



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet



Masteroppgave 2018 60 stp

# Sammenligning av molekylære metoder for genotyping av humant papillomavirus

Comparison of molecular methods for genotyping of human papillomavirus

Anette Lande

Mastergrad i molekylær bioteknologi  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap



## Forord

Denne oppgaven er skrevet ved molekylærbiologisk avdeling ved Folkehelseinstituttet (FHI) Jeg vil rette en stor takk til avdelingen for å gi meg mulighet til delta i et spennende prosjekt.

Spesielt vil jeg takke hovedveileder Einar S. Berg for et svært lærerikt år. Takk for god veiledning og at jeg alltid kunne komme innom kontoret med alle spørsmål. Videre vil jeg rette en stor takk til biveileder Kathrine Stene-Johansen for alle støtte gjennom året og ikke minst hjelpen i innspurten. Oppgaven ville ikke blitt det den er uten din bistand. Jeg ønsker også å takke resten av HPV-gruppa ved avdelingen for gode faglige diskusjoner. Takk til Lill-Iren Schou Trogstad for gode innspill til oppgaven. Virusavdelingen ved instituttet behøver også en takk for å ha tatt meg imot med åpne armer. Dere har bidratt til at året ved FHI har vært mer enn det faglige. Videre vil jeg takke hovedveileder ved NMBU Knut Rudi for å ha besvart alle mine spørsmål gjennom oppgaveskrivingen.

Avslutningsvis ønsker jeg å takke både familie og samboer for å ha støttet meg gjennom dette året, og holdt ut med meg i både opp- og nedturer. Til slutt vil jeg takke alle som har gjort mine fem år som student ved NMBU ubeskrivelig bra!

---

Anette Lande  
11.5.18  
Oslo

## Sammendrag

Vedvarende infeksjon av en høyrisiko genotype av humant papillomavirus (HPV) er en nødvendig forutsetning for utvikling av livmorhalskreft. I 2009 ble vaksinasjon mot viruset innført som en del av det norske barnevaksinasjonsprogrammet. For å undersøke effekten av vaksinen, skal de epidemiologiske forandringene av HPV i den norske befolkningen overvåkes. Denne oppgaven har til hensikt å sammenlikne molekylærbiologiske metoder for genotyping av HPV, samt å bestemme hvilken av oppgavens metoder som er best egnet for genotyping i prøver med multiple infeksjoner. Blandingsprøver av HPV 16 og HPV 18-plasmider samt 20 HPV-positive urinprøver fra norske uvaksinerte kvinner ble amplifisert med polymerase kjedereaksjon (PCR) med modifiserte generelle primere (MGP), før genotyping ved bruk av smeltepunktsanalyse, luminex-hybridiseringsteknologi, Sanger-sekvensering og nestegenerasjons sekvensering (NGS). PCR-reaksjonene for klargjøring til Sanger-sekvensering og bibliotekspreparering for NGS ble etablert og optimalisert ved bruk av HPV 16 og HPV 18 plasmider. Biblioteksprepareringen for NGS ble utført ved PCR-baserte metoder og ved ligeringsmetoder. Resultatene viser at multipleks PCR med MGP ikke er en optimal reaksjon, da enkelte genotyper amplifiseres med bedre effektivitet enn andre. Videre er smeltepunktsanalyse en uegnet genotypingsmetode da flere av genotypene har svært lik smeltetemperatur. Sanger-sekvensering klarer ikke å påvise multiple infeksjoner. Luminex-hybridisering påviser multiple infeksjoner, men ser ut til å ha dårlig reproducerbarhet. NGS påviste multiple infeksjoner og ser foreløpig ut til å gi de beste resultatene blant disse metodene. Foreløpige resultater indikerer at PCR-baserte metode for bibliotekspreparering er mer effektiv enn ligeringsmetode. NGS ble utført på MiSeq, Illumina, hvor henholdsvis 1 024 572 og 750 930 sekvenser generert fra HPV 16 og HPV 18 positive kontroller, ble genotypet til den gjeldende genotypen.



## Abstract

Persistent infection of a high-risk type of Human Papillomavirus (HPV) is a necessary cause for the development of cervical cancer. In 2009 a vaccine targeting the virus was introduced in the Norwegian childhood humanisation program. To investigate the effect of the vaccine, the epidemiological changes of HPV in the Norwegian population are being monitored. The aim of this thesis is to compare molecular biological methods for genotyping of HPV in order to identify which methods is best suited for genotyping in samples with multiple infection. Samples with a mix of HPV 16 and HPV 18 plasmids and urine samples from Norwegian unvaccinated women were amplified with polymerase chain reaction (PCR) by the use of Modified General Primers (MGP), before genotyping with high resolution melt analysis (HRM), Luminex hybridisation, Sanger sequencing and Next Generation Sequencing (NGS). The PCR reactions for preparing for Sanger sequencing and library preparations for NGS were designed and optimised by use of HPV 16 and HPV 18 plasmids. Library preparations for NGS were made by PCR-based and ligation methods. Results show that multiplex PCR with MGP is not an optimal reaction as some genotypes amplify with a better efficiency than others. HRM was found to be incapable of genotyping, as different genotypes have similar melting temperature. Sanger sequencing cannot detect multiple infections. The Luminex hybridisation system does detect multiple infections but has weak reproducing abilities. NGS detects multiple infections and appears to be the most successful of these methods for genotyping of HPV in samples with multiple infections. Preliminary results indicate that the PCR-based method is the most efficient method for NGS library preparations. NGS was run on MiSeq, Illumina, where respectively 1 024 572 and 750 930 sequences generated from HPV 16 and HPV 18 positive controls, mapped to the reference genome.



## Forkortelser

bp	Basepar
CIN	Cervical squamous intraepithelial neoplasia/plateepiteldysplasi
C <sub>t</sub> -verdi	Threshold cycle/terskelsyklus
dH <sub>2</sub> O	Destillert H <sub>2</sub> O
dt	Dobbeltrådet
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid / etylenediaminetetra eddiksyre
FHI	Folkehelseinstituttet
gDNA	Genomisk DNA
HPV	Humant papillomavirus
LCR	Long control region/lang kontrollerende region
ORI	Origin of replication/startsted for replikasjon
PCR	Polymerase chain reaction/polymerase kjedereaksjon
RCA	Rullende sirkelamplifisering/rolling circle amplification
PV	Papillomavirus
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction /kvantitativ polymerase kjedereaksjon
RPM	Rotations per minute/rotasjoner per minutt
S <sub>t</sub>	Smeltetemperatur
TE-buffer	Tris EDTA-buffer
VPL	Virus like particle / virusliknende partikkel
WHO	World health organization/verdens helseorganisasjon





# Innhold

Forord .....	II
Sammendrag .....	III
Abstract .....	V
Forkortelser .....	VII
1 Innledning.....	1
1.1 Humant papillomavirus .....	1
1.1.1 HPV infeksjon .....	3
1.1.2 Integrering av HPV i vertscellen og assosiasjon med celleforandring.....	4
1.1.3 Epidemiologi .....	6
1.1.4 HPV vaksine.....	7
1.1.5 Epidemiologisk overvåkning av HPV .....	8
1.2 Molekylær genotyping av HPV .....	8
1.2.1 Polymerase kjedereaksjon (PCR).....	8
1.2.2 Luminex-deteksjon.....	11
1.2.3 Sekvensering .....	13
1.3 Problemstilling.....	16
2 Materialer og metoder .....	19
2.1 Prøvemateriale .....	19
2.2 Metoder.....	19
2.2.1 PCR for amplifisering av en del av L1-genet i HPV.....	20
2.2.2 Luminex-analyse .....	21
2.2.3 Sanger-sekvensering.....	22
2.2.4 Nestegenerasjonssekvensering (NGS) .....	24
3 Resultater.....	29
3.1 Amplifisering av HPV med modifisert generelt primersett (MGP) .....	29
3.2 Luminex-analyse .....	30
3.3 Sanger-sekvensering .....	34
3.3.1 Optimalisering av forberedende PCR-reaksjoner .....	34
3.3.2 Sanger-sekvenseringsresultater .....	36
3.4 Nestegenerasjons sekvensering (NGS).....	38
3.4.1 Optimalisering av bibliotekpreparering.....	38
3.4.2 NGS sekvenseringsresultater.....	41
3.5 Sammenlikning av metodene.....	42
4 Diskusjon.....	45

4.1	MGP PCR og DNA-smeltepunktsanalyse .....	46
4.2	Luminex-hybridisering .....	47
4.3	Sanger-sekvensering .....	48
4.4	NGS .....	48
4.5	Fremtidig arbeid .....	49
5	Konklusjon .....	53
	Referanser.....	55
	Vedlegg .....	I

# 1 Innledning

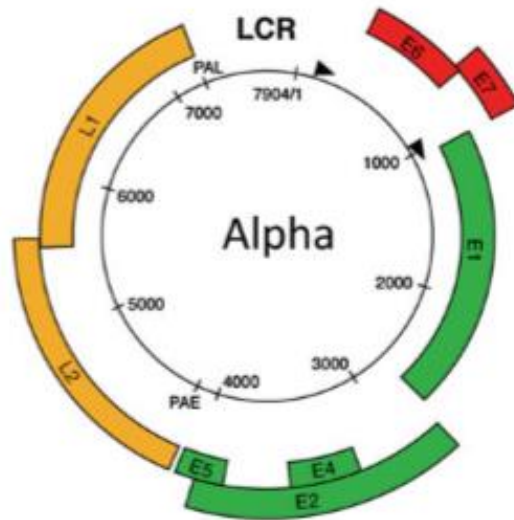
Humant papillomavirus (HPV) er en nødvendig forutsetning for utvikling av livmorhalskreft [3-6]. Viruset spres ved kontaktsmitte og er svært vanlig forekommende. Enkelte av virustypene smitter ved seksuell kontakt, og de fleste infiseres allerede ved seksuell debut. Over 90 % av infeksjonene fjernes spontant av kroppens immunforsvar. En studie fra 2016 av 1565 tilfeldige norske kvinner i alderen 21 år, viste at omkring 45 % var infisert med HPV [7]. Grunnet den sterke assosiasjonen mellom HPV-infeksjon og utvikling av livmorhalskreft, har HPV-vaksine blitt tilbudt alle jenter i 7. klasse som en del av det Norske barnevaksinasjonsprogrammet fra 2009. I 2016 ble vaksinen også tilbudt alle kvinner opp til 26 år i et midlertidig vaksinasjonsprogram ut 2018. Fra høsten 2018 tilbys HPV-vaksine også til gutter i 7. klasse. Gjennomsnittlig tar det 5-10 år fra initial HPV infeksjon til utvikling av forstadier til livmorhalskreft, og opptil flere tiår til utvikling av livmorhalskreft [8]. Den lange tiden fra HPV-smitte til eventuell utvikling av forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft, gjør det utfordrende å undersøke effekten av vaksinasjonsprogrammet. For å få et tidlig mål på effekten er det derfor hensiktsmessig å studere endringer i forekomst og genotypfordeling av HPV-infeksjon. Endringer i forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft, samt HPV-forekomst og genotypfordeling i disse, lar seg først studere noen år frem i tid. For å følge opp effekten av vaksinasjonsprogrammet er det ønskelig å overvåke effekten av vaksinasjon i befolkningen ved å se på endringer i forekomst av HPV-infeksjon i Norge før og etter innføring av vaksinen. Overvåkingen har siden 2011 bestått i å se på forekomsten av 37 ulike HPV-genotyper i urin fra 17- og 21-årige jenter. Urinprøver er analysert ved bruk av PCR i kombinasjon med Luminex-deteksjon. Påvisning av multiple HPV-genotyper i samme prøve kan være en metodemessig utfordring. Denne oppgaven har til formål å se på ulike deteksjonsmetoder med utgangspunkt i den samme PCR reaksjonen for påvisning på HPV, spesielt med tanke på multiple HPV-infeksjoner.

## 1.1 Humant papillomavirus

Papillomavirus (PV) er en egen virusfamilie, *papillomaviridae*, hvor det er identifisert over 330 ulike genotyper [9-11]. PV kan infisere både mennesker og dyr. Viruset har utviklet seg gjennom 350 millioner år for å infisere vertens epitelceller. Utvikling av virus over en så lang periode, gir normalt ikke kroniske eller fatale utfall for verten. På tross av forskjellig verter og sykdomsassosiasjoner har alle PV svært lik morfologi. PV har en icosahedral proteinkappe uten membran, og en partikkelstørrelse med diameter på 50-60 nm. Kappen er bygd opp av 360 molekyler av L1 proteinet, plassert i 72 forskjellige kapsomerer. Genomet er dobbeltrådet (dt) DNA med omkring 8000 basepar (bp), delt inn i 7 eller 8 åpne leserammer (ORF).

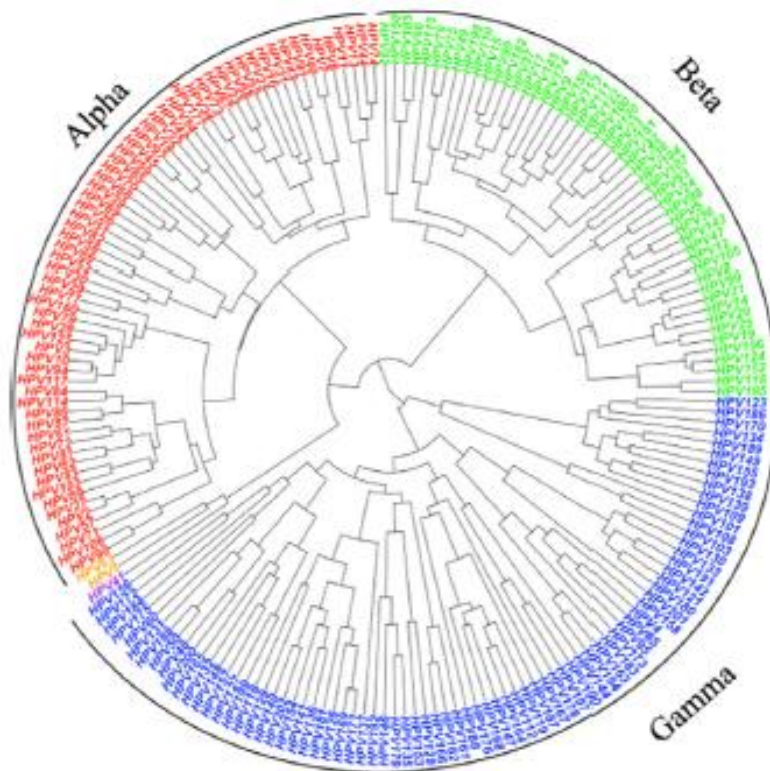
Gene til HPV kan deles inn i tidlige og sene gener, basert på plasseringen i virusets genom (Figur 1) [1]. De tidlige genene er navngitt med bokstaven E (for early) etterfulgt av numrene 1 til 7. De sene genene har fått bokstaven L (for late) og deles inn i L1 og L2. ORF E1, E2, L1 og L2 anses som godt konserverte gener, på kryss av alle papillomavirus, mens ORF E4, E5, E6 og E7 viser mer variasjon. Proteinene fra L1-genet har flere hypervariable aminosyresekvenser (looper), eksponert på utsiden av viruskappen [10, 12]. Disse loopene viser store variasjoner mellom genotyper og flankeres av aminosyresekvenser som er godt konserverte mellom genotypene. L1-genet med både konserverte og ikke konserverte DNA-

sekvenser kan benyttes for genotyping [1]. E6 og E7 genene er kreftfremkallende gener og er genotypespesifikke. Dermed kan også disse genene brukes for genotyping av HPV.



Figur 1: Organisering av genomet til høyrisikoslekten alfa. Posisjonen til de viktigste promotorene er merket med svarte piler. Den lange kontrollerende regionen (LCR) inneholder bindingssteder for transkripsjonsfaktorer, promotorelementer og startsteder for DNA-replikasjon (ORI). Figuren er opprinnelig laget av Doorbar et al [1].

Det finnes over 200 humane papillomavirus (HPV) [11, 13, 14]. Disse kan deles inn i fem slekter: alfa, beta, gamma, mu og nu. Slektenes deles videre inn i arter, genotyper, subtyper og varianter. Klassifiseringen er basert på likhet i DNA-sekvensen til det relativt konserverte L1-genet. Spesifikke genotyper har minst 10% forskjell i L1 sekvensen sammenliknet med andre genotyper, subtypene har 2 til 10 % forskjell og variantene har under 2 % forskjell [10, 14-16]. Det største antallet HPV-genotyper finnes i alfa, beta og gamma slektene (Figur 2). Alfasklekten inneholder genotypene som er assosiert med kreftutvikling. I overvåkingen av HPV-vaksinens effekt i befolkningen kartlegges HPV på genotypenivå.



Figur 2: Bayesian fylogenetisk tre av de 5 HPV-slektene. Dette fremstiller de 198 først identifiserte genotypene. Genotypene fremstilt i gult tilhører slekten mu, mens HPV 41 i lilla tilhører nu. Figuren er utviklet av Bzhalava et a. [11].

### 1.1.1 HPV infeksjon

På samme måte som flertallet andre PV, er de fleste HPV ikke til skade for mennesket, og det tar lang tid å utvikle sykdom relatert til HPV. Gjennom små rifter eller sår i huden infiserer viruset de basale stamcellene, for å utnytte verten sin celledelingsmekanisme.

