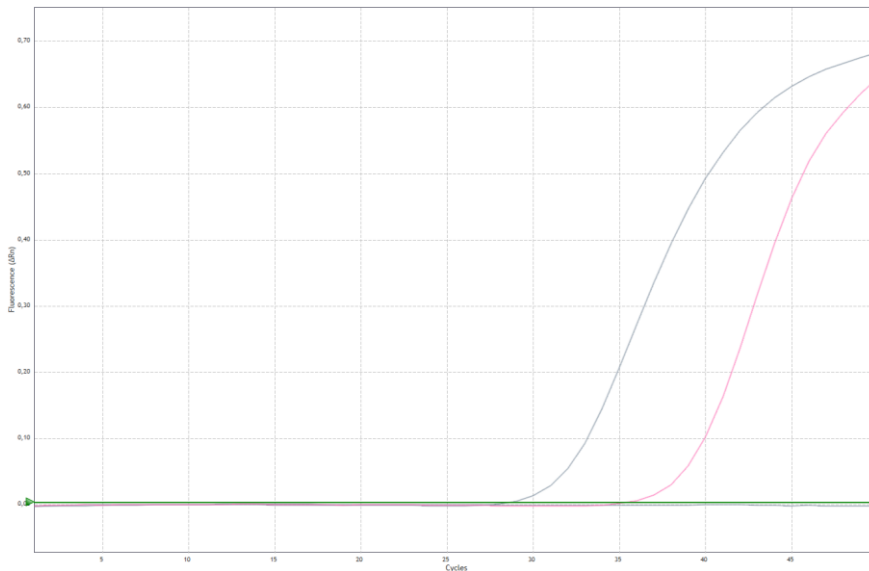
**Tabell 6: HPV-screening med qPCR av serumprøver fra kvinnene i studien.** Antall positive prøver for hver HPV-type er satt i sammenheng med diagnose. Prøvene er screenet for ti HPV-typer. Prevalens for hver HPV-type er vist i prosent.

Diagnose	HPV									
	6	16	18	31	33	42	45	52	58	73
Normal (N = 27)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN 1 (N = 11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN 2 (N = 17)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIN 3 (N = 96)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACIS (N = 2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Totalt (N=153)</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Prevalens (%)</b>	<b>0,65</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Tabell 7: HPV-screening med qPCR av serumprøver fra kvinner med ACIS og kreft.** Kvinnene med kreft ble kun screenet for HPV-typer de hadde fått påvist i livmorhalsen. Det samme var gjeldende for kvinnene med ACIS, der HPV 16, 31 eller 45 ikke var påvist i livmorhalsen. Tabellen viser antall positive av antall analyserte prøver (positiv/antall analysert).

Diagnose	HPV				
	16	18	31	33	52
ACIS (N = 3)	0/0	0/3	0/0	0/0	0/0
Kreft (N = 3)	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1
<b>Totalt (N=6)</b>	<b>0/1</b>	<b>0/4</b>	<b>0/1</b>	<b>0/2</b>	<b>0/1</b>
<b>Prevalens (%)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Resultatet fra kjøringen med qPCR for prøven påvist positiv for HPV 6 er grafisk illustrert i figur 17. Figuren er hentet fra Agilent AriaMx software, versjon 1.3, og viser den positive prøven (rosa kurve med Ct 35,94) sammen med positiv kontroll for HPV 6 (grå kurve) som består av 100 kopier/ $\mu$ l.



**Figur 17: Serumprøve påvist positiv for HPV 6 ved screening med qPCR.** Data fra Agilent AriaMx software, versjon 1.3, der den positive prøven er vist som den rosa kurven. Den positive prøven har en parallell stigning med den positive kontrollen for HPV 6, bestående av 100 kopier/ $\mu$ l, som er vist som den grå stigende kurven. Den negative kontrollen har ingen stigning, og er vist som en flate kurve (grå) som strekkes parallelt med terskellinjen (grønn) nederst i figuren.

Den HPV 6 serumpositive prøven var fra en kvinne som ved første cytologi fikk påvist AGUS. Ved ny cytologi fikk kvinnen påvist ASC-US og hun testet positiv for HPV 31 i livmorhalsen. Histologi viste normale prøver og kvinnen ble derfor ikke konisert.

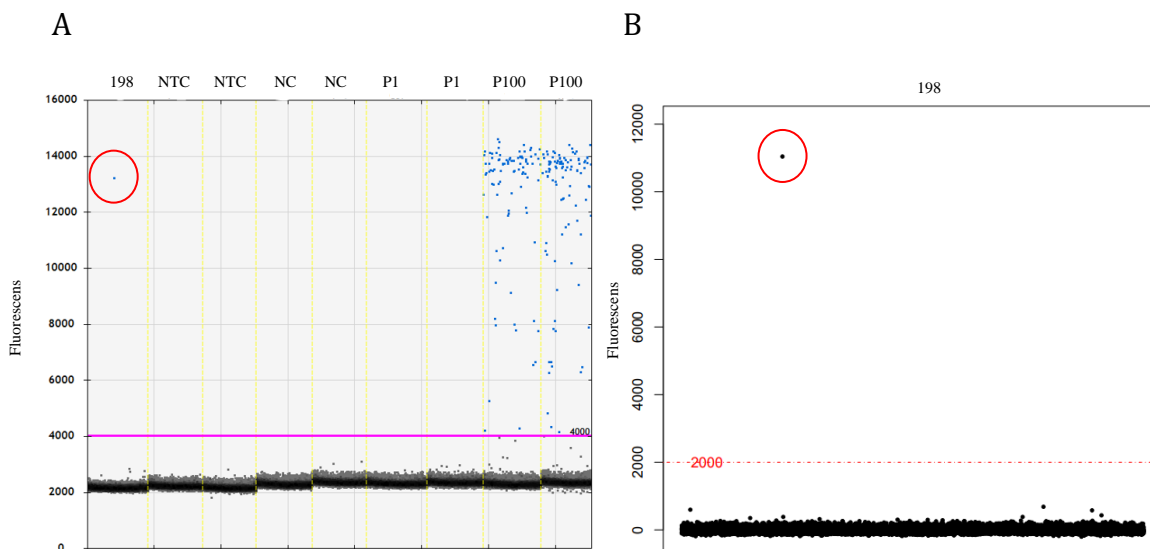
HPV-positivitet i serum analysert med qPCR var ikke relatert til HPV-typer, eller histologigrad i lesjon i livmorhalsen hos de undersøkte kvinner. Screeningen av de 153 prøvene med 10 HPV-typer, derav 7 HR-HPV, 1 sannsynlig HR-HPV og 2 LR-HPV viste en prevalens på 0,65 %.

## 4.4.2 Screening og kvantitering med ddPCR

Målrettet screening med ddPCR ble utført for utvalgte HPV-typer (16, 31, 45, 18 og 33) dersom kvinnene var positive for disse i livmorhalsen. I tillegg ble alle prøver fra kvinner diagnostisert med ACIS og kreft testet i serum for alle typene de hadde fått påvist i livmorhalsen. Prøven funnet positiv for HPV 6 med qPCR ble også satt opp i ddPCR for bekreftelse og kvantitering. Totalt 149 serumprøver ble satt opp i til sammen 182 enkeltreaksjoner med spesifikke assay. De klonede HPV-kontrollene bestående av 1, 10 og/eller 100 kopi/ $\mu$ l ble benyttet som positiv kontroll for hver av de respektive HPV-typene.

### 4.4.2.1 Kvantitering av positive funn gjort ved screening med qPCR

Serumprøven som ble påvist positiv for HPV 6 ved qPCR ble analysert med ddPCR for kvantitering. Prøven ble positiv i ddPCR som vist i figur 18, og kvantitert til 0,06 kopi/ $\mu$ l i Quantasoft. Ingen av de positive kontrollene med konsentrasjon på 1 kopi/ $\mu$ l ble detektert i dette forsøket.



**Figur 18: Påvisning av HPV 6 i serum med ddPCR.** Positive dråper er merket med rød sirkel. **(A)** Resultatene fra Quantasoft viser den positive prøven (id: 198), med en positiv dråpe, lengst til venstre i figuren. Ingen positive dråper ble detektert i de negative kontrollene (NTC/NC). Ingen positive dråper kunne heller detekteres i de positive HPV 6 kontrollene bestående av 1 kopi/ $\mu$ l (P1). De positive kontrollene med 100 kopier/ $\mu$ l (P100) er vist lengst til høyre. **(B)** ddpcRquant analyse av prøve id: 198.