Basert på genotypens potensiale for kreftutvikling, kan HPV deles inn i lavrisiko (LR) og høyrisiko (HR) genotyper. LR genotypene finnes normalt på huden hos mennesket, hvor de som regel kun gir asymptomatiske infeksjoner, eller hud- og kjønnsvorter [1, 15]. HPV 6 og HPV 11 er eksempler på genotyper som kan gi kjønnsvorter [10]. Et mindretall av genotypene er klassifisert som høyrisiko basert på deres onkogene potensiale [11]. Disse genotypene er seksuelt overførbare, og infiserer epitelceller analt, i munn, svelg og pusterør, samt i penis hos menn og livmorhalsen hos kvinner. Penisinfeksjon kan i sjeldne tilfeller utvikles til peniskreft. Den sterkeste assosiasjonen mellom HPV-infeksjon og kreftutvikling er ved infeksjon i livmorhalsen til kvinner. HPV 16 er genotypen som oftest detekteres ved celleforandringer i livmorhalsen, dernest HPV 18 [6, 17, 18]. Omkring 70 % av alle tilfellene av livmorhalskreft skyldes infeksjon av en av disse to genotypene [8, 13, 19]. Sammenhengen mellom utvikling av kreft og antall viruskopier per celle er tilnærmet proporsjonal for HPV 16, noe som ikke bestandig ser ut til å være tilfellet for HPV 18 [20, 21]. På tross av at HPV-infeksjon er nødvendig for utvikling av livmorhalskreft, gir ikke alle infeksjoner av en HR genotype ondartede celleforandringer [8, 10]. Mindre enn 10 % av alle HPV-infeksjoner i livmorhalsen blir vedvarende og kan føre til forstadier til kreft og kreft, og over 90 % av infeksjonene

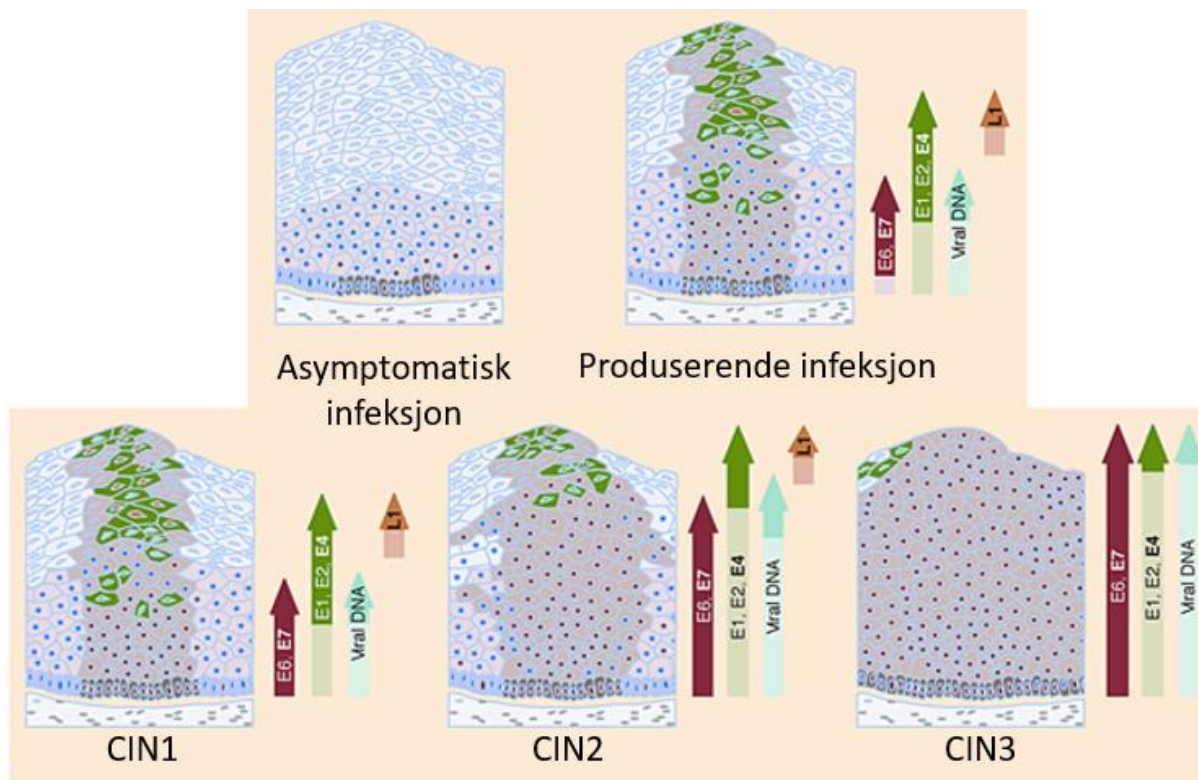
fjernes spontant av kroppens immunforsvar [8, 17]. Ved økt varighet av infeksjonen er det vanskeligere for kroppens immunforsvar å fjerne viruset [8, 22].

Premaligne tilstander, celleforandringer eller forstadier til kreft, finnes i både plateepitel og i sylinderepitel som forstadier til henholdsvis plateepitelcarcinom og sylinderepitelcarcinom [1]. Celleforandringene er basert på histologiske diagnoser. Cervical intraepitelial neoplasi (CIN) brukes synonymt med *plateepiteldysplasi*. Celleforandringene klassifiseres etter alvorlighetsgrad. CIN1 vurderes som lavgradig; CIN2, CIN3 og adenocarcinoma in situ (AIS) som høygradig dysplasi. Hos kvinner med CIN1 påvises HPV infeksjon hos 50-70 %. Omkring 85 % av kvinner med CIN2 har påvisbar HPV-infeksjon, mens ved CIN3 og fullstendig utviklet kreft påvises HPV i vevsprøver fra 90-100 % av kvinnene.

### 1.1.2 Integrering av HPV i vertscellen og assosiasjon med celleforandring

HPV i epitelcellene i livmorhalsen, kan være både i episomal form og/eller integrert form [17]. Ved en episomal form beholdes virusets genom i lukket sirkulær form, og replikeres uavhengig av replikasjonene til vertscellens DNA. Ved integrert form, der virusets og vertens genom har blitt spleiset sammen til ett DNA-molekyl, replikeres virusets DNA når vertscellens DNA replikeres.

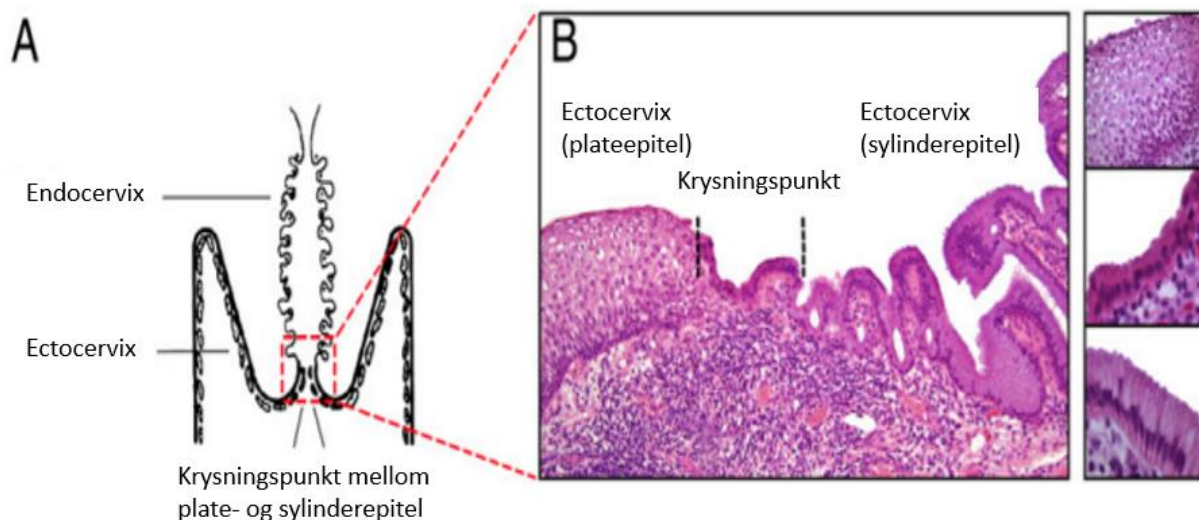
Integrering av virusets genom i vertens epitelcellegenom, øker alvorlighetsgraden av celleforandringer i livmorhalsen [17]. Dette gjelder spesielt for HPV 18, hvor CIN3 og aggressiv kreft tilnærmet alltid påvises sammen med integrert virus. Integrering krever konformasjonsforandringer i virusets kapsid, som innebærer at L2 proteinet relokaliseres fra innsiden til utsiden av kapsidet og videre kløyves av epitelcellens furinprotein [1]. Integrering ødelegger E2 genet som resulterer i bortfall av negativ tilbakemelding til E6 og E7 genene. Dermed økes uttrykket av E6 og E7, som er en nødvendighet for utvikling av kreft, slik som fremstilt i Figur 3. Ved høygradig celleforandring avtar produksjonen av nye viruspartikler.



Figur 3: Utvikling i epitelcellene til verten fra asymptomatisk- til produserende infeksjoner før utvikling av CIN1 og forstadiene til kreft (CIN2 og 3). De mørke fargene i de vertikale pilene samsvarer med fargen på cellekjernene, og viser hvor i det flercellede epitellaget proteinene uttrykkes. Den blå pilen viser hvor viruset utfører DNA replikasjon. Ved asymptomatisk infeksjoner forblir virusgenomet i de basale cellelagene, eventuelt kan det utvikles en produserende infeksjon hvor nye viruspartikler dannes i de øverste cellelagene. Ved CIN1 holdes virusets genuttrykk under kontroll, og replikasjonsproteinene E1, E2 og E4 er spesielt viktige. Ved CIN2 og CIN3 uttrykkes E6 og E7 sterkere og lengre opp i cellelagene. I disse stadiene blir det uttrykt mindre av kapsidproteinene L1. For utvikling av kreft kreves konstant uttrykk av E6 og E7, slik som vist i CIN3. Figuren er opprinnelig laget av Doorbar et al [1].

Omkring 85% av tilfellene av livmorhalskreft oppstår med utgangspunkt i infeksjon i transformasjonssonen i livmorhalsen, hvor sylinderepitelceller møter plateepitelceller i et krysningspunkt, slik som vist i Figur 4 [2]. Infeksjon i dette området gir viruset tilgang til basale stamceller hvor celledeling skjer. Under celledelingen kan HPV infisere nukleus i epitelcellene [1]. Gjennomsnittlig tar det 5-10 år fra initial HPV infeksjon til utvikling av forstadier til livmorhalskreft, og opptil flere tiår til utvikling av livmorhalskreft [8].





Figur 4: Flertallet av vedvarende HPV-infeksjoner skyldes infeksjon i krysningspunktet mellom plateepitel- og sylinderepitelceller, hvor viruset infiserer de basale cellelagene under celledeling. A: Skjematisk fremstilling av livmorhalsen. B: Vevsprøve av livmorhalsen, med plateepitel (øverst), krysningspunkt (midten) og sylinderepitel (nederst). Figuren er opprinnelig laget av Herfs et al. [2].

### 1.1.3 Epidemiologi

Omkring 40 HPV-genotyper kan infisere kjønnsorganene, hvor mellom 12 og 15 av disse genotyper klassifiseres som høyrisiko basert på deres assosiasjon med utvikling av livmorhalskreft [7, 10, 17, 19, 23, 24]. Videre klassifiseres 3 genotyper som «sannsynlig høyrisiko» og 7 som «mulig høyrisiko». På verdensbasis blir flertallet av kvinner infisert allerede ved seksuelle debut. Prevalensen av HPV er høyest hos kvinner i 25-års alderen. Nest høyest prevalens finnes hos kvinner mellom 40 og 55 år (det er noe variasjon mellom verdensdelene) som er aldersgruppen hvor livmorhalskreft er hyppigst [25, 26]. HPV-infeksjoner er vanligvis forbigående, men kan gi en latent infeksjoner. Det er usikkert hvorvidt den økte prevalensen i eldre aldersgrupper skyldes senket immunforsvar [27, 28], genetikk [29, 30] eller andre årsaker/risikofaktorer [31].

På verdensbasis er livmorhalskreft den nest mest vanlige krefttypen hos kvinner [3, 6, 24]. Årlig påvises omkring 530 000 nye tilfeller av livmorhalskreft og rundt 275 000 kvinner dør som en følge av sykdommen [10]. Mer enn 85 % av disse dødsfallene skjer i utviklingsland hvor dette er den mest utbredte krefttypen blant kvinner, og hvor kvinnene sjeldent undersøkes gynekologisk for celleforandringer. I USA påvises tilnærmet 50 % av alle tilfellene av livmorhalskreft i kvinner som aldri tidligere er undersøkt for celleforandringer, og ytterligere 10% av krefttilfellene finnes hos kvinner som ikke er undersøkt med celleprøve fra livmorhalsen de siste 5 år. Negative tanker om egen kropp, etniske og/eller religiøse grunner samt frykt for smertefull undersøkelse og manglende informasjon er trolig medvirkende faktorer for at disse kvinnene ikke lar seg undersøke [32].

I to tverrsnittsundersøkelser gjennomført i 2011 og 2013 ble HPV påvist i urinprøver hos henholdsvis 20% og 15 % av ikke-vaksinerte norske 17-årige kvinner [7]. Blant disse HPV-

positive kvinnene hadde henholdsvis 50 % og 52 % infeksjon med en høyriskotype, 31 % og 37 % hadde en infeksjon med genotypene HPV 6, HPV 11, HPV 16 eller HPV 18 og henholdsvis 39 % og 46 % hadde multiple infeksjoner. Tverrsnittundersøkelse av ikke-vaksinerte 21-årige kvinner viste at omkring 45 % hadde HPV infeksjon, hvorav 66 % var smittet med høyriskotyper, 36 % med genotypene HPV 6, HPV 11, HPV 16 eller HPV 18 og 58 % hadde multiple infeksjoner. Forekomsten av HPV var signifikant høyere ( $p < 0,001$ ) hos 21-åringene sammenliknet med 17-åringene, noe som kan forklares med økt antall seksualpartnere hos den eldre aldersgruppen. HPV 16 og/eller HPV 18 ble funnet i omtrent halvparten av alle kvinnene som var positive for en høyrisiko genotype.

#### 1.1.4 HPV vaksine

HPV svekker immunresponsen i livmorhalsen, særlig gjennom undertrykking av langerhanscellene og immuniteten etter naturlig infeksjon er dårlig [33, 34]. Det er derfor mulig å bli smittet av samme HPV-genotype flere ganger. Vaksiner inneholder i tillegg til antigen mot to eller flere HPV genotyper, det immunstimulerende stoffet adjuvans. Vaksinene gir derfor både en lokal og systemisk inflammasjon og gir en kraftigere immunrespons enn naturlig infeksjon. HPV-vaksinene er laget av virusliknende partikler (VLP) dannet av L1-kapsidprotein, som fører til antistoffrespons i verten. Vaksinene virker kun forebyggende mot HPV-infeksjon, og har ingen terapeutisk effekt for pågående HPV-infeksjoner. Det er likevel ikke farlig å gi vaksinen til en person som har en HPV-infeksjon. Vaksinasjon kan beskytte mot infeksjon med eventuelle andre genotyper, og mot gjentatt smitte med samme genotype senere. HPV-vaksine har best effekt når den gis til unge kvinner og menn som ikke tidligere har vært eksponert for HPV-infeksjon, men kan gis til alle uavhengig av smittestatus ved vaksinasjonstidspunktet.

Vaksinen Gardasil® som beskytter mot HPV 6, HPV 11, HPV 16 og HPV 18 ble innført i det Norske barnevaksinasjonsprogrammet i 2009 og ble benyttet frem til høsten 2017. Fra høsten 2017 har vaksinen Cervarix® som beskytter mot HPV 16 og HPV 18, blitt benyttet. Høsten 2016 startet et 2-årig opphentingsprogram hvor kvinner født i 1991 eller senere ble tilbudt Cervarix®. Fra og med høsten 2018 skal den tovalente vaksinen også tilbys gutter i 7. klasse. Både Gardasil® og Cervarix® reduserer hyppigheten av HPV 16 og HPV 18 med over 90 % i kvinner som ikke tidligere er infisert med disse virustypene [23]. Denne HPV beskyttelsen er vist til å vare i minst 10-12 år [35, 36].

Begge vaksinene har i randomiserte studier vist høy beskyttelse mot HPV 16 og HPV 18 relatert infeksjon og høygradige lesjoner i livmorhalsen (> 90%). Cervarix® har dokumentert 93% beskyttelse mot CIN3+ uavhengig av HPV-genotype [36]. Tilsvarende beskyttelse for Gardasil® er 43% [35]. Den relativt høye beskyttelsen for Cervarix® skyldes kryssbeskyttelse mot HPV 31/33/45. En studie blant jenter vaksinert med Cervarix® som 12-åringer, viser 89 % beskyttelse mot infeksjon med HPV 16 og HPV 18, høy kryssbeskyttelse mot HPV 31/33/45 (henholdsvis 94%, 79%, 83%) og høy beskyttelse mot alle fem HPV-typer hos uvaksinerte jenter, som uttrykk for flokkbeskyttelse [36]. Studien ble gjort 7,5 år etter vaksinasjon. Skotske data viser også 94% reduksjon i CIN3+ uavhengig av HPV-type [37].

### 1.1.5 Epidemiologisk overvåkning av HPV

Den epidemiologiske overvåkingen av HPV har til hensikt å undersøke om vaksinasjonen har endret forekomst av HPV og HPV-genotyper som sirkulerer i befolkningen. Herunder hvorvidt vaksinerne har gitt kryssbeskyttelse mot andre HPV-genotyper enn de som er i vaksinen, og om eliminering av enkelte genotyper som følge av vaksinebeskyttelse har gitt en økning i andre genotyper, såkalt replacement. I overvåkningsammenheng er det ønskelig å undersøke kvinnene så tidlig som mulig etter seksuell debut. Derfor er 17-åringer valgt ut. Etersom kvinner i denne aldersgruppen er for unge til å omfattes av den regulære masseundersøkelsen mot livmorhalskreft, brukes urinprøver for å overvåke forekomsten av HPV hos unge kvinner. For å kunne se på endring i forekomsten av HPV er det nødvendig å undersøke HPV i den uvaksinerte delen av befolkningen, før vaksinen ble introdusert, og sammenlikne mot den vaksinerte delen. Sammenlikning av HPV-forekomsten mellom disse to gruppene gjør det mulig å måle effekten av HPV-vaksinasjonsprogrammet.