## 4.4.2.2 Målrettet Screening

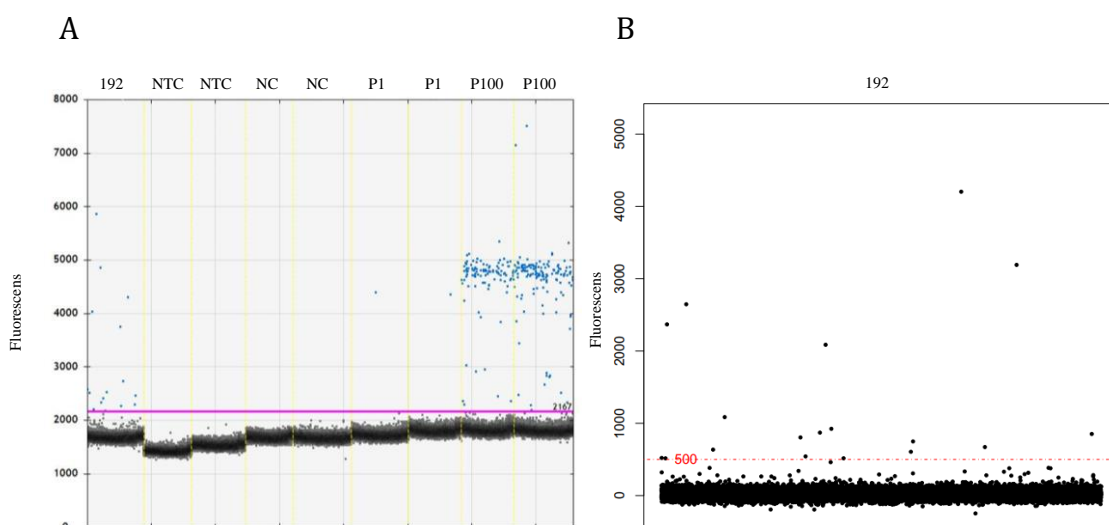
### 4.4.2.2.1 Kvinner diagnostisert med ACIS og kreft

Prøver fra kvinnene diagnostisert med kreft og ACIS ble satt opp for de HPV-typer som var påvist i livmorhalsen hos kvinnen (16, 18, 31, 33, 45 og/eller 52). Ingen av de testede HPV-typene ble påvist i prøvene.

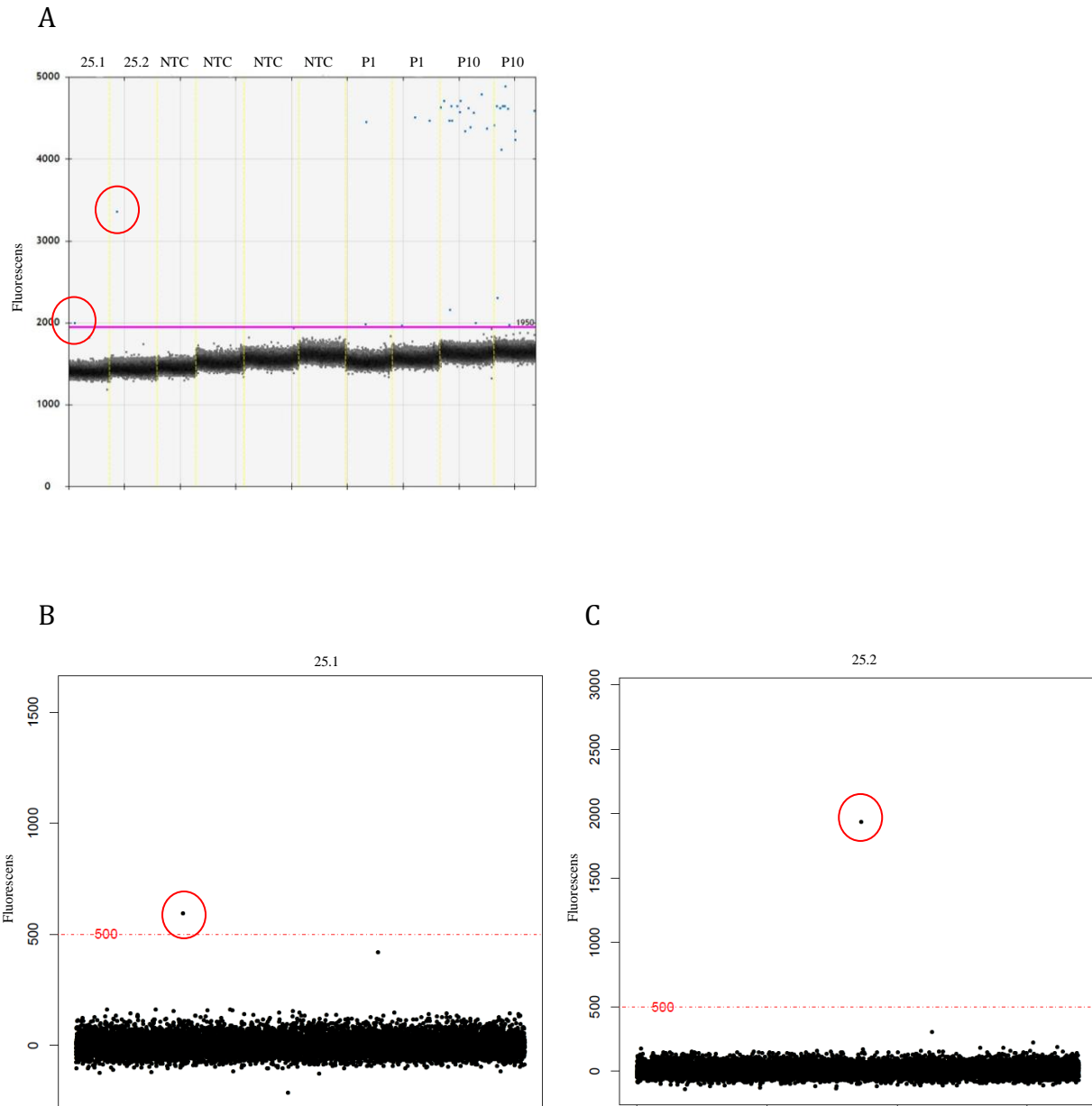
#### 4.4.2.2.1.1 Kvinner med HPV 16, 31 og/eller 45 påvist i livmorhalsen, samt kvantitering av positive funn.

ddPCR ble benyttet til screening for HPV 16, 31 og/eller 45 i samtlige serumprøver der kvinnen var positiv for den/de aktuelle typen(e) i livmorhalsen. 86 prøver ble satt opp for HPV 16, 52 for HPV 31 og 21 for HPV 45.

Det ble påvist en positiv prøve for HPV 31, som vist i figur 19. Prøven ble kvantitert til 1,19 kopier/ $\mu$ l i Quantasoft. Flere andre prøver hadde en eller få dråper med lav fluorescens, og disse ble satt opp igjen i duplikater. Totalt ble 55 prøver kjørt om igjen. Ved omkjøring ble ytterligere en prøve funnet positiv for HPV 31, som vist i figur 20. Denne ble kvantitert til 0,075 kopi/ $\mu$ l. Ingen andre prøver ble positiv for noen av de andre HPV-typene.



**Figur 19: Påvisning av HPV 31 i serum med ddPCR. (A)** Den positive prøven (id: 192) er vist sammen med de negative kontrollene (NTC/NC), samt de positive kontrollene bestående av 1 kopi/ $\mu$ l (P1) og 100 kopi/ $\mu$ l (P100) av HPV 31. **(B)** ddpcRquant analyse av prøve id:192.



**Figur 20: Serumprøve påvist positiv for HPV 31 med ddPCR.** Positive dråper er merket med rød sirkel **(A)**. Den positive prøven (id: 25) er vist i duplikater (25.1 og 25.2) sammen med de negative kontrollene (NTC), og de positive kontrollene bestående av 1 kopi/  $\mu\text{l}$  (P1) og 10 kopier/  $\mu\text{l}$  (P10) av HPV 31. **(B)** og **(C)** ddpcRquant analyse av duplikatene for prøve id:25.

#### 4.4.2.2.2 Kvinner med HPV 18 og/eller 33 påvist i livmorhalsen

Kvinnene som var positive for HPV 16, 31 og/eller 45 i livmorhalsen, som i tillegg var positive for HPV 18 og/eller 33, ble også screenet for disse. HPV 18 og 33 er blant de mest karsinogene typene, og kan derfor være de HPV-typene som forårsaker lesjonene i livmorhalsen. Hverken HPV 18 eller HPV 33 kunne påvises i noen av prøvene.

#### 4.4.2.3 Oppsummering av positive funn etter målrettet screening med ddPCR.

Ved målrettet analyse av serumprøvene ble det screenet etter et utvalg av HR-HPV-typer kun hvis de var påvist i livmorhalsen hos de aktuelle kvinnene. Totalt to prøver ble funnet positive, noe som resulterer i en prevalens på 1,3 % ved målrettet screening med ddPCR. Resultatene er oppsummert i tabell 8, som viser de testede HPV-typer i sammenheng med histologigrad hos kvinnene.