## 1.2 Molekylær genotyping av HPV

Det er utviklet en rekke ulike molekylære metoder for karakterisering av HPV genotyper. De fleste er utviklet for kliniske formål og brukes på DNA ekstrahert fra væskebaserte celleprøver fra livmorhalsen. Derimot er det utviklet færre metoder for overvåkningsarbeid, til bruk på urinprøver. De fleste overvåkningsmetoder baseres på en multipleks PCR etterfulgt av en hybridisering. De ulike teknikkene har sine fordeler og ulemper. De påfølgende avsnittene forklarer teorien til enkelte av de mulige metodene for genotyping av HPV.

### 1.2.1 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

I klinisk diagnostikk er PCR en vanlig metode for påvisning av virus, da den er sensitiv, har stort målområde og er rask. Etersom det finnes svært mange forskjellige HPV-genotyper er det derimot vanskelig å designe primere som kan detektere alle genotypene. For effektiv PCR primerhybridisering trengs mål DNA-sekvenser som er konserverte på kryss av genotypene. For videre HPV-genotyping trengs genotypespesifikke sekvenser.

PCR amplifiserer DNA ved en syklisk prosess. Først varmes reaksjonsblandingen til 95 °C for å denaturere dt DNA til enkeltrådig templat-DNA. Deretter senkes temperaturen til mellom 40 °C og 70 °C slik at primerne kan hybridisere til templatet. Temperatur for hybridiseringen er avgjørende for spesifikk binding av primerne og eventuell dannes av bireaksjoner. Når primerne er bundet kan DNA-polymerasen syntetisere ny revers komplementær DNA tråd videre fra primeren. Nukleotider kobles på 3'hydroksylgruppen på ribosen i enden av hver primer som dermed forlenges. Bestemt temperatur under elongeringen avhenger av hvilken polymerase som benyttes, men ligger normalt rundt 72 °C [38]. Utbytte av DNA øker eksponentielt etter formelen  $y = (1 + \text{effektivitet})^n$  hvor y utbytte, n er antall PCR-sykluser og effektiviteten er et tall mellom 0 og 1 (0-100 %) [39].

### 1.2.1.1 Sanntids-PCR (real time PCR)

I sanntids-PCR måles økningen av PCR produkt samtidig som det dannes. Bruk av forskjellige fluoriserende forbindelser for å monitorere PCR skiller forskjellige varianter av sanntids-PCR. De to mest vanlige variantene er: (i) Ikke sekvensspesifikke dt DNA-bindende fluoriserende molekyler, og (ii) sekvensspesifikke fluoriserende prober.

I en sanntids-PCR maskin er det en lyskilde, gjerne en laser, som avgir lys med bestemt bølgelengder som kan eksitere fluoriserende forbindelser. Når forbindelsene går fra eksitert tilstand til normalt tilstand frigis lys. Denne emisjonen gir et fluoriserende signal som måles av en sensor i maskinen.

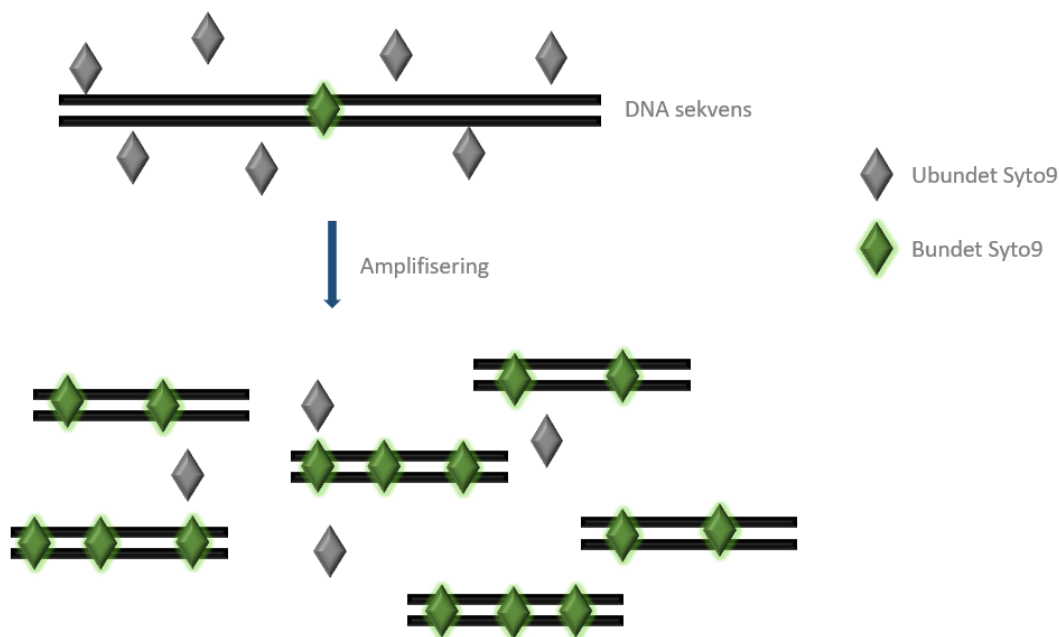
Når DNA amplifiseres i PCR øker det fluoriserende signalet proporsjonalt med økningen av DNA. Imidlertid, i de første PCR syklusene er mengden DNA lav slik at det avgitte fluoriserende signalet ikke er sterkt nok til å skilles fra bakgrunnsstøyen. Ved tilstrekkelig amplifikasjon øker signalet til et nivå som kan detekteres. Syklusnummeret hvor det fluoriserende signalet tydelig overgår bakgrunnsstøyen defineres som «threshold cycle» ( $C_t$ ). I prøver med store mengder templat DNA behøves et lavt antall PCR-sykluser (lav  $C_t$ -verdi) for å få et signal, mens prøver med lav DNA mengde krever flere sykluser (høy  $C_t$ -verdi) for å gi et tydelig signal.

Antall syntetiserte DNA-molekyler (kopier) estimeres ved bruk av en standardkurve, som gir en kvantitativ PCR (qPCR). En standardkurve lages ved å amplifisere en fortynningsrekke av en prøve med kjent konsentrasjon. Ved å plote  $C_t$ -verdien til fortynningsprøvene mot de kjente konsentrasjonene dannes en 1-grad linjefunksjon som benyttes til å lese av antall DNA-kopier i de ukjente prøvene.

### 1.2.1.2 Ikke sekvensspesifikke dt DNA-bindende fluoriserende molekyler

Enkelte fluoriserende forbindelser, som for eksempel EvaGreen®, SYBR®Green og SYTO®9 har lav fluorescens når stoffet fritt i løsning, men viser høy fluoriserende intensitet når det er bundet til dt DNA. Denne dt DNA bindingen er ikke-sekvensspesifikk (Figur 5) [40].

Bruk av dt DNA bindende molekyler gir mulighet for å utføre DNA smeltepunktanalyser av PCR produktene. Herved kan eventuelle forskjeller i nukleinsyresekvensen mellom i PCR-produkter eller dannelse av uønskede biprodukter som for eksempel primer-dimere, påvises. En sekvensspesifikk smeltekurve lages ved å smelte dt DNA til enkeltrådig, ved å øke temperaturen i reaksjonen. Den påfølgende nedgangen av det fluoriserende signalet plottes mot økningen i temperatur. Desto flere hydrogenbindinger som er i dt DNA, jo mer energi behøves for å separere de to trådene. Ettersom guanin (G) og cytosin (C) danner basepar holdt sammen av tre hydrogenbindinger, mens adenin (A) og thymin (T) baseparet har to slike bindinger, er G-C paret mer stabilt enn A-T paret. Derfor kreves det mest energi for å separere G-C baseparene. Med flere hydrogenbindinger kreves det høyere temperatur for å smelte lengere DNA sekvenser enn kortere. Smeltetemperaturen ( $S_t$ ) defineres som midten av temperaturintervallet, hvor halvparten av dt DNA i prøven er smeltet til enkeltrådig DNA. For å tydeliggjøre  $S_t$  plottes det negative førstederivatet av smeltekurven [40].

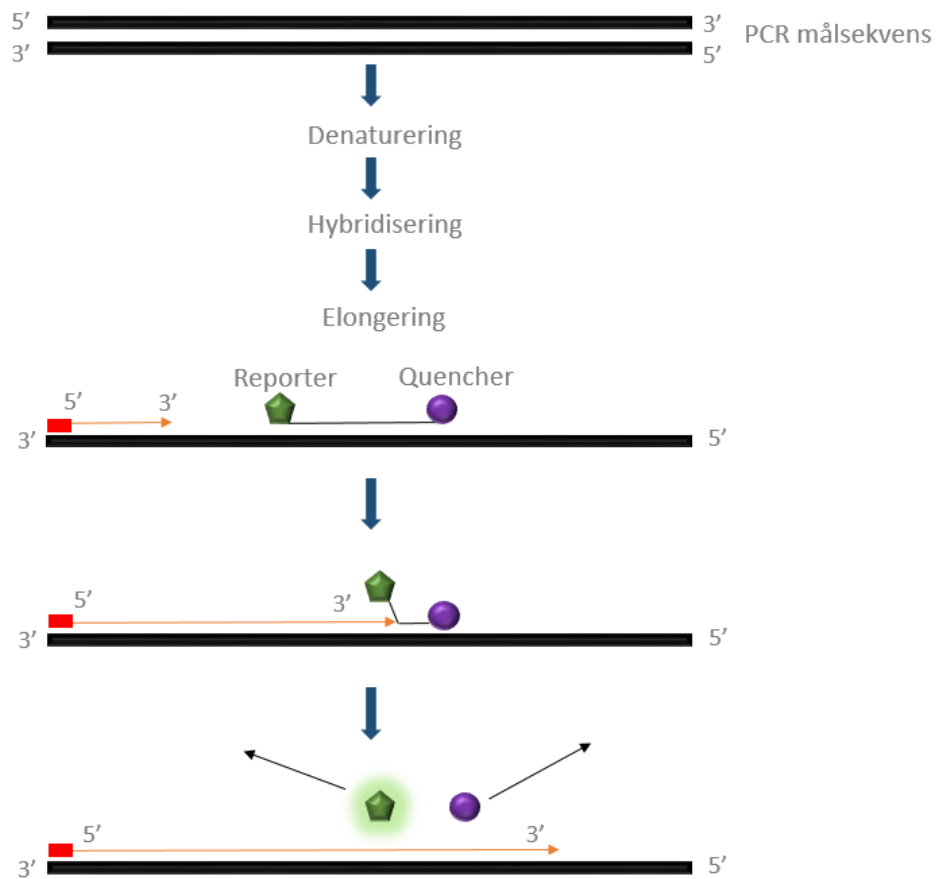


Figur 5: Sanntids-PCR ved bruk av DNA-bindende fluoriserende molekyler, som for eksempel SYTO®. Intensiteten av fluorescensen øker proporsjonalt med økningen av DNA molekyler.

### 1.2.1.3 Sekvensspesifikke fluoriserende prober

For å bestemme økning i mengde av en bestemt DNA-sekvens, kan sekvensspesifikke prober merket med et fluoriserende reportermolekyl på 5'-ende av sekvensen (TaqMan prober) benyttes. På 3'-enden settes det på et «undertrykker» molekyl, ofte kalt quencher. Ved belysning med riktig bølgelengde eksiteres reportermolekylet. Dersom TaqMan proben er intakt vil det være kontakt mellom reporter og quencheren slik at quencheren absorberer energien fra det eksiterte reportermolekylet og det frigis ikke fluoriserende signal. Når reporter og quencher ikke henger sammen kan reporteren avgi sitt fluoriserende lys (Figur 6).

I PCR-reaksjonen hybridiserer først TaqMan proben, deretter primeren til templatet, før DNA-polymerasen starter forlengelsen av primeren. Polymerasen har 5'-3'-exonukleaseaktivitet som ved kontakt med proben kløyver den, slik at quencheren skilles fra reportermolekylet. Reportermolekylet avgir dermed fluorescens. På denne måten er det bare spesifikk hybridisering av proben til sin sekvens, samt syntetisering av denne sekvensen, som gir økning i fluorescens. Ved å benytte forskjellige prober merket med forskjellige reportermolekyl som avgir lys med ulik bølgelengde når de blir eksitert, kan metoden påvise flere målsekvenser samtidig i såkalt multipleks PCR.

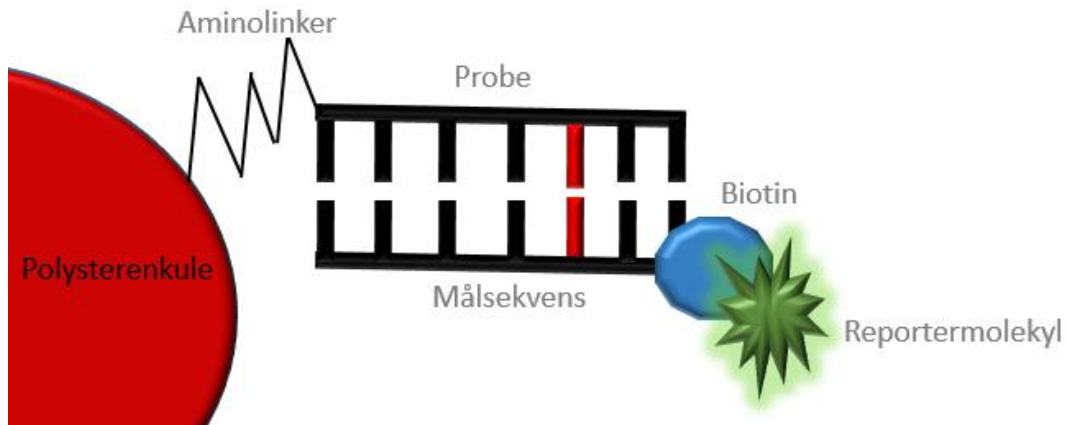


Figur 6: Sanntids-PCR ved bruk av sekvensspesifikke prober, som for eksempel Taq Man. Etter denaturering av dt DNA hybridiserer primeren (rød firkant) og den sekvensspesifikke proben (svart tynn sterk) til templatet. Ved elongering av ny komplimentær DNA tråd benytter polymerasen sin exonuklease til å kløyve reporteren fra quencheren. Dette avgir fluoriserende signal

### 1.2.2 Luminex-deteksjon

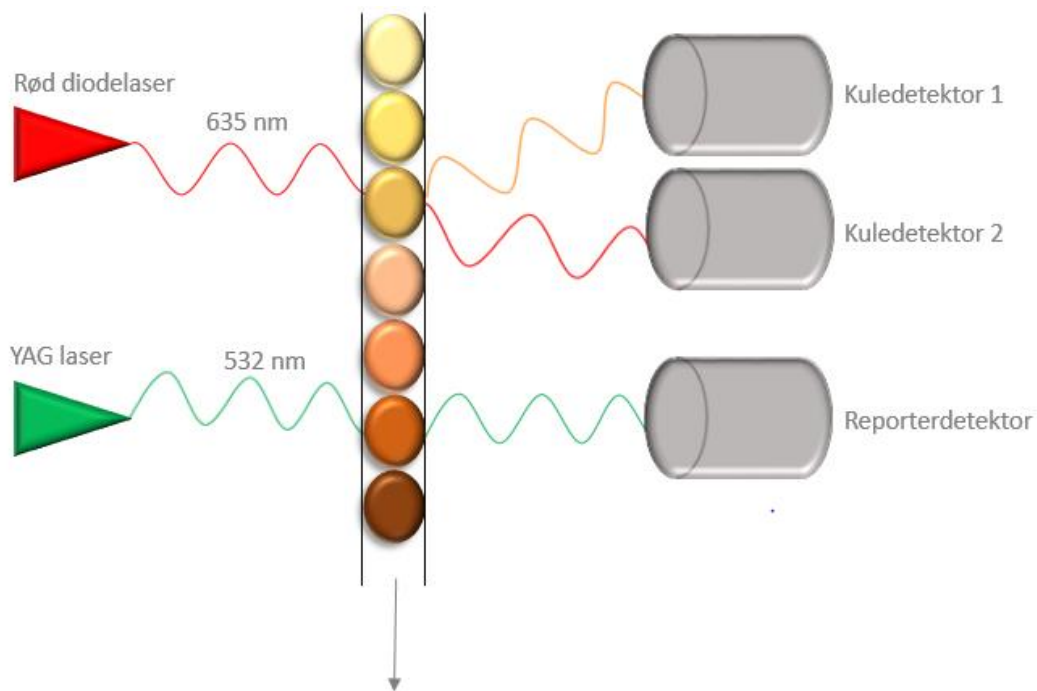
Luminex-deteksjon kan brukes til både nukleinsyre- og proteinbaserte analyser, ved bruk av flowcytometri [24]. For påvisning og genotyping av HPV benyttes nukleinsyreanalysen. Metoden er utviklet ved verdens helseorganisasjon (WHO) referanselaboratoriet for HPV for deteksjon av 37 ulike HPV-genotyper. Denne metoden har siden 2011 blitt benyttet for epidemiologisk overvåkingen av HPV i Norge.

Polystyrenkuler med en diameter på 5,6  $\mu\text{m}$  er dekket med karboksylgrupper. Denne svært reaktive kjemiske gruppen binder til ønsket DNA-probe (antistoff for proteinsanalyser) via en amin linker, i en prosess som kalles kobling. For nukleinsyrebaserte metoder hybridiserer proben til en komplimentær DNA/RNA-sekvens i prøven. Prøvens nukleinsyresekvens er merket med biotin, som binder til et reporter-molekyl (Figur 7).



Figur 7: Den reaktive karboksylgruppen på polystyrenkule binder til aminolinker. Videre kobles aminolinker til proben som hybridiserer med den DNA/RNA sekvensen i prøven. Prøvematerialet er tilsatt biotin hvor reportermolekylet binder.

Videre er kulene dekket med forskjellige mengde av to fluoroforer der den ene avgir lys med bølglengde på 658 nm og den andre 712 nm [41, 42]. Systemet tillater at kuler kan merkes med 100 forskjellige unike sammensetninger av disse fluoroforene, som gir mulighet for utførelse av 100 forskjellige analyser i en reaksjon (multipleksing) [43, 44]. I et flowcytometer belyses kulene av rød diodelaser med bølglengde på 635 nm som eksiterer de to fluoroforene og avgir lys med unik bølglengde for alle kulene, basert på sammensetningen av de to fluoroforene til kule. En yttrium aluminium garnet (YAG) laser avgir lys med bølglengde på 532 nm, som eksiterer reportermolekylet, hvis det er tilstede (Figur 8).



Figur 8: Luminex-teknologien. Polystyrenkulene beveger seg gjennom et rør, ved hjelp av en væskestrøm. En rød diodelaser belyser kulene med en bølglengde på 635 nm. Det eksiterte lyset har en bestemt bølglengde, avhengig av sammensetningen av fluoroforer på kulene. Kulene emitterer rødt og oransje lys, som detekteres av to lasere. Videre eksiteres reportermolekylet ved 532 nm, av en YAG laser. Det emitterte lyset detekteres en reporterdetektor. Sammensetning av fluoroforene på kulens overflate blir detektert for alle kulene. Hvis reporterdetektoren ikke detekterer noe reportermolekyl, utelukkes disse kulene fra videre analyser. Basert på sammensetningen av probe og kule bestemmes det hvilken DNA-sekvens som er tilstede i prøven.

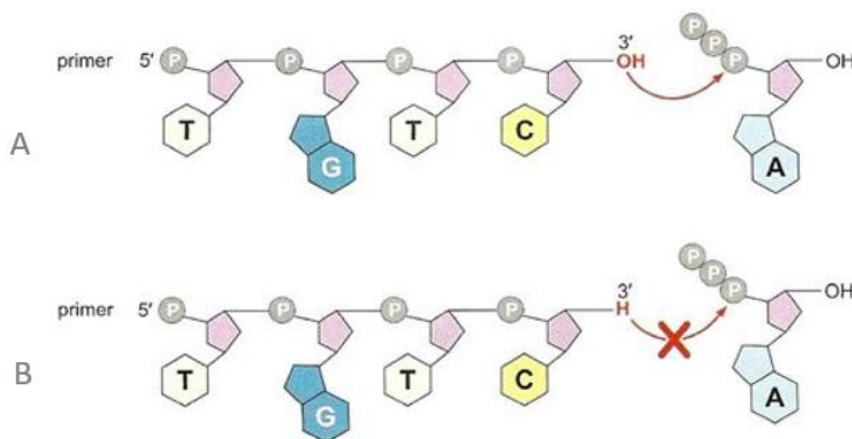
## 1.2.3 Sekvensering

### 1.2.3.1 Sanger-sekvensering

Sanger-sekvenseringsmetode ble funnet opp på midten av 1970-tallet og benyttes for å få frem DNA-sekvens [45]. Ettersom DNA-sekvensen til L1-genet av HPV er 10 % forskjellig på kryss av genotypene kan sekvensen brukes for å bestemme genotype.

Teknikken benytter en termostabil DNA-polymerase for kopiering av prøvens DNA. Enzymet starter polymeriseringen fra en hybridisert sekvenseringsprimer. I en konkurrerende reaksjon inkorporeres «normale» nukleotider (dNTP) og nukleotider hvor hydroksylgruppen i 3' posisjon på ribosen i nukleotidet er fjernet, såkalt 3' dideoksynukleotider (ddNTP).

Inkorporering av ddNTP gjør det umulig å inkorporere flere nukleotider til den voksende DNA-tråden. Dermed stanses videre syntetisering (Figur 9). De fire forskjellige ddNTP'ene merkes med fire forskjellige fluoriserende forbindelser, som avgir lys av ulike bølgelengder [38]. Prøven gjennomgår sykliske temperaturforandringer, liknende som i PCR, for syntetisering av mange DNA-fragmenter av forskjellige lengder, som alle ender med en fluoriserende ddNTP. I en kapillær elektroforese med polyakrylamidgel, vandrer de negativt ladede DNA-sekvensene mot den positive polen. Korte DNA-fragmentene beveger seg raskere enn de lengre. På denne måten separeres oligonukleotidene basert på lengde. Polyakrylamidgel elektroforese kan separere DNA fragmenter ned til en enkelt baseforskjell. Etter at fragmentene er separert i gelen analyses DNA for fluoresens. Bølgelengden på signalet tilsier hvilken av de fire basene som ble inkorporert i form av dideoksynukleotid. Rekken av de fire typene signal angir DNA sekvensen.



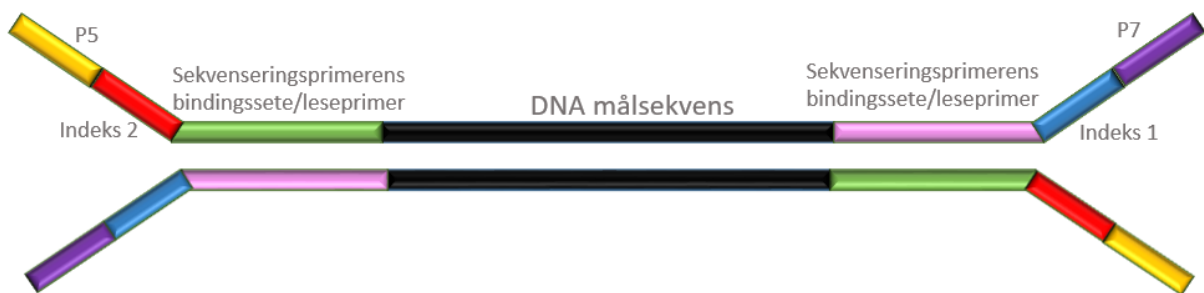
Figur 9: Ved Sanger-sekvensering brukes dideoksynukleotider, hvor hydroksylgruppen i 3' posisjon i nukleotiden er fjernet. A: Inkorporering av nukleotider med hydroksylgruppe i 3' posisjon (dNTP), gir muligheter for videre syntetisering av DNA. B: Inkorporering av nukleotider som mangler hydroksylgruppen i 3' posisjon (ddNTP) stanser videre syntetisering. Figuren er fra boken "molecular biology of the gene" [38].



### 1.2.3.2 Nestegenerasjons sekvensering (NGS)

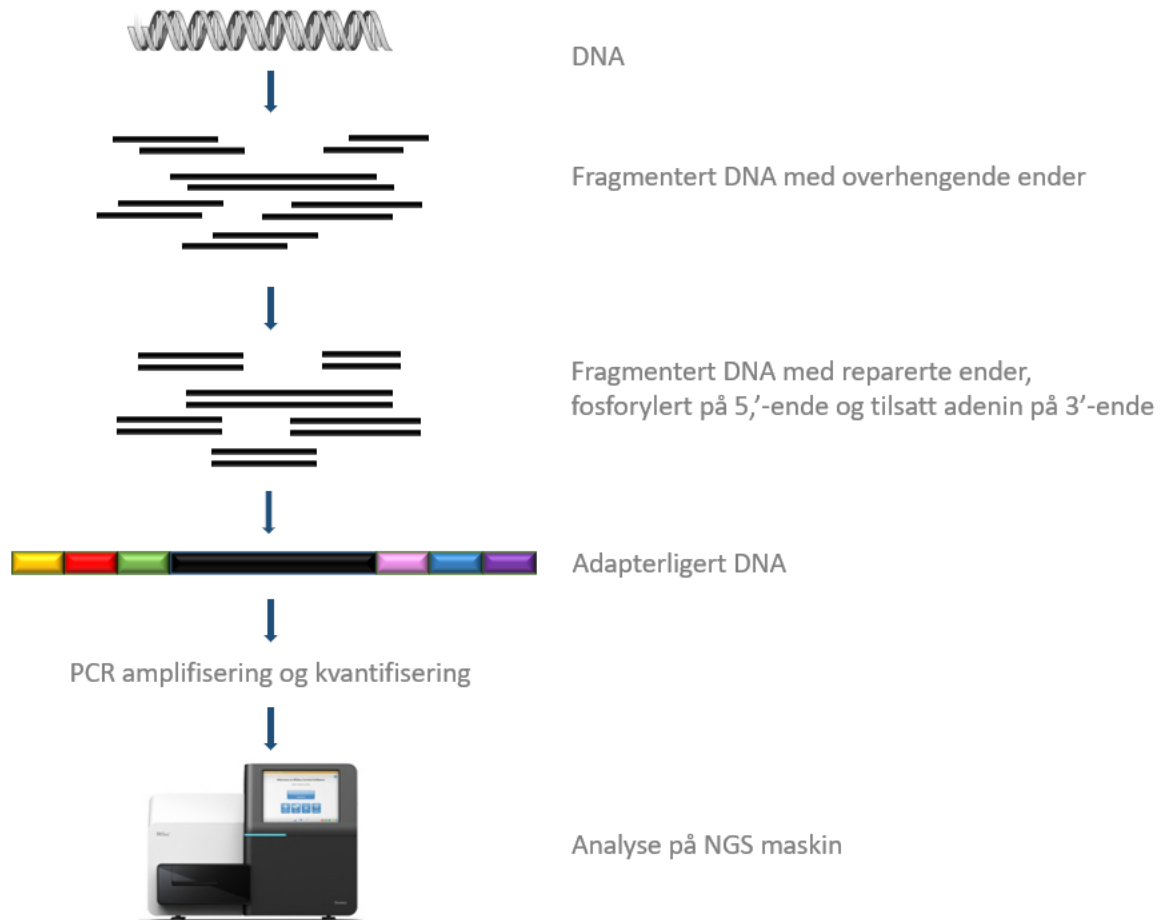
Slik som ved Sanger-sekvensering kan NGS bestemme DNA-sekvensen til L1-genet av HPV, som brukes for genotyping. NGS har vist seg å gi muligheter innenfor sekvensering som tidligere sekvenseringsmetoder ikke har klart. Teknikken produserer og sekvenserer et høyt antall av korte sekvenser i svært mange paralleller, noe som øker hurtigheten og dybden av sekvenseringen. Metoden har gjort det mulig å sekvensere nye og tidlige ukjente DNA/RNA varianter, hvor referansesekvenser ikke er nødvendig. NGS har gode muligheter for å finne både SNIPer og spleisingsområder. Metylringer av DNA og DNA-protein interaksjonene har også vist seg å være enklere å sekvensere med NGS [46].

Før sekvensering i et NGS-instrument lages et DNA bibliotek fra allt DNA i prøven. Hvert fragment i biblioteket har adaptersekvenser i begge endene av DNA-tråden. Fra innerst til ytterst kalles disse sekvensene: sekvenseringsprimerens bindingssete (heretter kalt leseprimer), ulike indeksprimer for å kunne identifisere prøven og primer som er komplementære til oligonukleotidene på flow-cellen (stedet hvor nukleinsyresekvensene blir sekvensert), såkalt P5 og P7 primere. Dette er fremstilt i Figur 10.



Figur 10: Målsekvensen for sekvensering tilsettes tre adaptere. Fra innerst til ytterst kalles disse: Bindingssete til sekvenseringsprimer, indeksprimer og primer som er komplementær til oligonukleotidene på flow-cellen med navnet P5 og P7.

Med unntak av nexteriametoden (Illumina), består de fleste fremgangsmåter for bibliotekpreparering generelt av (i) fragmentering av prøvens DNA, (ii) reparasjon (blunt-end dannelse) av DNA fragmentene, (iii) fosforylering av 5'-ende, (iv) tilsettelse av adenin-haler på 3'-ende, (v) adapter ligering og (vi) PCR for å anrike det adapterligerte DNA-fragmentet. Det hele avsluttes med kvantifisering av bibliotekstørrelsen. Disse stegene er fremstilt i Figur 11. Fragmentering kan utføres ved fysiske, enzymatiske eller kjemiske metoder. Ettersom fragmenteringen danner heterogene sekvenser, som kan ha enten 5'- eller 3'- overheng av forskjellig lengde, repareres endene slik at de blir kuttet rett av. T4 DNA polymerase og Klenow enzym har 3'-5'- exonukleaseaktivitet som tar bort 3' overheng og polymeraseaktivitet som fyller inn nukleotider på 5' overheng. Deretter fosforyleres 5'-endene av og adenin tilsettes i 3'-ende. Disse overhengene gjør det mulig for adaptere å liggeres på. Adenin i 3'-ende bidrar også til at prøvens DNA sekvenser ikke liggeres sammen. Videre liggeres adaptere til DNA sekvensene. Avslutningsvis amplifiseres det adapterligerte produktet [47].



Figur 11: Flyten av standard bibliotekpreparering for NGS. Nukleinsyresekvensen fragmenteres til kortere sekvenser og endene repareres. 5'-ende på fragmentene fosforyleres og 3'-ende tilsettes en adenin. Videre liggeres adaptere på endene. Etter PCR amplifisering kvantifiseres prøvene for å oppnå riktig mengde fra hver prøve i sekvensatoren. Etter sekvensering grupperes prøvene basert på indeksene. Videre settes de korte oligonukleotidene sammen, ved bruk av overlappende sekvenser.

Kvantifisering av biblioteket utføres for å kunne tilsette optimal mengde adapterligert DNA i flowcellen for clustedannelse. Ønsket mengden varierer mellom sekvenseringsmaskiner, men ligger mellom 6 og 10pM for Illumina MiSeq instrumentet. Ved sekvensering av flere biblioteker i én omgang må mengden av adapterligert prøve-DNA være lik for alle bibliotekene, ettersom dette har direkte påvirkning på tettheten av clusteren som dannes. Hvis for lite DNA tilsettes flowcellen, blir dekkningen og dybden av DNA-sekvensene lav, samtidig som det blir dyrt. For store mengder DNA resulterer i problemer med å lese av basene [47]. Det er ønskelig med en mengde DNA som gir riktig oppløsning av sekvensen, men uten å sløse plass på flow-cellen. NGS genererer store mengder data, som medfører et behov for bioinformatiske verktøy.

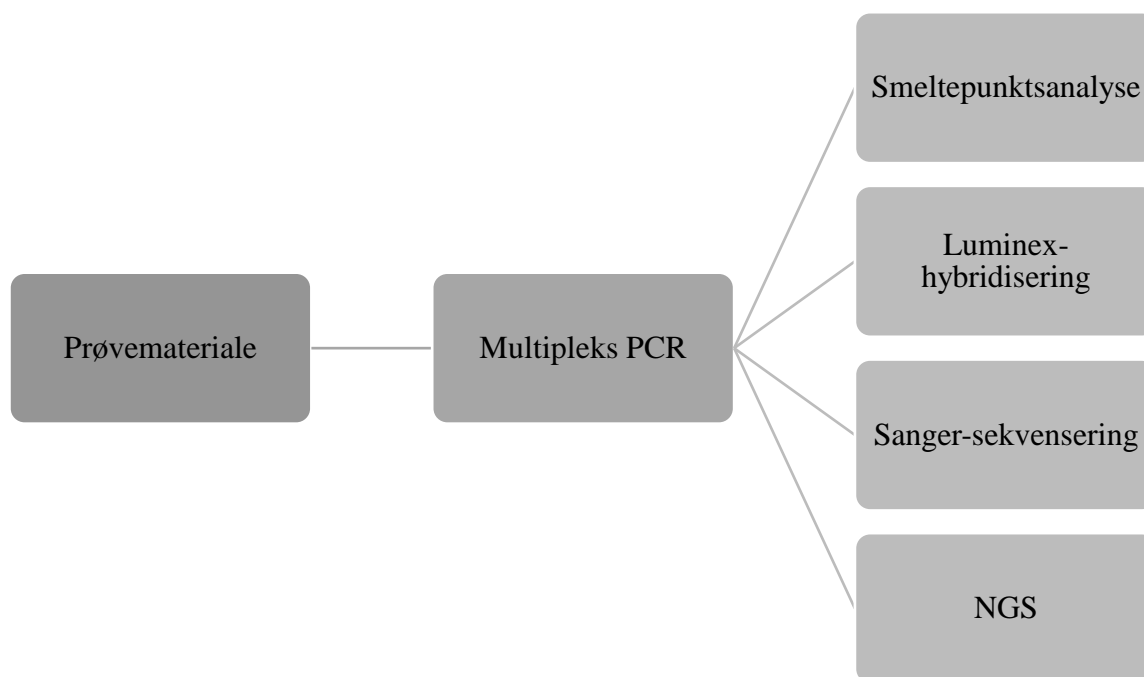
En alternativ metode for bibliotekpreparering er ved bruk av transposaser (nexteraXT av Illumina) som inneholder DNA sekvensen for sekvenseringsprimerens bindingsste. Transposasene både fragmenterer målsekvensen, reparerer endene og setter på leseprimeren i en og samme reaksjon. For å oppnå riktig lengde på DNA fragmentene er metoden svært sensitiv til forholdet mellom DNA og transposase. Ettersom fragmentstørrelsen også avhenger

av reaksjonens effektivitet, er reaksjonens parametere slik som temperatur og tid viktig [47]. For å fullføre biblioteksdannelsen settes indeks- og P5/P7 primerne ved amplifisering i PCR.

I flow-cellen hybridiserer oligonukleotidene med P5 og P7 adapterne. Oligonukleotidene blir også benyttet som primer av polymerasen ved kopiering av templatet. Etter kopieringen vaskes templatet bort. Den nysyntetiserte DNA-tråden bøyes over og hybridiserer til en oligo i flow-cellen, slik at både 5'- og 3'-ende henger fast i flow-cellen, som en bro. Igjen benytter polymerase seg av oligonukleotiden på flow-cellen som primer for syntetisering slik at det dannes en dt bro. De to trådene denatureres og rettes ut. Disse trådene bøyes igjen over og lager to nye broer, som kopieres og denatureres. Slik fortsetter kopiering av trådene i en prosess som kalles broamplifikasjon, frem til millioner av sekvensen er dannet i forskjellige grupper (clustre). Videre vaskes antisenstråden bort slik at bare senstråden er igjen på flow-cellen. For å unngå uønsket hybridisering blokkeres 3'-enden av senstråden. Prosessen som kalles «sekvensering ved syntese» begynner ved at en primer hybridiseres til bindingssete og polymerasen tilsetter en og en nukleotid som er komplementær til templatsekvensen. De fire nukleotidene er merket med forskjellige fluoriserende molekyler som gir signal når de inkorporeres i sekvensen. Bølgelengden og styrken til dette signalet brukes for å bestemme hvilken base som har festet seg. Flere hundre millioner DNA-tråder sekvenseres samtidig i en enkelt prosess. Etter sekvensering av prøvematerialet, sekvenseres indeksprimeren. Deretter fjernes blokkeringen av 3'-enden slik at broamplifisering igjen kan skje. De dt broene denatureres og senstråden kan vaskes bort. Avslutningsvis sekvenseres antisenstråden med indeksprimer. Basert på de unike indeksprimerne grupperes millioner av sekvenser i grupper slik at de forskjellige prøvene kan identifiseres. Disse gruppene blir videre satt sammen i større grupper (contiger) basert på overlappende sekvenser. Contigene blir benyttet i sammenlikning med et referasegenom hvis det er tilgjengelig. Hvis referanseggenom ikke er tilgjengelig må contigene settes sammen ved de novo sammensetning. Dette gjøres ved å sette sammen contigene basert på de overlappende sekvensene mellom contigene.