De to HPV 31 serumpositive prøvene ble funnet hos kvinner med CIN3, og med HPV 31 som singel eller multippel infeksjon, sammen med HPV 52 og 66 i livmorhalsen. Kvinnen med HPV 31 singelinfeksjon hadde en HSIL cytologisk diagnose på prøvetidspunkt, og kvinnene med multippel infeksjon hadde en LSIL cytologisk diagnose. Totalt hadde 31 kvinner HPV 31 positive CIN3, og serumprevalensen for disse er dermed på 6,5 %. HPV-prevalensen i serum for livmorhals-spesifikke typer er 0 % for alle andre typer og diagnoser.

**Tabell 8: HPV-funn med ddPCR fra 149 serumprøver, satt opp i til sammen 181 enkeltreaksjoner med spesifikke primere/probe.** Antall positive av antall testede prøver for hver HPV-type er vist for de ulike histologidiagnosene. Total prevalens for hver HPV-type er vist i prosent.

Histologi diagnose	HPV				
	16	31	45	18	33
Normal	0 / 7	0 / 7	0 / 3	0 / 3	0 / 0
CIN 1	0 / 6	0 / 5	0 / 2	0 / 0	0 / 0
CIN 2	0 / 10	0 / 8	0 / 0	0 / 3	0 / 1
CIN 3	0 / 61	2 / 31	0 / 15	0 / 6	0 / 3
ACIS	0 / 1	0 / 0	0 / 1	0 / 3	0 / 0
Kreft	0 / 1	0 / 1	0 / 0	0 / 1	0 / 2
<b>Totalt</b>	<b>0 / 86</b>	<b>2 / 52</b>	<b>0 / 21</b>	<b>0 / 16</b>	<b>0 / 6</b>
<b>Prevalens (%)</b>	<b>0</b>	<b>3.8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

#### **4.5 Sammenlagte resultater fra HPV-DNA undersøkelse med qPCR og ddPCR i serumprøver**

Sammenlagte resultater fra bred og målrettet screening med qPCR og ddPCR hos kvinner med og uten celleforandringer i livmorhalsen viste at HPV-DNA kunne påvises hos 3/159 (1,9 %).

## 5 Diskusjon

Hensikten med denne studien var å undersøke om HPV-DNA i serum korrelerte med lesjonsgrad, og dermed kunne benyttes som en potensiell biomarkør for progresjon av dysplasi. Dette ble gjort ved bruk av optimaliserte protokoller for ekstraksjon og qPCR, samt bruk av den nyere ddPCR-teknologien. Studien ble gjennomført med utgangspunkt i funn hos en italiensk gruppe, som nylig har påvist HPV-DNA i plasma med en prevalens på 34,2 % hos kvinner med celleforandringer i livmorhalsen. I den italienske studien ble HPV-DNA detektert i plasma hos kvinner med normal cytologi, ASC-US, LSIL og HSIL, der HPV 45 var den mest prevalente typen. Gruppen bekreftet også funn i serum hos et utvalg av de samme kvinnene. Den italienske studien er ennå ikke publisert, men ble presentert på en kongress i 2016 <sup>66, 74</sup>. Tidligere studier har imidlertid ikke funnet HPV-DNA prevalens i et slikt omfang hos andre grupper enn kreftpasienter <sup>43, 61-64, 68-70, 72, 73</sup>. Metodologiske forhold kan være av betydning for funn. Det var derfor viktig å benytte en optimalisert metode når det skulle undersøkes om HPV-DNA kunne korreleres med alvorlighetsgrad av lesjoner i livmorhalsen i en norsk populasjon.

Kvinnene i denne studiepopulasjonen ble inkludert dersom de hadde fått påvist HPV 16, 31 og/eller 45 i livmorhalsen, uansett lesjonsgrad. En kontrollgruppe på ti kvinner med negativ HPV-test og normale celleprøver ble også inkludert, samt alle kvinner diagnostisert med ACIS og kreft, som hovedsakelig kun ble undersøkt for de typene de hadde fått påvist i livmorhalsen. Resultatene fra HPV-screening med både qPCR og ddPCR viste at HPV-DNA kunne detekteres i serumprøver hos totalt 3 av de 159 kvinnene som ble inkludert (1,9 %).

For å sikre at negative funn ikke skyldes metodologiske årsaker ble flere metoder sammenlignet for ekstraksjon, hvor kommersielt episomalt HPV-DNA var tilsatt i serum. Sammenligningen av ekstraksjonsprotokoller viste at ekstraksjon med NucliSENS easyMAG med protokoll Specific B ga det beste utbyttet i denne studien. Metoden tillater et større prøvevolum til ekstraksjon enn mange andre protokoller, benyttet i andre studier og er også den samme som ble benyttet av den italienske gruppen som fant en prevalens på 34,2 % i plasmaprøver <sup>66, 74</sup>. I andre publiserte studier er ulike metoder tatt i bruk for å undersøke HPV-DNA i blod, der de fleste har benyttet QIAamp DNA Blood Mini Kit <sup>61, 63, 68, 70, 73</sup>. Gjeldende kitt ble også prøvd ut i denne studien, men ga ikke et like



høyt utbytte av HPV-DNA. QIAamp Mini Elute Virus Spin Kit <sup>64</sup>, QIAamp DNA Mini Kit <sup>43</sup> og Fenol/kloroform ekstraksjon <sup>62, 69, 71</sup> er også tatt i bruk av ulike grupper for ekstraksjon av HPV-DNA fra blod.

HBB ble påvist i samtlige ekstraherte serumprøver i denne studien, noe som bekreftet tilstedeværelse av en moderat mengde humant DNA. Det er fortsatt litt usikkerhet knyttet til hva langtidslagring av serumprøver vil gjøre med DNA-konsentrasjonen i prøvene. En studie utført av Gormally et al. viste at cfDNA kunne ekstraheres etter lagring i mellom 10 og 30 år <sup>58</sup>. Sozzi et al. mener derimot at 30 % av DNAet degraderes hvert år <sup>102</sup>. Messaoudi et al. viser også til resultater der mengden av cfDNA vil avta med tiden, og uttaler at en kvantitering av materialet bør gjennomføres innen tre måneder. De viser likevel samtidig til resultater der de mener at lagring ikke vil ha noen påvirkning på deteksjon av spesifikke sekvenser, da disse også kunne detekteres etter lagring over flere år <sup>103</sup>. En avtagende konsentrasjon vil likevel kunne medføre negative resultater over tid dersom konsentrasjonen kommer under deteksjonsgrensen.

Mengden HBB ble undersøkt i både anonymiserte langtidslagrede og nye serumprøver, lagret ved - 20 °C fra 2012 og 2017. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom de nye og de eldre prøvene. Prøvematerialet fra studien er lagret ved - 80 °C, og det regnes derfor som lite trolig at DNAet var degradert i serumprøvene fra kvinnene i studiepopulasjonen. Alle prøvene var egnet for analyse, da de også var positive for IPC, noe som indikerer at de ikke inneholdt inhibitorer.

De fleste omtalte studier har benyttet qPCR for påvisning av HPV-DNA i blod <sup>61-64, 66, 68-70, 72, 73</sup>. Ikke alle har oppgitt hvilke enzymer eller hvilken mastermiks de har benyttet ved påvisning, men TaqMan Universal mastermiks er blant annet tatt i bruk <sup>62, 63, 69</sup>. Ved sammenligning av TaqMan Universal- med TaqMan Gene Expression mastermiks i forkant av denne studien, ble det vist en høyere sensitivitet for påvisning av HPV med sistnevnte, og denne ble derfor benyttet (resultater ikke vist). Det er påvist lavere prevalens ved bruk av primer/probeassay fra L1 sekvensen, sammenlignet med assay designet i E6/E7 området. En gruppe som har sett på funn av HPV-DNA i serum hos pasienter med tonsillekreft benyttet assay designet i både L1 og E7. De fant en prevalens på 17 % ved bruk av primere for E7, mens ingen HPV-positive kunne detekteres ved bruk av primere for L1 <sup>62</sup>. Ved de fleste tilfeller av livmorhalskreft forekommer det integrasjon av virusets arvestoff inn i vertens kromosom, og en slik integrering fører

ofte til tap av deler av L1 og L2, i motsetning til de onkogene E6 og E7. Et assay designet i L1 og L2 kan dermed føre til falske negative resultater, spesielt hos kreftpasienter <sup>17</sup>. I denne studien ble det benyttet spesifikke primere og prober for hver enkelt HPV-type, der både designede og publiserte assay var lagt i E6 og E7 genene <sup>79</sup>. Ved optimalisering av qPCR i denne studien kunne ikke det kommersielle Anyplex™ II HPV 28 Detection fra Seegene, som påviser 28 HPV-typer i deres L1 gen i multipleks design, vise til like stor sensitivitet som dupleks E6/E7 basert qPCR.