### 1.3 Problemstilling

For å estimere den epidemiologiske forandringen av HPV i befolkningen, som er resultat av vaksinasjon, er det viktig med gode genotypingsmetoder. Hensikten med denne oppgaven har derfor vært å sammenlikne fire forskjellige metoder for karakterisering av HPV-genotyper, samt å bestemme hvilken av disse metodene som er best egnet for genotyping av HPV i urinprøver hvor multiple HPV-infeksjoner er forventet. Urin ble valgt som prøvemateriale ettersom dette er materiale som brukes i overvåkningsprogrammet. Figur 12 viser flytskjema for behandling av prøvene i de ulike påvisningsmetodene. For å kunne påvise lav mengde HPV i prøvene amplifiseres alle prøvene med PCR før videre genotypingsanalyser med følgende metoder: Smaltepunktsanalyse, Luminex-hybridisering, Sanger-sekvensering og NGS.



*Figur 12: Fremgangsmåte for de fire molekylærbiologiske metodene som er brukt i denne oppgaven for genotyping av HPV. Alle prøvene ble amplifisert med multipleks HPV MGP PCR før de ble genotypet. Forberedelsesreaksjonen for Sanger-sekvensering og NGS ble optimalisert og etablert gjennom denne oppgaven.*



## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Prøvemateriale

Plasmider med genomet til HPV 16 og HPV 18 (nasjonalt institutt for biologiske standarder og kontroller, England), ble fortynnet i TE-buffer til 2500 GEQ/ $\mu$ L. Disse ble brukt for optimalisering av alle PCR reaksjonene i oppgaven. Videre ble de to genotypene blandet i ulike forhold slik at total mengde fortsatt var 2500 GEQ/ $\mu$ L slik som fremstilt i Tabell 1. Disse prøvene med blandinger av HPV 16 og HPV 18 (heretter kalt blandingsprøver) ble benyttet for å undersøke metodenes mulighet til å påvise multiple infeksjoner, samt infeksjoner i lav konsentrasjon. Til slutt ble urinprøver fra 20 HPV-positive uvaksinerte norske kvinner mellom 17 og 21 år genotypet ved bruk av de ulike metodene som inngikk i oppgaven.

*Tabell 1: Positive kontroller av HPV 16 og HPV 18 plasmider, samt blandinger av de to genotypene i forskjellige konsentrasjoner. Disse prøvene er heretter kalt blandingsprøver.*

<b>Prøve nr.</b>	<b>% HPV 16</b>	<b>% HPV 18</b>
1	100	0
2	99,99	0,01
3	99,9	0,1
4	99	1
5	90	10
6	86	14
7	80	20
8	75	25
9	50	50
10	25	75
11	20	80
12	14	86
13	10	90
14	1	99
15	0,1	99,9
16	0,01	99,99
17	0	100

### 2.2 Metoder

Ekstraksjon av HPV DNA fra 0,5 mL urin ble utført av avdeling for biobanker ved FHI, ved bruk av Chemagic 360. Ekstrakter fra urinprøvene samt blandingsprøvene av HPV 16 og HPV 18 ble amplifisert med modifisert generelt primersett (MGP, International referansesenter for HPV (IHPVRC), Karolinska Institutet, Stockholm, Sverige) som utgangspunkt for de ulike genotypingsmetodene; smeltepunktanalyse, Luminex-hybridiseringsteknologi, Sanger-sekvensering og amplikonbasert NGS. Bibliotekspreparering for NGS ble utført både med ligeringsystem og PCR-reaksjoner. Alle metodene, utenom MGP PCR og Luminex-hybridisering, ble optimalisert og etablert gjennom denne oppgaven.

### 2.2.1 PCR for amplifisering av en del av L1-genet i HPV

For å undersøke om vaksinasjonen har gitt kryssbeskyttelse mot flere forskjellige HPV-genotyper, er det ønskelig å undersøke et bredt spekter av forskjellige HPV-genotyper. Multipleks PCR med MGP, ble derfor benyttet for amplifisering av 37 forskjellige genotyper [48].

MGP er en modifisering av de tradisjonelle GP5+/6+ primerparene, ved en forlenget 5'-ende på 10-12 bp (vist som uthevet skrift i Tabell 2). Dette er for å øke den termodynamiske stabiliteten. Videre har MGP små variasjoner i DNA-sekvensen, sammenliknet med GP5+/6+ primerparet. Dette er for best mulig hybridisering med alle de ønskede 37 genotypene. Avhengig av HPV genotypen amplifiseres mellom 158 og 168 nukleotider av L1-genet, som inneholder høyt variable område, egnet til å skille ulike genotyper [49]. Primerne er vist å ha bedre amplifikasjonseffektivitet av 14 høyrisiko genotyper (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 og -68) sammenliknet med GP5+/6+ [48]. For å videre å kunne benytte PCR-produktet i Luminex-deteksjon, er alle antisense primere biotinylert på 5'-ende.

For amplifisering av MGP PCR ble protokollen fra Söderlund et al. [48] benyttet. Mastermiksen (25 µL) inneholdt PCR buffer II (Applied Biosystems, California, USA), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, California, USA), 0,2 mM dNUTP (0,2 mM av deoksyguanin trifosfat (dGTP), deoksyadenosin trifosfat (dATP), deoksytydin trifosfat (dCTP), og 0,1 mM av deokstymidin trifosfat (dTTP) og deoksyuridin trifosfat dUTP, ThermoFisher Scientific, Oslo, Norge), 0,3 µM per MGP primer (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA), 5 µL templat-DNA og 0,5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, California, USA). For å kunne utføre smeltepunktanalyse ble SYOT®9 (ThermoFisher Scientific, Oslo, Norge) fortynnet 1:10 000 og tilsatt i reaksjonsblandingen. For senere bruk i Luminex-analyse ble det kjørt to parallelle PCR-reaksjoner, en med og en uten SYTO®9.

Initial denaturering ble gjort ved 95 °C i 10 min, før 5 sykluser av 95 °C i 10 sek, 42 °C i 45 sek og 72 °C i 45 sek. Deretter fulgte 45 sykluser av 95 °C i 10 sek, 64 °C i 45 sek og 72 °C i 45 sek [48]. Avslutningsvis ble temperaturen holdt på 72 °C i 5 min for å gi polymerasen mulighet til å fullføre syntesen av eventuelt for tidlig terminerte PCR-produkter. Ved lav hybridiseringstemperatur i de første 5 PCR-syklusene hybridiserer den HPV komplementære 3'-ende av primeren til templatet. Den lave hybridiseringstemperaturen tillater enkelte feilparinger mellom basene i primer og templat. Dette bidrar til at HPV-genotyper hvor L1 DNA sekvensen er noe forskjellig fra primersekvensen fremdeles blir amplifisert. PCR-produktet fra denne fasen danner et HPV-amplikon med en forlengelse på 5'-ende. Ved å øke hybridiseringstemperaturen i andre fase hybridiserer hele MGP primeren, inkludert de ekstra 10 bp på 5'-ende, til PCR-produktet fra første fase. Smeltepunktanalyse ble utført ved 95 °C i 30 sek, før DNA-trådene ble hybridisert sammen ved 64 °C i 30 sek. Avslutningsvis ble reaksjonen varmet til 95 °C med 0,1 °C økning per minutt. Størrelse på alle MGP-amplikon (≈160 bp) ble undersøkt ved elektroforese på 2 % agarosegel ved 90 V i 60 min.

Tabell 2: Modifisert generelt primersystem (MGP) [19], ble benyttet for amplifisering av en del av L1-genet i HPV. De 10 uthevede nukleotidene på 5'-ende av primerne er ikke komplementære til HPV DNA, men tilsatt for å øke den termodynamiske stabiliteten til primerne. Alle antisensprimerne er merket med biotin på 5'-ende.

Primernavn	Retning	Sekvens, 5'-3'
MGPA	Sens	<b>ACGTTGGATGTTT</b> GTTACTGTGGTGGATACTAC
MGPB	Sens	<b>ACGTTGGATGTTT</b> GTTACCGTTGTTGATACTAC
MGPC	Sens	<b>ACGTTGGATGTTT</b> GTTACTAAGGTAGATACTACTC
MGPD	Sens	<b>ACGTTGGATGTTT</b> GTTACTGTTGTGGATAACAAC
MGP31	Sens	<b>ACGTTGGATGTTT</b> GTTACTATGGTAGATACTACACAC
MGP3	Antisens	<b>ACGTTGGATGGAAAAATAAACTGTAAATCATATTCCT</b>
MGP4	Antisens	<b>ACGTTGGATGGAAAAATAAATTGTAAATCATACTC</b>
MGP5	Antisens	<b>ACGTTGGATGGAAATATAAATTGTAAATCAAATTC</b>
MGP6	Antisens	<b>ACGTTGGATGGAAAAATAAACTGTAAATCATATTC</b>
MGP7	Antisens	<b>ACGTTGGATGGAAAAATAAACTGCAAATCATATTC</b>

## 2.2.2 Luminex-analyse

For spesifikk deteksjon av L1-genet til 37 HPV-genotyper ble 42 ulike prober benyttet i Luminex-analysen (Vedlegg tabell 2) [19]. Probene ble koblet til polystyrenkulene ved molekylærbiologisk avdeling ved FHI, i henhold til metodebeskrivelsen [24]. Videre ble 10 µL av MGP-amplikonet blandet med 34,1 µL hybridiseringsbuffer (0,15 M tetramethylammoniumchloride (TMAC), 75 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, 1,5 g/L Sarkosyl, pH 8,0) og 7 µL TE-buffer. Lik mengde av alle koblede kuler ble blandet til et totalvolum på 5,8 µL og tilsatt til reaksjonsblandingen [24]. Reaksjonen ble varmet til 95 °C i 10 min på GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific, Oslo, Norge), før avkjøling på is i 2 min. Hybridisering av MGP-amplikonet til probe ble utført under risting ved 450 rpm ved 41 °C i 30 min på et ThermoMixerC instrument (Eppendorf, Hamburg, Tyskland), før reaksjonsblandingen ble vasket med 100 µL vaskebuffer (1 mg/ml casin i PBS (fosfat-bufretsalin)) i en vakuum vaskestasjon (Bio-Plex Pro Wash Station, Bio-Rad, California, USA). Deretter ble 75µL streptavidin-R-phycoerytyrin (Bio Rad, California, USA) fortynnet 1:1600 med fargebuffer (2 M TMAC, 75 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, 1,5 g/L Sarkosyl og 1 g/L casein, pH 8,0) og tilsatt til prøvene. For å feste streptavidin-R-phycoerytyrin (Bio Rad) til biotin i HPV MGP-amplikonet, ble reaksjonsblandingen inkubert under risting i 25 min ved 450 rpm i romtemperatur. Deretter ble vasking gjentatt tre ganger. Avslutningsvis ble reaksjonsblandingen resuspendert i 100 µL vaskebuffer og ristet i 5 min ved 450 rpm på ThermoMixerC (Eppendorf), i romtemperatur. Til slutt ble prøvene analysert på Bio-Plex 200 Multiplex System (Bio-Rad, California, USA).

Medianen til reporter fluorescens intensiteten (MFI) for alle positive kuler ble bruk i videre analyser. Det ble beregnet en MFI per genotype. MFI av de negative kontrollene (dH<sub>2</sub>O) per genotypespesifikke probe ble benyttet til å bestemme deteksjonsgrenser for positive prøver, etter følgende formler:



$$\text{Svakt positive prøver} = \bar{x} + \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\text{Positive prøver} = 2 * (\bar{x} + \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{x})^2}{n}})$$

$$\text{Hvis } \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{x})^2}{n}} < 5 \text{ settes } \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{x})^2}{n}} = 5$$

I formlene over er  $X_i$  MFI av de 5 negative kontrollene og  $n$  er antall negative kontroller, altså 5. Hver genotype har sine egne deteksjonsgrenser for svakt positive og positive prøver. Deteksjonsgrensene ble beregnet for hvert Luminex-oppsett. Ved påvisning av en svak positiv prøve, skal prøven analyseres to ganger til (totalt tre analyser av samme prøve). Ved ett positivt eller to svakt positive prøvesvar, tolkes prøven som positiv.

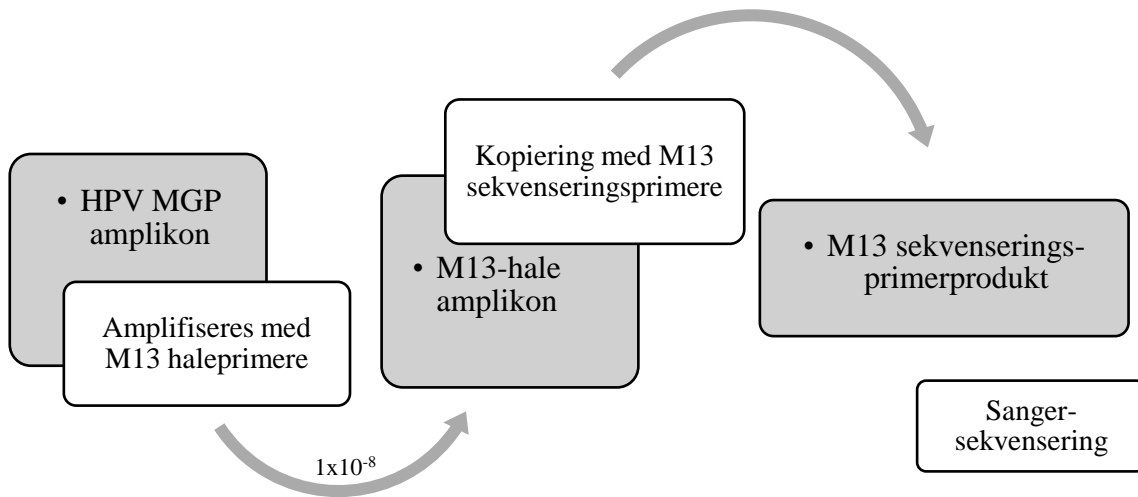
I tillegg til negative kontroller inneholdt hvert Luminex-oppsett 4 MGP-kontroller (internasjonale referansesenteret for HPV (IHPVRC)) (Vedlegg tabell 1). Hver kontroll består av 4 ulike HPV genotyper, som settes opp i to ulike konstruksjoner; 100 og 10 kopier/ $\mu$ L (Tabell 3). For å kunne godkjenne oppsettet må MGP1 til MGP4 være positive.

Navn	HPV-genotyper	Kopier/ $\mu$ L	Kopier/PCR
MGP-1	6, 16, 18, 51	100	500
MGP-2	11, 31, 33, 58	100	500
MGP-3	39, 45, 52, 56	100	500
MGP-4	35, 59, 66, 68	100	500
MGP-5	6, 16, 18, 51	10	50
MGP-6	11, 31, 33, 58	10	50
MGP-7	39, 45, 52, 56	10	50
MGP-8	35, 56, 66 68	10	50

Tabell 3: HPV-positive kontroller med fire forskjellige genotyper per prøve. MGP1 til MGP4 har 100 kopier/ $\mu$ L og MGP5 til MGP8 har 10 kopier/ $\mu$ L av de samme genotypene som MGP1 til MGP4.

### 2.2.3 Sanger-sekvensering

Figur 13 viser flytskjema over de ulike PCR-reaksjonene som ble utført på HPV MGP-amplikonet før Sanger-sekvensering. En dypere forklaring av disse reaksjonene følger i de to følgende delkapitlene (avsnitt 2.2.3.1 og 1.2.3.2).



Figur 13: Flytskjema for preparering av prøver før Sanger-sekvensering. HPV MGP-amplikonene ble fortynnet til  $1 \times 10^{-8}$  før amplifisering med M13-haleprimere. Videre ble produktet fra M13-halePCR kopiert med M13-sekvenseringsprimere, før amplikonene ble sekvensert med Sanger-sekvensering.

### 2.2.3.1 M13 haleprimer-PCR

Mastermiksen (25  $\mu\text{L}$ ) inneholdt PCR buffer IV (75 mM Tris buffer pH 8.8, 20 mM ammonium sulfat, 0,1 % Tween®, Sigma-Aldrich, Oslo, Norge) med SYTO®9 (1:10 000) (ThermoFisher Scientific), 0,2 mM dNUTP (ThermoFisher Scientific), 1 ng/ $\mu\text{L}$  per M13-haleprimere<sup>1</sup> (Up\_big\_HPV-prim: GTTCTCCCAGTCACGACACGTTGGATGTTTGTAC og Low\_big\_HPV-prim: GGAAACCAGCTATGACCATGACGTTGGATGGAAAAATAAAYTG, Sigma Life Science, Oslo, Norge), 1  $\mu\text{L}$  av  $1 \times 10^{-8}$  fortynnet templat-DNA og 0,5 U Platinum Taq DNA polymerase (ThermoFisher, Oslo, Norge). For optimalisering av PCR-reaksjonen ble mastermiksen titrert med 2, 3, 4 og 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Applied Biosystems) og det ble kjørt temperaturgradient (50, 51,4, 54,3, 58,5, 63,8, 68,2, 70,7 og 72 °C) for primerhybridiseringen. Basert på optimaliseringen ble det besluttet å bruke 3 mM  $\text{MgCl}_2$  og 59 °C for primerhybridisering, i videre analyser av blandingsprøvene (Tabell 1) og urinprøvene.