Optimalisering av metodene benyttet i denne studien resulterte i en deteksjonsgrense for samtlige HPV-typer på 1 kopi/μl, tilsvarende 60 kopier/ml serum ved 100 % effektiv ekstraksjon. HPV 31 viste høyere Ct-verdier enn de andre typene ved samme plasmidkonsentrasjon, selv om deteksjonsgrensen lå på samme nivå som de andre HPV-typene. HPV 31 var en av to typer der det ble påvist mismatch mellom proben og klonet positiv kontroll, noe som kan ha betydning for resultatet. Det kan dermed ikke utelukkes at sekvensvariasjoner i primer/probe områdene i det screenede pasientmateriale kan ha ført til noen få falske negative resultater, spesielt i prøver der den forventede konsentrasjonen antas å være nær deteksjonsgrensen. De fleste assayene benyttet i denne studien er imidlertid fra en publisert protokoll <sup>79</sup> som er validert og benyttet i en rekke publiserte genotypestudier <sup>104-108</sup>. I tillegg viser sekvensanalyser i nukleotiddatabasen (NCBI) at mismatch er lite utbredt blant de aktuelle HPV-typene i primer- og probeområdet. Ingen mismatch ble vist til verken primer- eller probesekvens for HPV 6, 16, 18, 33, 58 eller 73. Det foreligger også 100 % match til F-primer for HPV 31, til F- og R-primer for HPV 42, og til proben og R-primer for HPV 45. For HPV 31, 42, 45 og 52 ble mismatch vist til en posisjon i F-primer (24/76 sekvenser for HPV 45 og 8/79 sekvenser for HPV 52), R-primer (5/100 sekvenser for HPV 31 og 2/79 sekvenser for HPV 52) og/eller probesekvens (73/100 sekvenser for HPV 31, 2/10 sekvenser for HPV 42 og 8/79 sekvenser for HPV 52). Mismatch til to posisjoner ble kun vist i 1/100 sekvenser for HPV 31 og 1/79 sekvenser for HPV 52, der HPV 52 hadde mismatch til to posisjoner i probesekvensen og HPV 31 til to posisjoner i R-primeren. Kun HPV 31 ble vist med mismatch i tre posisjoner til R-primer i 3 publiserte sekvenser.

Med unntak av probesekvensene for HPV 31 (27 %) og 42 (80 %), og F-primer sekvensen for HPV 45 (52 %), har mellom 90 og 100 % av sekvensene for de ulike HPV-

typene i databasen 100 % match med primere og prober. Det foreligger dermed ingen misstanke om at assayene medfører store negative utslag på resultatene i denne studien.

Ved bruk av qPCR ble kun en prøve påvist positiv i serum for HPV-type 6, mens ved bruk av ddPCR ble i tillegg to andre prøver positive for HPV 31. Mulige mutasjoner i probeområde hos virus kan føre til at positive dråper ikke oppnår samme fluorescensnivå som positiv kontroll. I både qPCR og ddPCR var fluorescensnivået lavere for HPV 31 positive kontroller sammenlignet med de andre kontrollene, sannsynligvis på grunn av den aktuelle mismatchen i proben.

De to HPV 31 positive påvist med ddPCR var negative i qPCR, og hadde relativt lav fluorescens, slik som de positive kontrollene, noe som kan tyde på mismatch i den probebindende sekvensen også hos disse pasientprøvene. Denne sekvensvariasjon sees hos 73 % av de publiserte HPV 31 sekvensene i databasen. Avvikende funn mellom qPCR og ddPCR er i tråd med en studie som har sammenlignet qPCR og ddPCR ved deteksjon av HIV. Formålet var å se om de to metodene ble påvirket av varierende komplementaritet til både primerene og proben. Resultatene viste 57 % økning i påvist konsentrasjon av HIV ved bruk av ddPCR sammenlignet med qPCR <sup>109</sup>, og viser at ddPCR er en mer robust metode enn qPCR for påvisning av virus. Deteksjon av HPV-DNA i serum, fra både langtidslagrede og nyere prøver, har også vist at ddPCR er en mer følsom metode sammenlignet qPCR <sup>64</sup>. Metoden egner seg derimot ikke i like stor grad som qPCR for større screeninger med tanke på pris per reaksjon og tiden det tar å gjennomføre en analyse. Metoden innebærer også en rekke manuelle trinn, der prøvene må behandles med forsiktighet for å unngå å ødelegge dråpene.

Ved ddPCR undersøkelsene i denne studien ble det påvist dråper med fluorescensnivå rett over grensen for de negative i en av de to parallellene i noen av prøvene for flere HPV-typer. De aktuelle prøvene ble regnet som negative for å unngå falske positive funn, noe som er i tråd med den relativt høye terskelverdien for positivitet i ddPCR valgt i en tidligere publisert HPV-studie fra serum hos kreftpasienter <sup>64</sup>. I en studie på HIV påvisning utført med ddPCR, med fokus på å sette terskelen mellom positive og negative dråper i «regnet», er det imidlertid vist at mismatch i proben førte til et betydelig lavere fluorescensnivå for bekreftede positive prøver <sup>98, 110</sup>. Det kan derfor ikke utelukkes at enkelte prøver med dråper i grenseområdet for negative prøver faktisk kan ha vært positive. Til gjengjeld er ikke mutasjonsrate for HPV like høy som for HIV <sup>111</sup>, og antall

mutasjoner i typespesifikk primer/probe antas derfor å ikke føre til de samme utfordringene som ved kvantitering av HIV.

Kvantitering av de positive funnene viste en konsentrasjon på 60 kopier/ml av HPV 6, mens en konsentrasjon på 75 og 1190 kopier/ml ble detektert for de to positive HPV 31 prøvene. Den positive prøven med høyest konsentrasjon tilhørte kvinnen med multippel infeksjon i livmorhalsen (HPV 31, 52 og 66) og det kan ikke utelukkes at CIN3 her er forårsaket av en annen HPV-type enn HPV 31. Funnene korrelerer med funn gjort i andre studier, hvor konsentrasjoner på mellom 55 og 3676 kopier/ml har blitt funnet i serum hos pasienter med livmorhalskreft <sup>64</sup>. Hos kvinner med nylig påviste celleforandringer i livmorhalsen ble konsentrasjoner på mellom 154 og 3036 kopier/ml detektert i plasma avhengig av HPV-type påvist <sup>74</sup>.

I denne studien kunne HPV-DNA ikke påvises i serum hos pasienter med kreft eller ACIS. Det ble kun påvist HPV 31 hos to av de 96 kvinnene med CIN3 som ble undersøkt, og resultatene viser at funn av HPV-DNA i serum ikke korrelerer med alvorlighetsgrad blant kvinner med forstadier til kreft.

Kvinnen med HPV 6 positiv prøve i serum, hadde normal cytologi og var kun HPV 31 positiv i livmorhalsen. Det er tidligere vist at HPV-funn i blod hos friske kvinner ikke alltid korrelerer med typer i livmorhalsen <sup>66, 69</sup>. Dette kan skyldes tidligere gjennomgått og nedkjempet infeksjon i livmorhalsen eller smitte med den aktuelle HPV-typen i andre organer.

Andre studier som har funnet HPV-DNA i blod, i forbindelse med HPV-infeksjon i livmorhalsen, har vist til relativ høy total prevalens (6,9 – 83 %). Disse studiene er ofte utført på pasienter som er diagnostisert med livmorhalskreft i ulike stadier <sup>61, 64, 67, 69, 70</sup>. I denne studiepopulasjonen var det kun 3 kreftpasienter, der alle hadde mikroinvasiv kreft, stadium 1A, hvilket er et veldig tidlig stadium av kreften <sup>112</sup>. I noen studier er det påvist HPV-DNA allerede på tidlige kreftstadium <sup>64</sup>, mens andre har påvist HPV-DNA kun ved metastatisk kreft <sup>70</sup>. Resultatene fra en studie utført på pasienter med tonsillekreft, viste at 85 % av positive funn i blod var fra tilfeller med alvorlig stadier av kreft <sup>62</sup>. Enkelte har også vist at konsentrasjonen av HPV-DNA i blod øker med kreftens stadium <sup>64, 69, 70</sup>. Jeannot et al. viste blant annet at nivået av HPV-DNA i serum korrelerte med kreftens kliniske stadium, og kunne detektere en konsentrasjon på  $55 \pm 85$  kopier/ml

hos kvinner med livmorhalskreft ved stadium 1 og  $1774 \pm 3676$  ved stadium 4 <sup>64</sup>. En korrelasjon mellom konsentrasjon av HPV-DNA og kreftens stadium kan forklare at HPV ikke kunne detekteres i prøvene fra kvinnene med kreft i denne studien.