Følgende PCR-temperaturprofil ble benyttet til videre analyser; 95 °C i 2 min, 32 sykluser av 95 °C i 10 sek, 59 °C i 45 sek og 72 °C i 30 sek, og avslutningsvis 75 °C i 5 min.

Smeltepunktanalyse ble utført ved 95 °C i 30 sek, 59 °C i 30 sek før oppvarming til 95 °C med 0,1 °C økning per minutt. Størrelse på alle MGP-amplikon ( $\approx 200$  bp) ble undersøkt ved elektroforese på 2 % agarosegel ved 90 V i 60 min. Resultatene fra optimaliseringen fremgår av resultater, avsnitt 3.3.1.1.

### 2.2.3.2 Sanger sekvensering med M13-sekvenseringsprimere

Produktet fra M13-halePCR ble rensert med Illustria ExoProStar (GE Healthcare, Oslo, Norge) der fosfatase og exonuklease fjerner primere og trinukleotider. Rensingen ble utført som beskrevet av leverandøren, under risting ved 4 °C og 2000 rpm i 30 min. Videre ble

<sup>1</sup> Designert av Einar S. Berg for denne oppgaven. Ikke publisert.

amplikonet kopiert (cycle sequencing) med modifiserte M13-sekvenseringsprimere (Sens\_M13 universal (-40): GTTCTCCCAGTCACGAC og Antisens\_M13 rev (-24)<sup>2</sup>: GGAAACCAGCTATGACAC, Sigma-Aldrich, Oslo, Norge). For å oppnå den beste sekvenskvaliteten samt å generere sekvens så nært primerne som mulig, ble både versjon 1.1 og versjon 3.1 av Big Dye kittet (Applied Biosystems, California, USA) testet. For å øke utbytte av sekvenseringen ble også ulike primerkonsentrasjoner utprøvd (0,32 µM/µL, 1,6 µM/µL og 3,2 µM/µL). Det ble forsøkt med både 25 og 50 sykluser for kopiering og primerhybridisering ved både 50 °C og 55 °C.

Basert på disse optimaliseringsforsøkene ble Big Dye kit versjon 3.1 og primerkonsentrasjon på 3,2 µM/µL benyttet for videre sekvensering. Etter initial denaturering ved 95 °C i 10 min besto temperaturprofilen i DNA-kopieringen av 50 sykluser med 95 °C i 10 sek, 55 °C i 5 sek og 60 °C i 4 min. Resultatene fra optimaliseringen fremgår av resultater, avsnitt 3.3.1.2.

Amplikonene ble rensset med BigDye Xterminator Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Oslo, Norge) i henhold til produsentens protokoll. Sanger-sekvensering ble gjort på Applied biosystem 3500xL (Applied Biosystems, California, USA). Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems, California, USA) og BioEdit Sequence Alignment Editor (Tom Hall, California, USA) ble benyttet til sekvensdatabehandling. Genotyping av sekvensene ble utført ved nukleotid BLAST-søk (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) [50], og sammenstilling av DNA-sekvensene ble gjort mot referansegenom for HPV 16 (genbanknummer K02718 ) og HPV 18 (genbanknummer X05015).

## 2.2.4 Nestegenerasjonssekvensering (NGS)

### 2.2.4.1 Bibliotekpreparering med KAPA BIOSYSTEMS HyperPlus Kit 500bp

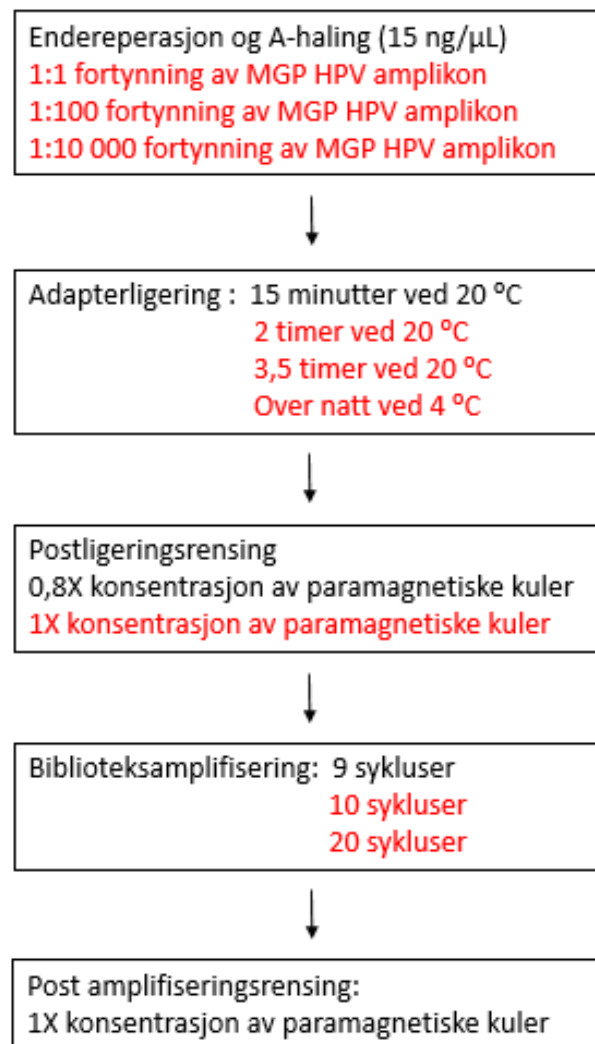
Fem MGP-amplikon med forskjellige blandingsforhold av HPV 16 og HPV 18 (prøvenummer 1, 8, 9, 10 og 17, Tabell 1) ble preparert som beskrevet i protokollen for KAPA BIOSYSTEMS HyperPlus Kit 500 bp (heretter kalt KAPA protokoll), med unntak av enzymatisk fragmentering som ikke ble utført da amplikonene er små. I tillegg ble HPV MGP-amplikonet fortynnet 1:0,8 med elueringsbuffer før start. Fremgangsmåten er vist i Figur 14, i svart tekst.

For å øke mengden ligeringsprodukt ble HPV 16 og HPV 18 benyttet for optimalisering av protokollen. MGP-amplikonene ble rensset med paramagnetiske kuler i ett 1:1 forhold, før start. Dette for å fjerne primer-dimer som ble dannet under MGP PCR-reaksjonen. Parameterne som ble undersøkt for optimaliseringen er markert med rød tekst i Figur 14. MGP HPV-amplikonet ble fortynnet til 1:1, 1:100 og 1:10 000 i elueringsbuffer (KAPA BIOSYSTEMS, Oslo, Norge), for å undersøke hvilken konsentrasjon som enklest lot seg enderepareres og A-hales. Adapterligerings ble forsøkt ved både 15 min, 2 og 3,5 timers inkubering ved 20 °C, samt over natt ved 4 °C. Påfølgende rensing av ligeringsproduktet ble utført med paramagnetiske kuler (Kapa Pure Beads, KAPA BIOSYSTEMS, Oslo, Norge), hvor forholdet mellom kuler og produkt ble forsøkt ved henholdsvis 0,8:1 og 1:1. Avslutningsvis ble det forsøkt med både 10 og 20 sykluser i PCR for kopiering av adapterligert produkt, før den siste rensprosessen i henhold til produsentens protokoll med

---

<sup>2</sup> Den ene av M13-primere er modifisert av Einar S. Berg for denne oppgaven. Ikke publisert.

1:1 konsentrasjon av produkt og paramagnetiske kuler. NGS ble utført på MiSeq instrument (Illumina, California, USA) med MiSeq® Reagent kit V2 og tilhørende protokoll.



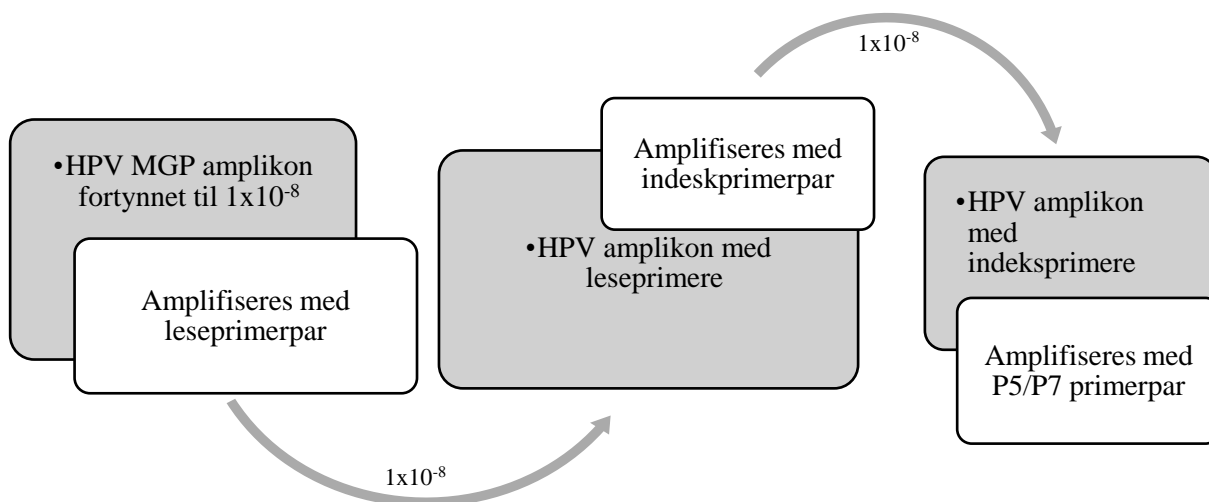
Figur 14: Flytskjema for NGS bibliotekspreparering ved ligeringsystem. Forholdene angitt i svart er i henhold til anbefalingene fra KAPA protokollen, mens forholdene angitt i rødt viser de ulike parameterne som ble variert for optimalisering av protokollen.

Optimaliseringen ga best resultater ved 1:1 fortyning av MGP HPV-amplikonet i endereparasjon og A-haling, 15 min adapterligerig ved 20 °C, rensing ved 1:1 blandingsforhold av amplikonet og paramagnetiske kuler og 10 PCR-sykluser. Disse forholdene ble videre benyttet i arbeidet. Resultatene fra optimaliseringen fremgår av resultater, avsnitt 3.4.1.1.

Databehandling ble utført med bistand av molekylærbiologisk avdeling ved FHI. Sammenstilling (mapping) med referansegenom ble utført ved bruk av Bowtie2 (Johns Hopkins universitet, Maryland, USA), med følgende referansegenom: HPV 16 med genbanknummer NC\_001526,4 eller K02718 og HPV 18 med genbanknummer NC\_001526,4 eller X05015.

### 2.2.4.2 Bibliotekpreparering med PCR

For å senke utgiftene og tidsbruken for bibliotekprepareringen for NGS, ble det etablert en biblioteksprepareringsmetode ved bruk av PCR. Metoden tar utgangspunkt i Nexteria protokollen (Illumina) (avsnitt 1.2.4.2), men uten bruk av transposaser. Alle adapterne ble tillagt HPV-amplikonet ved bruk av PCR. Figur 15 viser flytskjema for PCR-reaksjonene som ble utført for å tilsette alle adaptere. For etablering av metoden ble HPV 16 positiv kontroll benyttet. Mellom hver amplifisering ble produktet fortennet til  $1 \times 10^{-8}$ .

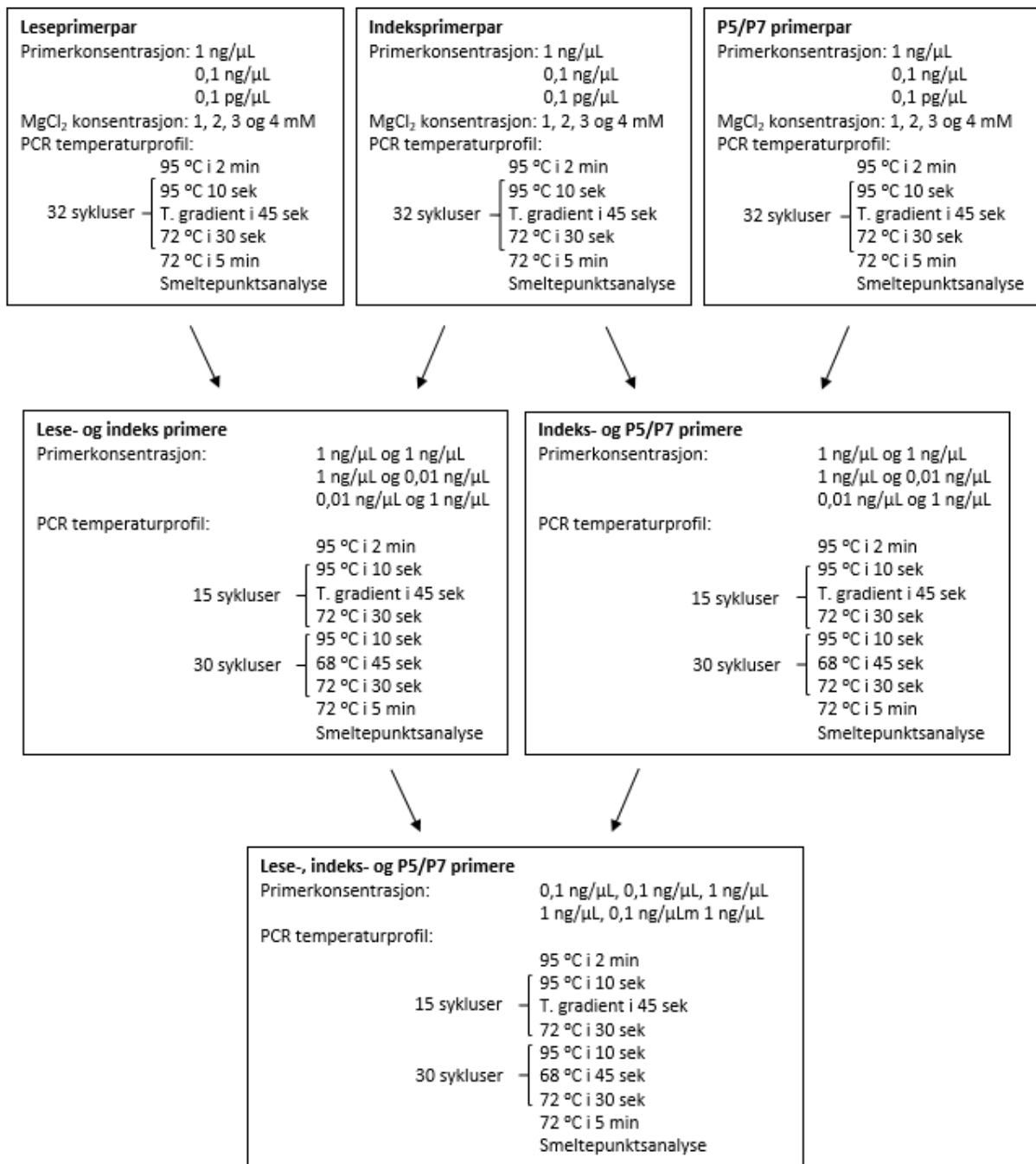


Figur 15: Flytskjema for PCR-basert NGS bibliotekpreparering. HPV MGP amplikonene fortennes til  $1 \times 10^{-8}$  før amplifisering med leseprimerparet. Dette produktet fortennes igjen til  $1 \times 10^{-8}$  før amplifisering med indeksprimerne. Produktet fortennes igjen til  $1 \times 10^{-8}$  før den siste PCR-amplifiseringen med P5/P7 primerparet.

For optimalisering av bibliotekpreparering ved bruk av PCR ble det initialt utført separate reaksjoner for hvert av de tre primerparene: sekvenseringsprimerens bindingssete (heretter kalt leseprimer)<sup>3</sup>, indeksprimer<sup>3</sup> og P5/P7 (Vedlegg figur 6, 7 og 8) (Sigma Life Science, Oslo, Norge). Videre ble det forsøkt med to og to primerpar i én og samme PCR-reaksjon, samt alle tre primerparene i én reaksjon. Alle reaksjonene ble optimalisert for primerkonsentrasjon og primerhybridiseringstemperatur (temperaturgradient for alle reaksjonene var: 50, 51,4, 54,3, 58,5, 63,8, 68,2, 70,7 og 72 °C). De første tre PCR reaksjonene ble også optimalisert for konsentrasjon av  $MgCl_2$ . DNA-smeltepunktsanalyse ble utført for alle reaksjonene ved 95 °C i 30 sek, 65 °C i 30 sek, før reaksjonen ble varmet til 95 °C med 0,1 °C økning per minutt. Utdypende forklaring av optimaliseringsprosessen fremkommer av Figur 16.

I tillegg til de varierende konsentrasjonene av  $MgCl_2$  (Applied Biosystems) og primere, inneholdt mastermiksen (25  $\mu$ L) for alle reaksjonene PCR Buffer IV (750 mM Tris buffer pH 8,8, 200 mM ammonium sulfat, 1 % Tween®) med SYTO®9 (1:10 000) (ThermoFisher Scientific), 0,8 mM dNUTP (ThermoFisher Scientific), 1  $\mu$ L templat-DNA og 0,5 U Platinum Taq DNA Polymerase (ThermoFisher). Den optimale konsentrasjon av alle primerne ble bestemt til 1 ng/ $\mu$ L.

<sup>3</sup> Lese- og indeksprimerne er designet av Einar S. Berg for denne oppgaven. Ikke publisert.



Figur 16: Skjematisk oversikt over reaksjonene som ble utført for optimalisering av PCR-basert NGS bibliotekspreparering. Konsentrasjonen av MgCl<sub>2</sub> ble forsøkt fra 1 til 4 mM for reaksjonene med ett primerpar. For alle reaksjonene ble primerkonsentrasjonene variert fra 1 ng/μL til 0,1 pg/μL og ved forskjellige kombinasjoner i de reaksjonene hvor flere primerpar var inkludert. Primerhybridisering ble utført ved temperaturgradient fra ved følgende temperaturer: 50, 51,4, 54,3, 58,5, 63,8, 68,2, 70,7 og 72 °C.

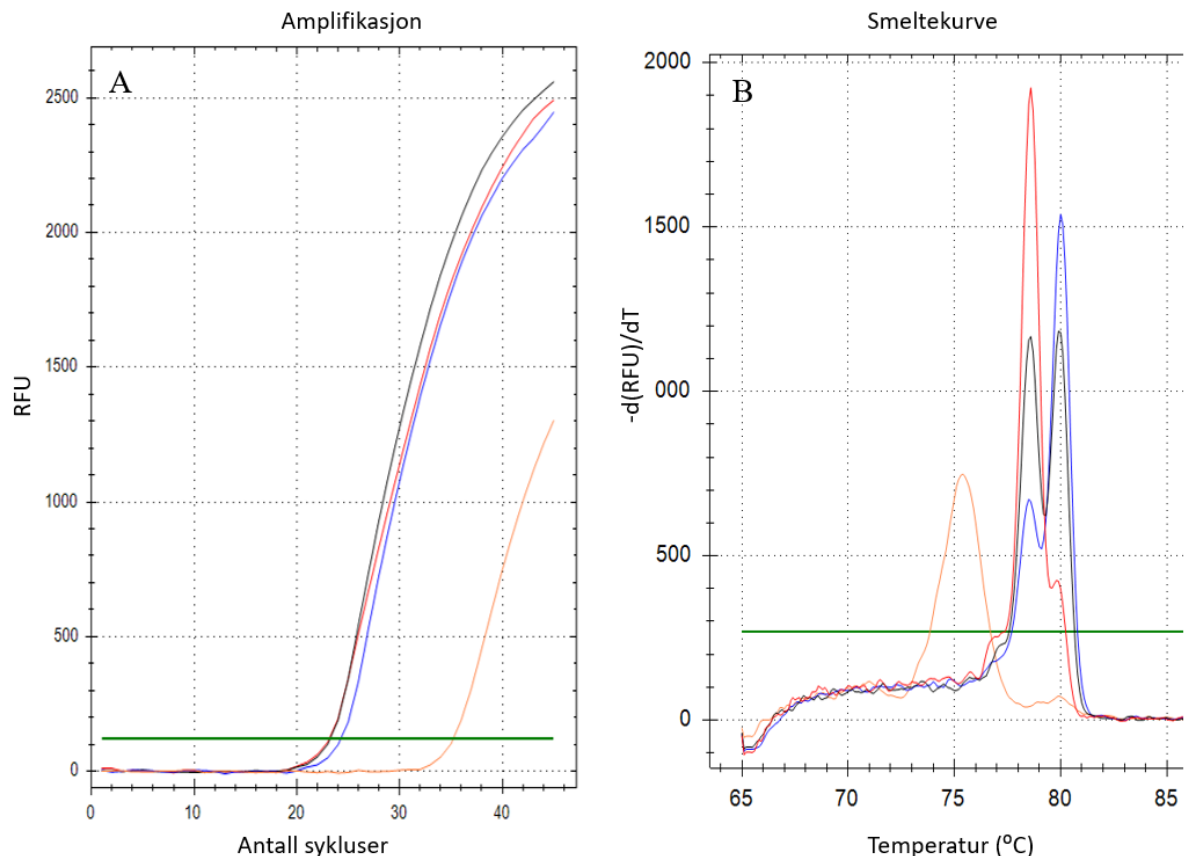
Basert på denne optimaliseringsprosessen ble PCR-basert bibliotekspreparering av HPV 16 og HVP 18 utført ved: Én PCR-reaksjon med leseprimerparet (1 ng/μL) med 95 °C i 2 min, 32 sykluser av 95 °C i 10 sek, 55 °C i 45 sek og 72 °C i 72 sek. Deretter en påfølgende PCR-reaksjon med både indeks- (1 ng/μL) og P5/P7 (1 ng/μL) primerparene med 95 °C i 2 min, 32 sykluser av 95 °C i 10 sek, 68 °C i 45 sek og 72 °C i 72 sek. Resultatene fra optimaliseringen fremgår av resultater, avsnitt 3.4.1.2.

Alle adapterligerte prøver preparert slik som beskrevet i KAPA protokollen og med PCR ble kvalitetssikret på Agilent 2100 BioAnalyzer eller Lonza FlashGel system, hvor tilhørende protokoller ble benyttet. Konsentrasjonen av prøvene ble målt med Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

## 3 Resultater

### 3.1 Amplifisering av HPV med modifisert generelt primersett (MGP)

DNA-smeltepunktsanalyse av HPV MGP-amplikonet viser at metoden kan separere genotypene HPV 16 og HPV 18. I prøver med blanding av HPV 16 og HPV 18 dannes to topper, hvor hver av toppene representerer en genotype. Det er mulig å påvise minoritetsvarianten ned til 10 %. Dette fremkommer av Figur 17. Smeltepunktsanalysen viser god overensstemmelse med agarosegelbildet (Vedlegg figur 1).

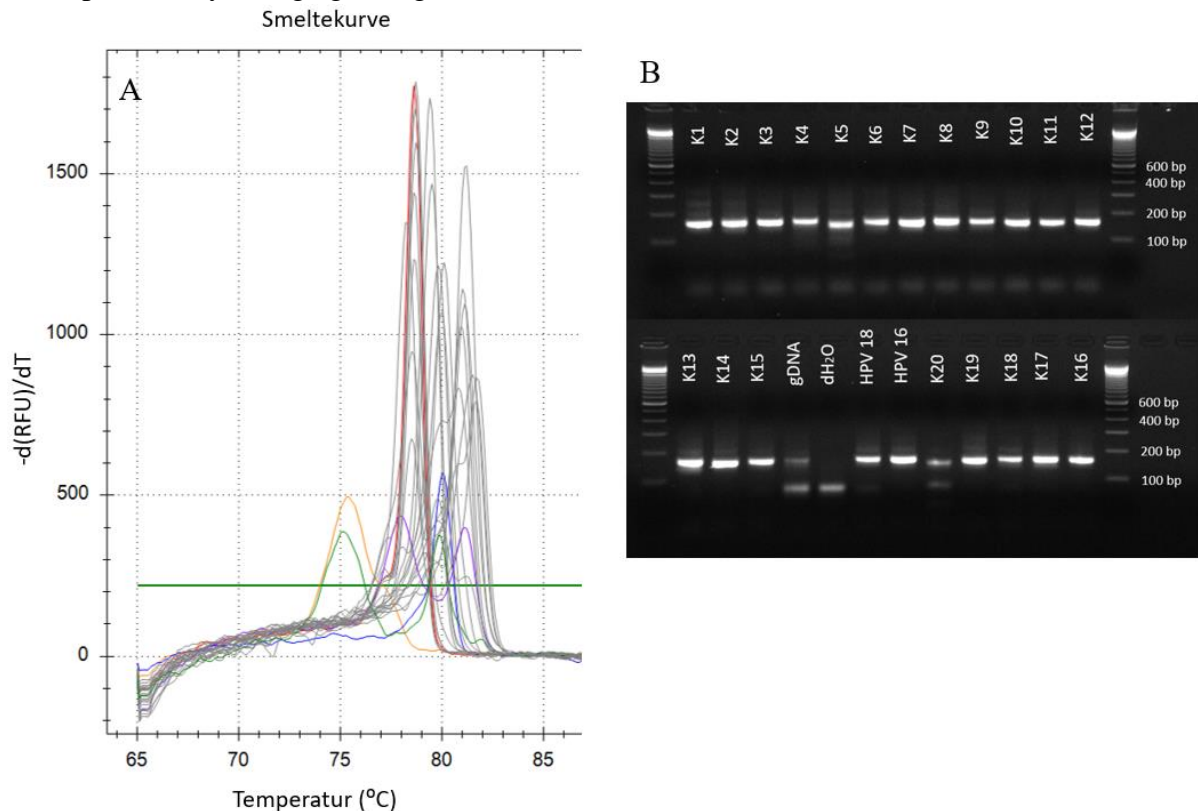


Figur 17: Rød kurve illustrerer prøven med 90 % HPV 16 og 10 % i HPV 18. Blå kurve illustrerer prøven med 90 % HPV 18 og 10 % HPV 16. Svart kurve fremstiller prøven bestående av 50 % HPV 16 og 50 % HPV 18, og gul kurve er negativ kontroll (dH<sub>2</sub>O). A: C<sub>t</sub>-verdien for rød kurve er 23,8, for blå er den 24,3, for svart er den 23,3 og for gul 35,3. B: S<sub>t</sub> for rød kurve er på 78,6 °C (HPV 16) og 79,8 °C (HPV 18), for blå er den 78,5 °C (HPV 16) og 80 °C (HPV 18), og for svart er den 78,6 °C (HPV16) og 79,9 °C (HPV18). Den negative kontrollen viser dannelse av primer-dimer med S<sub>t</sub> på 75,4 °C.

Tilsvarende DNA-smeltepunktsanalyse av MGP-amplifisert HPV fra urinprøvene (Figur 18 A), viser at denne metoden ikke kan separere genotypene fra hverandre, da flere av genotypene har svært lik S<sub>t</sub>. Agarosegelbildet (Figur 18 B) av urinprøvene amplifisert med MGP viser bånd for alle prøvene på i overkant av 150 bp, som forventet (avsnitt 2.2.1). Videre viser enkelte av urinprøvene små variasjoner i båndene, hvor for eksempel prøve K20 viser ett bånd på omkring 70 bp, i tillegg til båndet på omkring 150 bp. Dette samsvarer med smeltepunktsanalysen for prøven, som også viser to separate topper. Både smeltepunktsanalysen og agarosegelbildet viser at primerne danner uspesifikt biprodukt med



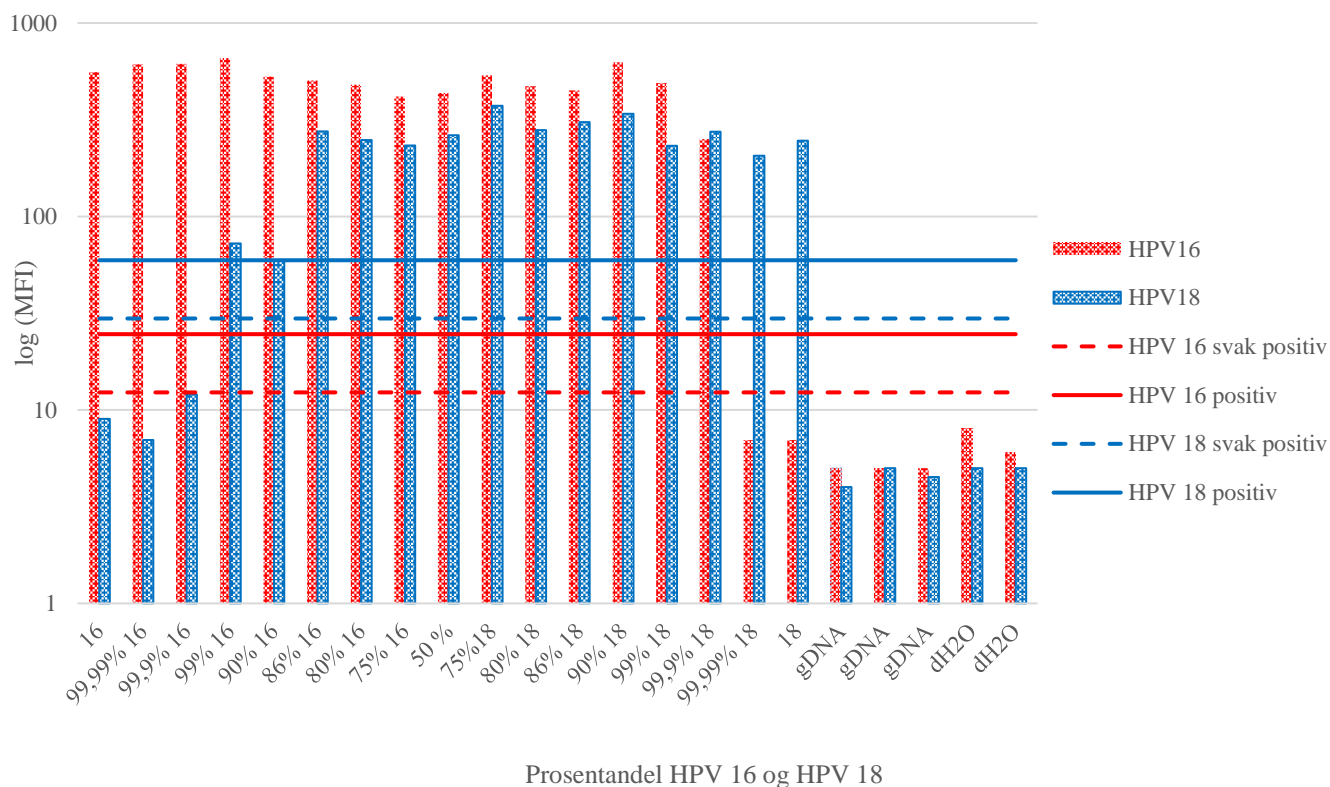
gDNA og primer-dimer. Resultatene viser generelt gode overensstemmelser mellom smeltepunktanalysen og agarosegelen.



Figur 18: Smeltepunktanalyse (A) og agarosegelbilde (B) av urinprøvene amplifisert med MGP. A: Urinprøvene har  $S_i$  mellom 78,2 °C og 81,7 °C, HPV 16 (rød kurve) og HPV 18 (blå kurve) har  $S_i$  på henholdsvis 78,6 °C og 80 °C.  $S_i$  for  $dH_2O$  (gul kurve) er på 75,3 °C og gDNA (grønn kurve) på både 75,1 °C og 79,8 °C. Både prøven med  $dH_2O$  og gDNA viser dannelse av primer-dimer. Urinprøvenummer K20 er fremstilt i lilla. B: Alle urinprøvene viser bånd på i overkant av 150 bp, med noen små variasjoner. gDNA og  $dH_2O$  viser dannelse av primer-dimer på i underkant av 100 bp. I tillegg viser gDNA et bånd på størrelse med urinprøvene. Den øverste raden viser et bånd på omkring 20 bp, som trolig er primere. I den nederste raden har disse båndene vandret ut av gelen.

### 3.2 Luminex-analyse

Luminex-resultatet fra blandingsprøvene av HPV 16 og HPV18 MGP-amplikon amplifisert med SYTO®9, er fremstilt i Figur 19. Resultatet viser at HPV16 kan påvises i en blanding ned til 0.1 % og HPV 18 kan påvises ned til 1 %. Alle prøvene med gDNA og  $dH_2O$  er negative for begge genotyper. Ettersom alle prøvene har gått i platå i PCR i forkant av Luminex-hybridisering er analysen ikke kvantitativ.



Figur 19: Luminex-resultater for blandingsprøvene av HPV 16 og HPV 18, amplifisert med SYTO®9 (Tabell 1). Deteksjonsgrensene for svakt positive prøver er merket med en stiplet vannrett linje og grensen for positive prøver er merket med en sammenhengende vannrett linje. Deteksjonsgrensen for svakt positive HPV 16 var 12,32 log (MFI) og for positive prøver var deteksjonsgrensen 24,64 log (MFI). For HPV 18 var deteksjonsgrensen for svakt positive og positive prøver henholdsvis 29,7 og 59,4 log (MFI).

Luminex protokollen utviklet av Söderlund et. al. [48] baseres på PCR-reaksjon uten SYTO®9, som dermed utelukker en smeltepunktanalyse av HPV-amplikonene før Luminex. I håp om å utføre både DNA-smeltepunkt- og Luminex-analyse på de samme PCR-produktene, hadde denne oppgaven til hensikt å sammenlikne Luminex-resultatene både med og uten SYTO®9. Denne sammenstillingen er vist i Figur 20 og Tabell 4.

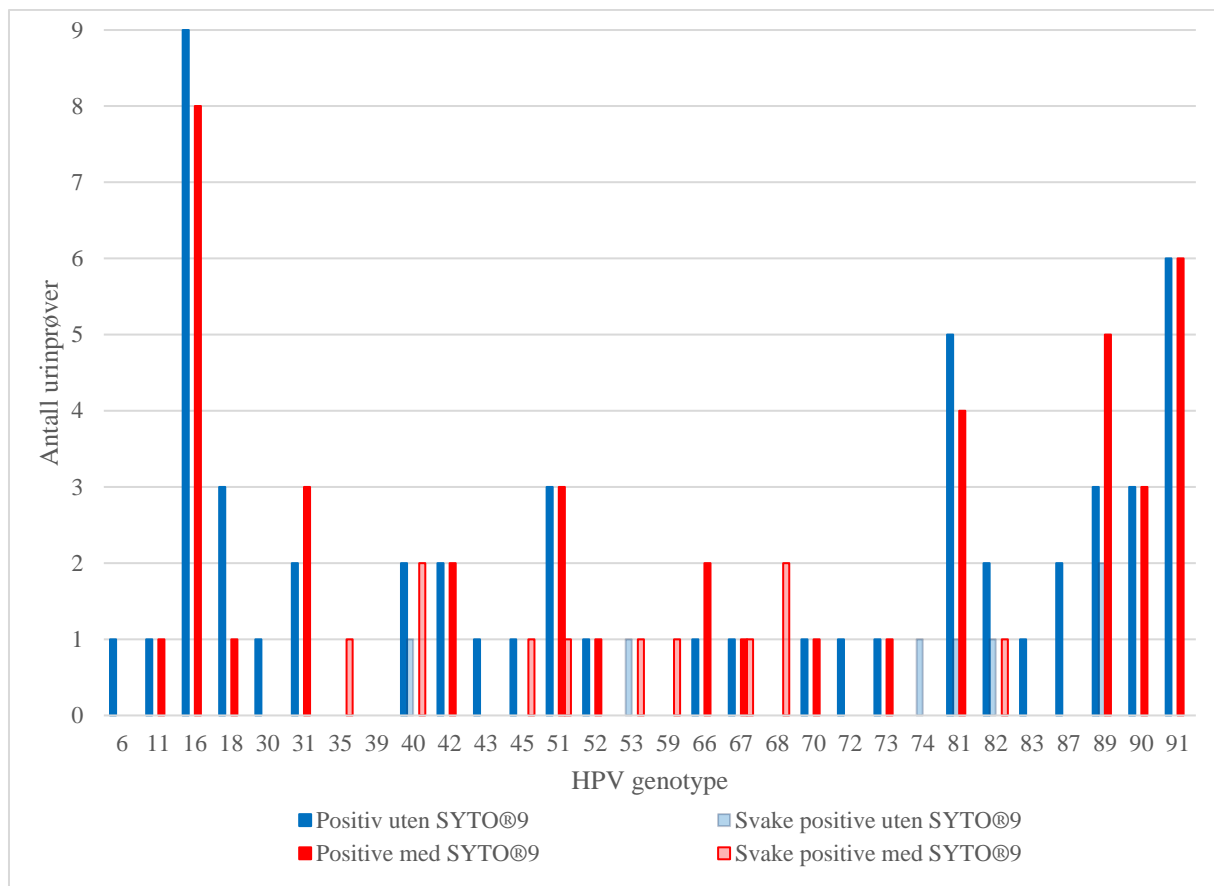
De fire positive MGP1-4 kontrollene (Tabell 3) med konsentrasjon på 100 kopier/ $\mu$ L, amplifisert med SYTO®9, ga alle positivt resultat bortsett fra HPV 33 og HPV 58 som ga negative resultater (tilsvarende 87,5 % påvisningsrate). På tross av at det forventes at MGP1-4 er positive er det likevel valgt å inkludere disse resultatet i oppgaven, under forutsetningen om at HPV 33 og HPV 58 underestimeres, da det ikke var mulig å gjenta forsøket (Vedlegg tabell 3).