De fleste studier som er utført i forbindelse med forstadier til livmorhalskreft og HPV-deteksjon fra blod, har ikke påvist HPV hos kvinner med forstadier til kreft, men kun hos kreftpasienter <sup>61, 64, 67, 69, 70</sup>. Som ved andre typer kreft, er det antatt at HPV-DNA i blod ved kreft forekommer som ctDNA fra tumorvev. I tillegg til deteksjon av HPV-DNA i blod hos kvinner med livmorhalskreft, har det også blitt observert positive funn med lav prevalens (1,3 – 1,7 %) i fullblod og plasma hos kontrollgrupper med kvinner uten celleforandringer eller deteksjon av HPV i livmorhalsen <sup>61, 69</sup>. Disse funnene korrelerer med resultatene gjort ved screening med qPCR i denne studien, som resulterte i en prevalens på 0,65 %, der HPV 6 ble detektert i serum hos en kvinne med normal prøve etter histologisk undersøkelse. Det foreligger indikasjoner på at HPV-DNA i blod som påvises hos friske mennesker er cellebundet, der spesielt PBMC antas å ta opp viruspartikler, som skilles ut ved produktive infeksjoner. HPV-DNA er blant annet påvist i PBMC hos 3 av 19 (15,7 %) friske blodgivere i en studie der HPV-DNA også ble påvist hos 14 % av HIV smittede pasienter <sup>72</sup>. HPV-DNA er samtidig påvist med en lav prevalens (8,3 %) i PBMC hos friske mannlige blodgivere <sup>73</sup> og hos 4 av 16 (25 %) menn der HPV var detektert i sædprøver <sup>43</sup>. Dette kan tyde på at infeksjon med HPV hos menn også kan føre til at HPV går over i blodbanen via immunceller. I tillegg uttrykkes HSPG blant annet på B-lymfocyttenes overflate, og disse cellene kan således være en målcelle for binding av HPV-partikler ved produktiv infeksjon. Denne reseptoren er uttrykt hos en rekke celler og benyttes av mange ulike virus for celledeling <sup>113</sup>. HPV bruker i tillegg til HSPG flere koreseptorer for å kunne tas opp i målcellen. Dette behovet, samt det faktum at HPV krever celledeling for å kunne replikere, setter en begrensning for hvilke celler viruset kan smitte. HPV har en strengt regulert replikasjonsyklus der cellers differensieringsstadium er av avgjørende betydning for en produktiv infeksjon, noe som er viktig ved antagelsen om at HPV kun kan smitte epitelceller. HPV smitter likevel stamceller i Squamocolumnar junction og sylinderepitel i livmorhalsen <sup>18</sup>, og kan derfor opprettholde uttrykk av visse gener i en ikke-produktiv replikasjon. Det finnes dermed en mulighet for at viruset skal kunne uttrykke noen av sine gener i blodceller også. Dette kan forklare funnene hos Foresta et al. som påviste E6 protein i PBMC. E6 ble likevel funnet hovedsakelig i cytoplasma i cellene, og betydning av funnet er derfor

uklart <sup>43</sup>. I tillegg har Chen et al. (2009) kun påvist reseptor-bundet HPV på utsiden av blodcellene <sup>73</sup>. Binding eller smitte av blodceller med HPV kan likevel føre til transport av viruset til målceller i indre organer, som viruset normalt ikke har tilgang til, der det antas at de blant annet kan forårsake smitte i stamceller. En studie har nylig påvist HPV-DNA, E6 mRNA og E6 protein i celler fra hjernebarken hos barn i forbindelse med en bestemt type epilepsi <sup>16</sup>, noe som indikerer at viruset klarer å replikere og uttrykke noen proteiner i andre celletyper enn epitelceller.

Ved transformerende infeksjoner, som ved CIN3 i livmorhalsen, foregår det ikke lenger produktiv virusreplikasjon <sup>18</sup>, noe som kan være en årsak til at overføring av HPV-DNA til blodbanen ikke er like vanlig ved transformerende infeksjoner, som ved produktive infeksjoner, der binding eller opptak av hele viruspartikler er av stor betydning. Det kan likevel være en mulighet for at HPV-DNA går over til blodbanen hos kvinner med CIN3 ved samme prosess som ved kreft.

Enkelte studier som viser til positive funn av HPV-DNA i blod hos kreftpasienter og hos kontrollgruppene, kunne ikke detektere HPV-DNA hos noen av kvinnene med forstadier <sup>61,69</sup>. Dette kan være med på å styrke antagelsen om at HPV-DNA funn ved kreft stammer fra ctDNA frigjort fra kreftceller, mens funn hos friske stammer fra opptak av viruspartikler i PBMC i forbindelse med immunrespons mot en produktiv infeksjon.

I denne studien har ikke PBMC vært tilgjengelig for analyse, men det kan tenkes at det hadde vært en mer optimal fraksjon å analysere hos kvinner med tidlige forstadier. Analyse av fullblod, der alle blodfraksjoner blir screenet, ville muligens også kunne ført til andre resultater. En eldre studie påviste HPV-DNA i PBMC hos 13 av 25 (52 %) kvinner som var positive for HPV 6, 11, 16 og/eller 18 i livmorhalsen, med ukjent lesjonsgrad. Tilsvarende undersøkelser på serumprøver påviste HPV-DNA hos kun to av kvinnene, der den ene prøven var positiv for HPV 6 og den andre for HPV 11, begge lavvirulente virustyper som forårsaker produktive infeksjoner. Begge de aktuelle kvinnene var positive for samme HPV-type i PBMC og i livmorhalsen. Resultatene fra den aktuelle studien kan tyde på at HPV-DNA i serum blir frigjort fra PBMC under koaguleringsprosessen. Studien inkluderte også 19 kvinner uten påvist HPV i livmorhalsen, der ingen av kvinnene fikk påvist HPV-DNA i verken serum eller PBMC <sup>65</sup>.

Den sammenlagte prevalensen i denne studiepopulasjon er dermed i tråd med de fleste tidligere funn hos kvinner med normale funn i livmorhalsen, eller ulike grad av forstadier til kreft <sup>61, 65, 69, 73</sup>. Det foreligger derimot usikkerhet rundt hvorvidt serum er den rette blodfraksjonen å benytte ved deteksjon av HPV-DNA i blod. Det finnes en mulighet for at deler av cfDNAet i serum vil gå tapt som følge av koaguleringen sammen med fibrinogen, sammenlignet med plasma som er tilsatt et stoff som hindrer blodet fra å koagulere <sup>114</sup>. Det er rapportert om høyere konsentrasjoner av HPV-DNA i plasma enn i serum, ved funn av HPV-DNA hos kvinner med livmorhalskreft <sup>64</sup>. Høye prevalenser hos ikke-kreftpasienter er kun funnet i plasmaprøver i den ene omtalte italienske studien. Funnene hos den italienske gruppen kunne ikke bekreftes i denne studien. Plasmaprøvene i den italienske protokollen er imidlertid preparert fra 20 ml heparinblod <sup>74</sup>. Det kan tenkes at tilsetning av heparin som antikoagulant, fremfor EDTA eller citrat kan ha påvirket positivitetsraten, da heparin er vist å binde og aktivere HPV ved infeksjon <sup>115, 116</sup>.

For at HPV-DNA skal kunne benyttes som en biomarkør for progresjon må deteksjon også være mulig i forkant av kreften. I de fleste tilfeller av CIN1 foregår det fremdeles en produktiv infeksjon med virusreplikasjon, noe som kan være assosiert med en større mulighet til å detektere HPV i blod ved dette stadiet. Det er mulig at transport av HPV i blod kan være knyttet til immunresponsen, som kan være av stor betydning for progresjon eller regresjon, og videre studier for påvisning av HPV-DNA i ulike blodfraksjoner hos kvinner med ulik grad av dysplasi vil være av stor betydning for forståelse av sykdomsutvikling.