Ved 10 kopier/ $\mu$ L ga HPV 31, HPV 52, HPV 56 (i MGP 7) og HPV 35 svakt positive resultater. HPV 33, HPV 58, HPV 56 (i MGP 8) og HPV 68 ga negative resultater. Dette samsvarer med forventningene om at svakere konsentrasjon av HPV svekker mulighetene for HPV-deteksjon. Ettersom Luminex-analysen av svakt positive resultater ikke ble gjentatt, må disse prøvene inkluderes enten som positive eller negative. Ved å godta svakt positive resultater som positive, ble 85,7 % av alle genotypene i MGP-kontrollene med 10 kopier/ $\mu$ L påvist. Ved å godta svakt positive resultater som negative resultater ble 64,3 % av genotypene i disse kontrollene påvist (Vedlegg tabell 3).

Analysen med SYTO®9 viste at urinprøve K1 og K13 var positiv for HPV 56. Ettersom prøben for HPV 56 ikke ble benyttet i analysen uten SYTO®9, er disse urinprøvene utelukket fra de følgende utregningene. Det totale antallet urinprøver for denne sammenlikningen er dermed 18.

Figur 20 angir hvor mange ganger hver genotype ble påvist tilsammen i alle 18 urinprøvene. Figuren skiller mellom analyser gjort med og uten SYTO®9, samt svakt positive og positive resultater (se figurtekst for nærmere forklaring). Analysen med SYTO®9 påviste HPV 16 i 44 % (8/18) av prøvene, og analysen uten SYTO®9 påviste HPV 16 i 50 % (9/18) av prøvene. HPV 16 er dermed genotypen med høyest forekomst. Videre påviser begge analysene HPV 91 i 33 % (6/18) av alle urinprøvene, noe som gjør HPV 91 til genotypen med nest høyest forekomst.

Svake positive resultater ble påvist 11 ganger for hver analysen med SYTO®9, og 7 ganger i analysen uten SYTO®9. Analysen ble ikke gjentatt for de svakt positive prøvene, grunnet tidsmangel. Oversikt over hvilke genotyper som ble påvist i de forskjellige urinprøvene fremkommer av Tabell 8.



Figur 20: Antall deteksjoner av de forskjellige HPV genotypene, i alle de 20 urinprøvene. Resultatene fra analysen uten SYTO®9 i reaksjonsblandingen fremkommer av de blå søylene og resultatene fra analysen med SYTO®9 i reaksjonsblandingen fremkommer av røde søyler. Svakt positive resultater vises i svake farger.

Sammenlikning av antall HPV-infeksjoner i urinprøvene påvist av de to Luminex-analysene, viser at Luminex-analysene uten SYTO®9 påviste 22 % (54-42/54) flere positive infeksjoner enn analysen med SYTO®9. Ved å inkludere svakt positive i sammenlikningen påviste

analysen uten SYTO®9 13 % (61-53/61) flere infeksjoner enn analysen med SYTO®9 (Tabell 4). Dette kan bety at fluoroforet har en interfererende effekt på Luminex-metodikken.

Tabell 4: Det totale antallet svakt positive og positive HPV-infeksjoner, med og uten SYTO®9 i PCR mastermiksen.

	Med SYTO®9	Uten SYTO®9
Positive HPV infeksjoner	42	54
Svakt positive HPV infeksjoner	11	7
Totalt	53	61

Mellom Luminex-analysene med og uten SYTO®9 viser 44 % (urinprøvenummer 2, 3, 5, 7, 11, 12, 14 og 15) av urinprøvene fullstendig overensstemmelse, 11 % (urinprøvenummer 3 og 8) viser én genotype forskjell, 17 % (urinprøvenummer 9, 16, og 18) viser to genotyper i forskjell og 28% (urinprøvenummer 4, 6, 17, 19 og 20) viser mellom 3 og 6 genotyper i forskjell. Hvilke genotyper som ble påvist i de forskjellige urinprøvene fremkommer av Tabell 5.

Tabell 5: Oversikt over hvilke genotyper som ble påvist som positive i urinprøvene, i de to forskjellige Luminex-analysene. Urinprøvenummer K1 og K13 er utelukket fra sammenlikningen, ettersom analysen med SYTO®9 viste de som positive for HPV 56 og denne proben ikke er inkludert i analysen uten SYTO®9. Analysen uten SYTO®9 påviste urinprøve K19 som positiv for HPV 58 og urinprøve K20 som positiv for HPV 33. Disse infeksjonene er her utelukket fra resultatene da MGP-kontrollene for analysen med SYTO®9 var negativ for disse genotypene. Svakt positive resultater er utelatt.

Urinprøve nr.	Luminex uten SYTO®9	Luminex med SYTO®9
K1	16, 51, 82	51, 56*
K2	70, 90	70, 90
K3	16, 31, 42, 89	16, 31, 42, 89
K4	18, 81, 90	89, 90
K5	18, 81, 89	18, 81, 89
K6	16, 30, 45, 52, 40, 72, 82, 90, 91	16, 31, 90, 91, 52
K7	11, 66	11, 66
K8	51, 82, 89, 91	51, 89, 91
K9	16, 6, 40, 81, 91	16, 81, 91
K10	16, 18, 31	16, 31
K11	16	16
K12	42, 81	42, 81
K13	11, 39, 40, 52, 66	39, 56*, 66
K14	16, 73	16, 73
K15	83, 91	83, 91
K16	16, 51	Negativ
K17	16	51, 89, 91
K18	6, 16, 87	16
K19	43, 81, 87, 91 (58)	16, 51, 66, 81, 87, 91
K20	51, 67, 91 (53)	Negativ

\*Proben for HPV 56 var ikke inkludert i Luminex-analysen uten SYTO®9 i PCR mastermiksen.

### 3.3 Sanger-sekvensering

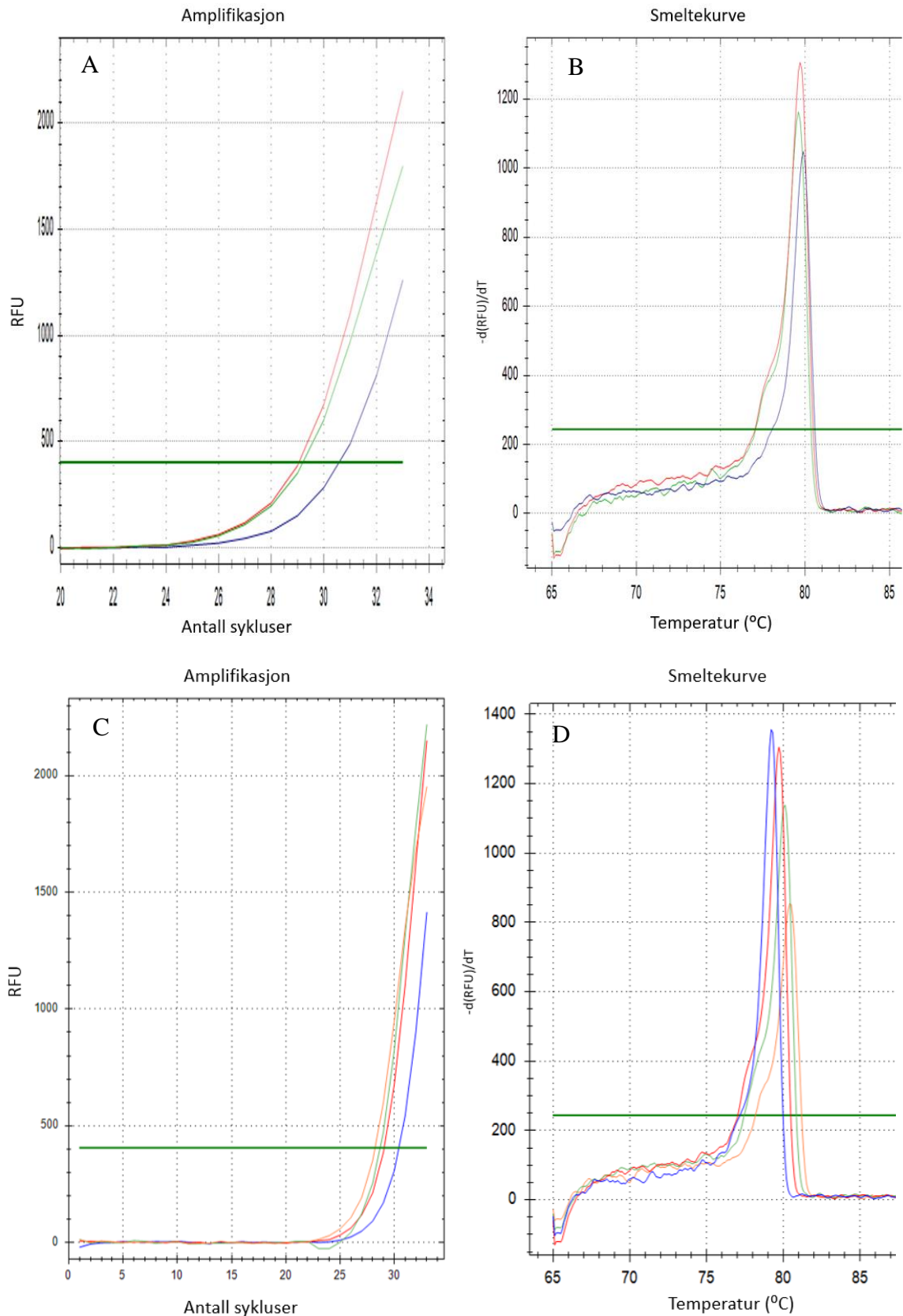
#### 3.3.1 Optimalisering av forberedende PCR-reaksjoner

##### 3.3.1.1 M13-haleprimer

Optimaliseringen av PCR med M13-haleprimere viste best resultater ved primerhybridiseringstemperatur på 59 °C og 3 mM MgCl<sub>2</sub> for både HPV 16 og HPV 18. Resultatene fra optimalisering av HPV16 er vist i Figur 21 A og B, mens optimaliseringsresultater av HPV 18 fremkommer av Vedlegg figur 2.

DNA-smeltepunktanalysen av både optimaliseringsprøvene i Figur 21, blandingsprøvene med HPV 16 og HPV 18 (Vedlegg figur 3) og urinprøvene (Vedlegg figur 5) amplifisert med M13-haleprimere viser en tydelig smeltekurve med en ekstra liten utflating på venstre side. Dette viser at ikke alle HPV MGP-amplikonene har fått M13-haleprimere inkorporert. Dermed er disse DNA-sekvensene kortere og har en lavere smeltetemperatur. Likevel hadde tilstrekkelig mengde av amplikonet inkorporert M13-haleprimere, slik at Sanger-sekvensering kunne utføres.

Smeltepunktanalysen av blandingsprøvene med HPV 16 og HPV 18 (Vedlegg figur 3) og urinprøvene viser god overensstemmelse med tilhørende agarosegel (Vedlegg figur 4 og Vedlegg figur 5) som viser et bånd for alle prøvene på omkring 200 bp (som forventet).



Figur 21: DNA-smeltepunktsanalyse for optimalisering for amplifisering av HPV 16 med M13-haleprimere. A og B: 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Grønn kurve: Primerhybridisering ved 55 °C, C<sub>i</sub> på 29,2 og S<sub>t</sub> på 79,6 °C. Rød kurve: Primerhybridisering ved 59 °C, C<sub>i</sub> på 29,1 og S<sub>t</sub> på 79,7 °C. Blå kurve: Primerhybridisering ved 64 °C, C<sub>i</sub> på 30,6 og S<sub>t</sub> på 79,9 °C. C og D: Primer hybridiseringstemperatur på 59 °C. Blå kurve: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 30,4 og S<sub>t</sub> på 79,2 °C. Rød kurve: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 29,1 og S<sub>t</sub> på 79,7 °C. Grønn kurve: 4 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 28,7 og S<sub>t</sub> på 80,1 °C. Oransje kurve: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 28,2 og S<sub>t</sub> på 80,4 °C. Forholdene som videre er benyttet er fremstilt i røde korver.

### 3.3.1.2 M13-sekvenseringsprimer

For å få lesbar sekvens helt inntil primerne ble sekvenseringsreaksjonen optimalisert ved bruk av ulike BigDye kit og primerkonsentrasjoner som nærmere beskrevet i avsnitt 2.2.3.2. DNA-sekvensene fra HPV 16 og HPV 18 viste at Sanger-sekvenseringen ga best resultater ved bruk av BigDye kit versjon 3.1, primerhybridiseringstemperatur på 55 °C, 50 sykluser og primerkonsentrasjon på 3,2 µM (data ikke vist). DNA-sekvensen syntetisert fra sens M13-sekvenseringsprimer ga betraktelig bedre resultater enn antisens M13-sekvenseringsprimer (data ikke vist).

## 3.3.2 Sanger-sekvenseringsresultater

### 3.3.2.1 HPV 16 og HPV 18

Figur 22 viser DNA-sekvensene til blandingsprøvene av HPV 16 og HPV 18 (Tabell 1), generert av Sanger-sekvensering. DNA-sekvensene er sammenstilt med referansegenomet til de samme genotypene, ved bruk av programvaren BioEdit. Ved nukleotid BLAST-søk av DNA-sekvensene sekvensert med sens M13-sekvenseringsprimer, ble blandingsprøvene ned til 20 % HPV 16 (prøvenummer 11, Tabell 1) genotypet som HPV 16, og blandingsprøvene ned til 99 % HPV 18 (prøvenummer 14, Tabell 1) ble genotypet som HPV 18 (Tabell 7). Dette kommer tydelig frem i Figur 22 hvor disse prøvene har svært like DNA-sekvenser som referansegenomene. Prøvene med 14 % og 10 % HPV 16 (prøvenummer 12 og 13, Tabell 1) ga ikke signifikante treff med noen genotyper. Dette er i overensstemmelse med DNA-sekvensene i Figur 22, hvor sekvensene til disse to prøvene ikke ligner hverken på HPV 16 eller HPV 18. Multiple infeksjoner ble ikke påvist i noen av blandingsprøvene. Ved nukleotid BLAST-søk av prøvene sekvensert med antisens M13-sekvenseringsprimer ble det i tillegg ikke bestemt noen genotype i blandingen med 50 % og 25 % HPV 18 (prøvenummer 9 og 10, Tabell 1).

### 3.3.2.2 Urinprøver

Nukleotid BLAST-søk av DNA-sekvensen fra urinprøvene generert fra Sanger-sekvensering, ga signifikante treff med én HPV genotype i 75 % (15/20) av prøvene. De resterende 25 % av prøvene ga uleselig DNA-sekvens og ingen signifikante treff med noen genotype ved BLAST-søk (Tabell 8). Det ble ikke påvist multippel infeksjon i noen av urinprøvene ved bruk av Sanger-sekvensering.

Figur 22 C viser DNA-sekvensene til urinprøve K3 og K6 generert fra Sanger-sekvensering, som er inkludert her som et eksempel på DNA-sekvensene til HPV isolert fra urinprøvene. På tross av at både K3 og K6 ble vist som positive for HPV 16 i begge Luminex-analysene (Tabell 5) vises K6 her som negativ for HPV 16. Derimot viser Sanger-sekvensering at K3 er positiv for HPV 16. Dette kommer tydelig frem i sekvenssammenstillingen hvor K3 har relativt lik sekvens som referansegenomet til HPV 16. Derimot viser sekvensen til K6 flere ulikheter sammenliknet med referansegenomet. For videre sammenlikning mellom metodene se avsnitt 3.5.

**A**

```

HPV16 K02718 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820
TTTGTAACTGGTGGTGGATGACCACTCCCACTCCCAATTTAAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCTCTGACCTGGGCAATTGAGTGGTCCAAATTTAAGCAATAGTAGCAGACATGTTGAGGAAATATGATTTTTCAGTTTATTTTTCACAA
16 CGA...KC.G.A...
19,99% HPV16 CGG...TGC.K.R.A...
20% HPV16 CGA...CR.AR.GA...
86% HPV16 CGA...GC...G.A...
86% HPV16 CGA...TG...G.A...
92% HPV16 CGA...K.G.A...
50% HPV16 CGA...GK.WG...
80% HPV16 CGA...G