## 6 Konklusjon

I denne studien ble det påvist HPV-DNA i serum hos totalt 3 av 159 kvinner, noe som gir en prevalens av HPV-DNA i serum på totalt 1,9 %. To av de tre serumprøvene som ble påvist positive for HPV viste en korrelasjon til HPV-typen som var påvist i livmorhalsen, og ble funnet hos kvinner med alvorlige celleforandringer. Videre oppfølging av disse to kvinnene ville vært interessant for å forstå betydningen av funnene i forhold til immunresponsen og eventuell residiv. Den tredje prøven viste derimot ingen slik korrelasjon. HPV-DNA kunne ikke detekteres i serumprøvene fra kvinnene med ACIS eller livmorhalskreft, og HPV-DNA i serum ble dermed ikke funnet til å korrelere med alvorlighetsgrad av lesjoner i livmorhalsen i denne studien. Resultatene viser at HPV-DNA i serum ikke synes å være egnet som biomarkør for progresjon av dysplasi i livmorhalsen, men at deteksjon av HPV-DNA i serum er mulig. Videre forskning er nødvendig for å identifisere mekanismen(e) som fører til at HPV går over i blodbanen, avhengig av produktiv- eller transformerende infeksjon, eller kreft. Det er også behov for kunnskap om hvorvidt HPV-DNA som påvises i blod er assosiert med celler, eller foreligger som fritt sirkulerende DNA. Denne kunnskapen om HPV's tilstand i blodbanen er nødvendig for å identifisere den rette blodfraksjon for optimal deteksjon av HPV-DNA, og kartlegge betydning av HPV-DNA-funnene i sykdomsutvikling. Longitudinelle studier vil kunne gi svar på hvorvidt HPV-DNA i aktuelle blodfraksjoner kan benyttes som en biomarkør for å identifisere de kvinnene med dysplasi i livmorhalsen, som har høyere risiko til å utvikle livmorhalskreft.



## 7 Referanser

1. Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. & de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401 (1): 70-79.
2. De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U. & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324 (1): 17-27.
3. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, 25 (S1): 2-23.
4. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30: F55-F70.
5. Zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1288 (2): F55-F78.
6. Kocjan, B. J., Bzhalava, D., Forslund, O., Dillner, J. & Poljak, M. (2015). Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clinical Microbiology and Infection*, 21 (9): 808-816.
7. Zur Hausen, H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. I: *Current topics in microbiology and immunology*, s. 1-30: Springer.
8. Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2 (5): 342-350.
9. *Human papillomavirus (HPV)*. Tilgjengelig fra: <http://www.who.int/immunization/topics/hpv/en/> (lest 21.07.2017).
10. *Cancer Registry of Norway. Cancer in Norway 2015 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*. . Tilgjengelig fra: <https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2015/cin-2015-special-issue.pdf> (lest 21.07.2017).
11. Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., Stanley, M. A. & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2: 16086.
12. Leto, M. d. G. P., Júnior, S., Porro, A. M. & Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais brasileiros de dermatologia*, 86 (2): 306-317.
13. Mauz, P.-S., Zago, M., Kurth, R., Pawlita, M., Holderried, M., Thiericke, J., Iftner, A., Stubenrauch, F., Sotlar, K. & Iftner, T. (2014). A case of recurrent respiratory papillomatosis with malignant transformation, HPV11 DNAemia, high L1 antibody titre and a fatal papillary endocardial lesion. *Virology journal*, 11 (1): 114.
14. Orth, G. (1987). Epidermodysplasia verruciformis. I: *The papovaviridae*, s. 199-243: Springer.
15. Cubie, H. A. (2013). Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 445 (1): 21-34.

16. Chen, J., Tsai, V., Parker, W. E., Aronica, E., Baybis, M. & Crino, P. B. (2012). Detection of human papillomavirus in human focal cortical dysplasia type IIB. *Annals of neurology*, 72 (6): 881-892.
17. Lie, A. (2000). Medisin og vitenskap-Basalfagene-Humant papillomavirus som årsak til kreftutvikling. *Tidsskrift for den Norske Lægeforening*, 120 (23): 2771-2776.
18. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. & Doorbar, J. (2015). Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*, 7 (7): 3863-3890.
19. Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*, 110 (5): 525-541.
20. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Tilgjengelig fra: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/121/papillomaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae) (lest 20.07.2017).
21. Ma, Y., Madupu, R., Karaoz, U., Nossa, C. W., Yang, L., Yooseph, S., Yachinski, P. S., Brodie, E. L., Nelson, K. E. & Pei, Z. (2014). Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. *Journal of virology*, 88 (9): 4786-4797.
22. Folkehelseinstituttet. (2016). *Humant papillomavirus (HPV), HPV-relatert kreft og HPV-vaksine*. 3 utg. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/contentassets/3655479d231d434a847b2ceff8c37476/hpv-faktahefte-2016.pdf> (lest 12.06.2017).
23. Baseman, J. G. & Koutsky, L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology*, 32: 16-24.
24. Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2012). Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100 (PT A): 1.
25. Munoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24: S1-S10.
26. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370 (9590): 890-907.
27. Burchell, A., Winer, R., de Sanjosé, S. & Franco, E. (2006). Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24: 52-61.
28. Molden, T., Feiring, B., Ambur, O. H., Christiansen, I. K., Hansen, M., Laake, I., Meisal, R., Myrvang, E., Jonassen, C. M. & Trogstad, L. (2016). Human papillomavirus prevalence and type distribution in urine samples from Norwegian women aged 17 and 21 years: A nationwide cross-sectional study of three non-vaccinated birth cohorts. *Papillomavirus Research*, 2: 153-158.
29. Woodman, C. B., Collins, S. I. & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7 (1): 11-22.
30. Sjøborg, K. D., Tropé, A., Lie, A. K., Jonassen, C. M., Steinbakk, M., Hansen, M., Jacobsen, M. B., Cuschieri, K. & Eskild, A. (2010). HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia. *Gynecologic oncology*, 118 (1): 29-34.
31. Bosch, F. X. & de Sanjosé, S. (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease markers*, 23 (4): 213-227.
32. Lee, S. M., Park, J. S., Norwitz, E. R., Koo, J. N., Oh, I. H., Park, J. W., Kim, S. M., Kim, Y. H., Park, C.-W. & Song, Y. S. (2013). Risk of vertical transmission of human papillomavirus throughout pregnancy: a prospective study. *PloS one*, 8 (6): e66368.

33. Moscicki, A.-B., Schiffman, M., Kjaer, S. & Villa, L. L. (2006). Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24: S42-S51.
34. Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C. & Castle, P. E. (2011). Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103 (5): 368-383.
35. *Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft. Flytskjema for oppfølging av cervix-cytologiske screeningprøver.* Tilgjengelig fra: <https://www.kreftregisteret.no/globalassets/masseundersokelsen-mot-livmorhalskreft/flytdiagram/flytskjema.pdf> (lest 21.07.2017).
36. Pedersen, K., Lönnberg, S., Skare, G. B., Sørbye, S. W., Burger, E. & Kristiansen, I. S. (2015). Kostnader ved Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft. *Sykepleien Forskning*: 62-71.
37. Burger, E. A., Ortendahl, J., Sy, S., Kristiansen, I. S. & Kim, J. J. (2012). Cost-effectiveness of cervical cancer screening with primary human papillomavirus testing in Norway. *British journal of cancer*, 106 (9): 1571-1578.
38. Sørbye, S., Fismen, S., Gutteberg, T. J. & Mortensen, E. (2013). HPV-testing og livmorhalskreft - fastlegens viktigste screeningoppgave? *Utposten*, 2: 34-37.
39. *HPV-vaksine (Humant papillomavirus) - veileder for helsepersonell.* Tilgjengelig fra: <https://fhi.no/nettpub/vaksinasjonsveilederen/vaksiner-mot-de-enkelte-sykdommene/hpv-vaksinasjon-humant-papillomavir/> (lest 21.07.2017).
40. *HPV-vaksinasjon: Endringer i barnevaksinasjonsprogrammet fra høsten 2017.* Tilgjengelig fra: <https://fhi.no/sv/vaksine/barnevaksinasjonsprogrammet/endring-for-hpv-vaksine-i-barnevaksinasjonsprogrammet/> (lest 21.07.2017).
41. *Livmorhalsprogrammet. Årsrapport 2015.* (2015). Tilgjengelig fra: <https://www.kreftregisteret.no/globalassets/publikasjoner-og-rapporter/livmorhalskreft/arsrapport/aarsrapport-livmorhalsprogrammet-2015.pdf> (lest 24.07.2017).
42. *HPV i primærscreening.* Kreftregisteret. Tilgjengelig fra: <https://www.kreftregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/HPV-i-primarscreening/> (lest 28.07.2017).
43. Foresta, C., Bertoldo, A., Garolla, A., Pizzol, D., Mason, S., Lenzi, A. & De Toni, L. (2013). Human papillomavirus proteins are found in peripheral blood and semen Cd20+ and Cd56+ cells during Hpv-16 semen infection. *BMC infectious diseases*, 13 (1): 593.
44. Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Yan, L., Da Silva, D. M., Schelhaas, M. & Kast, W. M. (2013). The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *Journal of virology*, 87 (11): 6062-6072.
45. Horvath, C. A., Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O. & Bogers, J.-P. J. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal*, 7 (1): 11.
46. Schiller, J. T., Day, P. M. & Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, 118 (1): S12-S17.
47. Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24: S16-S22.
48. Folkehelseinstituttet. (2016). *Vaksine mot humant papillomavirus (HPV).* Tilgjengelig fra:

- <https://www.fhi.no/globalassets/migrering/dokumenter/pdf/hpv-rapport-20162.pdf> (lest 29.07.2017).
49. Chen, E. Y., Tran, A., Raho, C. J., Birch, C. M., Crum, C. P. & Hirsch, M. S. (2010). Histological 'progression' from low (LSIL) to high (HSIL) squamous intraepithelial lesion is an uncommon event and an indication for quality assurance review. *Modern Pathology*, 23 (8): 1045-1051.
  50. de Freitas, A. C., Coimbra, E. C. & Leitão, M. d. C. G. (2014). Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845 (2): 91-103.
  51. Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, D., Ridder, R., Rudy, W., Petry, U., Dallenbach-Hellweg, G., Schmidt, D. & von Knebel Doeberitz, M. (2001). Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*, 92 (2): 276-284.
  52. Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K. & Hariri, J. (2013). Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *Journal of the National Cancer Institute*, 105 (20): 1550-1557.
  53. Nagamitsu, Y., Nishi, H., Sasaki, T., Takaesu, Y., Terauchi, F. & Isaka, K. (2016). Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer. *Molecular and clinical oncology*, 5 (1): 189-194.
  54. Xin, F., Liu, P. & Ma, C. (2016). A circulating serum miRNA panel as early detection biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20 (23): 4846-4851.
  55. Bierkens, M., Hesselink, A. T., Meijer, C. J., Heideman, D. A., Wisman, G. B. A., Zee, A. G., Snijders, P. J. & Steenbergen, R. D. (2013). CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *International journal of cancer*, 133 (6): 1293-1299.
  56. Wilting, S. M., van Boerdonk, R. A., Henken, F. E., Meijer, C. J., Diosdado, B., Meijer, G. A., le Sage, C., Agami, R., Snijders, P. J. & Steenbergen, R. D. (2010). Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Molecular cancer*, 9 (1): 167.
  57. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F. & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews Clinical oncology*, 10 (8): 472-484.
  58. Gormally, E., Caboux, E., Vineis, P. & Hainaut, P. (2007). Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 635 (2): 105-117.
  59. Pao, C. C., Hor, J. J., Yang, F.-P., Lin, C.-Y. & Tseng, C.-J. (1997). Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *Journal of clinical oncology*, 15 (3): 1008-1012.
  60. Tseng, C.-J., Pao, C. C., Lin, J.-D., Soong, Y.-K., Hong, J.-H. & Hsueh, S. (1999). Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *Journal of clinical oncology*, 17 (5): 1391-1391.
  61. Kay, P., Allan, B., Denny, L., Hoffman, M. & Williamson, A. L. (2005). Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer. *Journal of medical virology*, 75 (3): 435-439.

62. Capone, R. B., Pai, S. I., Koch, W. M., Gillison, M. L., Danish, H. N., Westra, W. H., Daniel, R., Shah, K. V. & Sidransky, D. (2000). Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*, 6 (11): 4171-4175.
63. Dahlstrom, K. R., Li, G., Hussey, C. S., Vo, J. T., Wei, Q., Zhao, C. & Sturgis, E. M. (2015). Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. *Cancer*, 121 (19): 3455-3464.
64. Jeannot, E., Becette, V., Campitelli, M., Calm ejane, M. A., Lappartient, E., Ruff, E., Saada, S., Holmes, A., Bellet, D. & Sastre-Garau, X. (2016). Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 2 (4): 201-209.
65. Pao, C. C., Lin, S.-S., Lin, C.-Y., Maa, J.-S., Lai, C.-H. & Hsieh, T. S.-T. A. (1991). Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *American journal of clinical pathology*, 95 (4): 540-546.
66. M. Martinelli, R. M., E. Calaresu, E. Tanzi, G. Sotgiu, A. Piana, C. Cocuzza. (2016, June 15-18). *High-risk HPV detection in plasma samples of women with a recent history of cervical dysplasia*. Eurogin, Salzburg, Austria.
67. Liu, V. W., Tsang, P., Yip, A., Ng, T.-Y., Wong, L.-C. & Ngan, H. Y. (2001). Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecologic oncology*, 82 (2): 269-272.
68. Cao, H., Banh, A., Kwok, S., Shi, X., Wu, S., Krakow, T., Khong, B., Bavan, B., Bala, R. & Pinsky, B. A. (2012). Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 82 (3): e351-e358.
69. Dong, S. M., Pai, S. I., Rha, S.-H., Hildesheim, A., Kurman, R. J., Schwartz, P. E., Mortel, R., McGowan, L., Greenberg, M. D. & Barnes, W. A. (2002). Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 11 (1): 3-6.
70. Sathish, N., Abraham, P., Peedicayil, A., Sridharan, G., John, S., Shaji, R. & Chandy, G. (2004). HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. *Journal of clinical virology*, 31 (3): 204-209.
71. Pornthanakasem, W., Shotelersuk, K., Termrungruanglert, W., Voravud, N., Niruthisard, S. & Mutirangura, A. (2001). Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC cancer*, 1 (1): 2.
72. Bodaghi, S., Wood, L. V., Roby, G., Ryder, C., Steinberg, S. M. & Zheng, Z.-M. (2005). Could human papillomaviruses be spread through blood? *Journal of clinical microbiology*, 43 (11): 5428-5434.
73. Chen, A. C. H., Keleher, A., Kedda, M. A., Spurdle, A. B., McMillan, N. A. & Antonsson, A. (2009). Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *Journal of medical virology*, 81 (10): 1792-1796.
74. Cocuzza, C. (2017). *Telefonm ete med Dr Clementina Cocuzza, Milano, Italia (06.01.2017)*.
75. *NucliSENS easyMAG Brukermanual v2.0*. Biomerieux.
76. *EZ1® Virus Handbook*. (2010). Qiagen.
77. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. (2016). Qiagen.

78. *QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook*. (2013). Qiagen.
79. Lindh, M., Görander, S., Andersson, E., Horal, P., Mattsby-Balzer, I. & Ryd, W. (2007). Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *Journal of Clinical Virology*, 40 (4): 321-324.
80. *International HPV Reference Center*. Tilgjengelig fra: <http://ki.se/en/labmed/international-hpv-reference-center> (lest 21.07.2017).
81. *NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*. Tilgjengelig fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
82. *Clustal Omega, EBI (The European Bioinformatics Institute)*. Tilgjengelig fra: <http://www.ebi.ac.uk/>.
83. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40 (15): e115-e115.
84. Koressaar, T. & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23 (10): 1289-1291.
85. Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *african Journal of biotechnology*, 2 (5): 91-95.
86. *QIAxcel Advanced Application Guide*. (2016). Tilgjengelig fra: [file:///C:/Users/yvonn/Downloads/PROM-6784-002\\_1103847\\_BRO\\_Application\\_Guide\\_QIAxcel\\_1016\\_WW\\_lr.pdf](file:///C:/Users/yvonn/Downloads/PROM-6784-002_1103847_BRO_Application_Guide_QIAxcel_1016_WW_lr.pdf) (lest 19.09.2016).
87. *TIB-MOLBIOL*. Tilgjengelig fra: <https://www.tib-molbiol.com>.
88. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732): 1350-1354.
89. Zhou, M.-Y. & Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current issues in molecular biology*, 2: 1-8.
90. *Original TA Cloning Kit User Guide*. (2013). 4,0 utg. Tilgjengelig fra: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/ta\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/ta_man.pdf) (lest 31.01.2017).
91. Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic acids symposium series: [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000. 95-98 s.
92. *Qubit Nucleic Acid Quantitation brochure*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory%20Instruments/Files/0515/Qubit-Quantitation-Brochure.pdf> (lest 27.02.2017).
93. *Qubit® dsDNA HS Assay Kits*. (2015). B utg. Tilgjengelig fra: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit\\_dsDNA\\_HS\\_Assay\\_U G.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_U G.pdf) (lest 27.02.2017).
94. *BamHI (10 U/μL), Thermo Fisher Scientific*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0051?SID=srch-srp-ER0051> (lest 01.03.2017).
95. Stephenson, F. H. (2016). *Calculations for molecular biology and biotechnology*: Academic press.
96. *Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) Technology*. Tilgjengelig fra: <http://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology> (lest 05.10.2016).

97. *Droplet digital PCR (ddPCR)*. Tilgjengelig fra: <http://splice-bio.com/race-towards-the-future-digital-droplet-pcr-conqueror-or-ally/> (lest 04.07.2017).
98. Trypsteen, W., Vynck, M., De Neve, J., Bonczkowski, P., Kiselina, M., Malatinkova, E., Vervisch, K., Thas, O., Vandekerckhove, L. & De Spiegelaere, W. (2015). ddpcRquant: threshold determination for single channel droplet digital PCR experiments. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407 (19): 5827-5834.
99. Sedlak, R. H. & Jerome, K. R. (2013). Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75 (1): 1-4.
100. Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S. & Emslie, K. R. (2011). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical chemistry*, 84 (2): 1003-1011.
101. *Droplet digital PCR Application Guide*. Tilgjengelig fra: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6407.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf) (lest 05.10.2017).
102. Sozzi, G., Roz, L., Conte, D., Mariani, L., Andriani, F., Verderio, P. & Pastorino, U. (2005). Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *Journal of the National Cancer Institute*, 97 (24): 1848-1850.
103. El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F. & Thierry, A. R. (2013). Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, 424: 222-230.
104. Omland, T., Lie, K. A., Akre, H., Sandlie, L. E., Jebsen, P., Sandvik, L., Nymo, D. A., Bzhalava, D., Dillner, J. & Brøndbo, K. (2014). Recurrent respiratory papillomatosis: HPV genotypes and risk of high-grade laryngeal neoplasia. *PloS one*, 9 (6): e99114.
105. Andersson, E., Kärrberg, C., Rådberg, T., Blomqvist, L., Zetterqvist, B.-M., Ryd, W., Lindh, M. & Horal, P. (2011). Type-specific human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by real-time PCR improves identification of cervical neoplasia. *Journal of clinical microbiology*, 49 (11): 3794-3799.
106. Pyne, M. T., Hamula, C. L., Tardif, K., Law, C. & Schlaberg, R. (2015). High-risk HPV detection and genotyping by APTIMA HPV using cervical samples. *Journal of virological methods*, 221: 95-99.
107. Tadokoro, K., Akutsu, Y., Tanaka, K., Saito, T., Yamaguchi, T., Egashira, T., Ishiwata, I. & Hara, T. (2010). Comparative quantitative analysis of 14 types of human papillomavirus by real-time polymerase chain reaction monitoring Invader reaction (Q-Invader assay). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 66 (1): 58-64.
108. Kirrander, P., Kolaric, A., Helenius, G., Windahl, T., Andrén, O., Stark, J. R., Lillsunde-Larsson, G., Elgh, F. & Karlsson, M. (2011). Human papillomavirus prevalence, distribution and correlation to histopathological parameters in a large Swedish cohort of men with penile carcinoma. *BJU international*, 108 (3): 355-359.
109. Strain, M. C., Lada, S. M., Luong, T., Rought, S. E., Gianella, S., Terry, V. H., Spina, C. A., Woelk, C. H. & Richman, D. D. (2013). Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS one*, 8 (4): e55943.
110. Trypsteen, W., Kiselina, M., Vandekerckhove, L. & De Spiegelaere, W. (2016). Diagnostic utility of droplet digital PCR for HIV reservoir quantification. *Journal of virus eradication*, 2 (3): 162.

111. Cuevas, J. M., Geller, R., Garijo, R., López-Aldeguer, J. & Sanjuán, R. (2015). Extremely high mutation rate of HIV-1 in vivo. *PLoS biology*, 13 (9): e1002251.
112. Waggoner, S. E. (2003). Cervical cancer. *The Lancet*, 361 (9376): 2217-2225.
113. Rusnati M, L. D. (2016). Heparan Sulfate Proteoglycans: A Multifaceted Target for Novel Approaches in Antiviral Drug Discovery. *Bioengineer & Biomedical Science*, 6: 177.
114. Austgulen Westin, A., Larsen, R.-A., Arne Espnes, K. & Spigset, O. (2012). Legemiddelanalyser i Norge. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*, 132 (21): 2382.
115. Meneghetti, M. C., Hughes, A. J., Rudd, T. R., Nader, H. B., Powell, A. K., Yates, E. A. & Lima, M. A. (2015). Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *Journal of The Royal Society Interface*, 12 (110): 20150589.
116. Cerqueira, C., Liu, Y., Kühling, L., Chai, W., Hafezi, W., Kuppevelt, T. H., Kühn, J. E., Feizi, T. & Schelhaas, M. (2013). Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cellular microbiology*, 15 (11): 1818-1836.



## 8 Vedlegg

**Tabell V1: Primere og prober benyttet i studien.** Alle prober var merket 5'-FAM og/ eller HEX og 3'-BBQ (eller TAMRA, for HBB) Primere og prober for HPV er tidligere publisert av Lindh et al. <sup>79</sup>, med unntak av for HPV 42 og 73 som ble designet til bruk ved denne studien, og HBB publisert Saiki et al. <sup>88</sup>

Mål	Oligo	Sekvens	Prd.str
HPV 6	F	5' -RCGGTTYATAAAGCTAAATTGTACGT-3'	79 bp
	R	5' -AGGGTAACATGTCTTCCATGCA-3'	
	P*	5' -FAM/HEX-AAGGGTCGCTGCCTACACTGCTGG-BBQ-3'	
HPV 16	F	5' -TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA-3'	113 bp
	R	5' -GCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTG-3'	
	P	5' -FAM-AATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA-BBQ-3'	
HPV 18	F	5' -AGAGGCCAGTGCCATTCGT-3'	65 bp
	R	5' -ACTCCAACGACGCAGAGAAAC-3'	
	P*	5' -FAM/HEX-TCCTGTCTGCTCGGTTGCAGC-BBQ-3'	
HPV 31	F	5' -ATTCCACAACATAGGAGGAAGGTG-3'	76 bp
	R	5' -AGACCTCGTACTGAAACCCAAGTG-3'	
	P	5' -FAM-ACAGGACGTTGCATAGCATGTTGGA-BBQ-3'	
HPV 33	F	5' -ATATTTTCGGGTCGTTGGGCA-3'	74 bp
	R	5' -ACGTAGAGAACTGCACTGTGACGT-3'	
	P	5' -FAM-GGACCTCCAACACGCCGCACA-BBQ-3'	
HPV 42**	F	5' -TGTAAGGAATTTGGGCTGACAT-3'	74 bp
	R	5' -CTCTGCGCCTGTAAAGTGCT-3'	
	P*	5' -FAM/HEX-TTACAGATTTCTTGCATTTGGTGCAA-BBQ-3'	
HPV 45	F	5' -GGACAGTACCGAGGGCAGTGTA-3'	71 bp
	R	5' -GAAAGACTTCGCAGACGTAGGGA-3'	
	P*	5' -FAM/HEX-CATGTTGTGACCAGGCACGGCA-BBQ-3'	
HPV 51	F	5' -AAAGCAAAAATTGGTGGACGA-3'	80 BP
	R	5' -TGCCAGCAATTAGCGCATT-3'	
	P	5' -FAM-CATGAAATAGCGGGACGTTGGACG-BBQ-3'	
HPV 52	F	5' -GACATGTTAATGCAAACAAGCGAT-3'	105 bp
	R	5' -CATGACGTTACACTTGGGTCACA-3'	
	P	5' -FAM/HEX-TGTTTCAGAGTGTGGAGACCCCGACC-BBQ-3'	
HPV 58	F	5' -GGCATGTGGATTTAAACAAAAGGT-3'	121 bp
	R	5' -TCTCATGGCGTTGTTACAGGTTAC-3'	
	P	5' -FAM/HEX-TGGAGACCCCGACGTAGACAAACACAA-BBQ-3'	
HPV 73**	F	5' -GACAGACAAGCTGAACGAGAGTGTT-3'	92 bp
	R	5' -GCTTTGTTGCTTTCAATGGCA-3'	
	P*	5' -FAM/HEX-TGCACGAAGTGTGAGTGCACAGTATGCC-BBQ-3'	
HBB	F	5' -ACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTC-3'	110 bp
	R	5' -CCAACCTTCCACGTTTACCT-3'	
	P	5' -FAM-TGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGC-TAMRA-3'	

F = Forward primer, R = Revers primer, P = Probe. (R=A/G, Y=C/T) \*FAM-merkede prober ble benyttet til optimalisering av PCR, kloning, validering av deteksjonsgrense og screening med ddPCR, HEX-merkede prober ble benyttet til screening med qPCR.

**Tabell V2: Probesevens for hver klonede HPV-type.** Tabellen viser mismatch mellom klonet HPV-sevens og probe i qPCR assay. Mismatch er merket med rødt.

HPV	Probeområdet for hver klonet sevens
6	AAGGGTCGCTGCCTACACTGCTGG
16	AATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA
18	TCCTGTCGTGCTCGGTTGCAGC
31	ACAGGACGTTGCATAG <b>T</b> ATGTTGGA
33	GGACCTCCAACACGCCGCACA
42	TT <b>C</b> AGATTCCTGCATTTGGTGCAA
45	CATGTTGTGACCAGGCACGGCA
52	TGTTTCAGAGTGTTGGAGACCCCGACC
58	TGGAGACCCCGACGTAGACAAACACAA
73	TGCACGAAGTGTCAGTGCACAGTATGCC





Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway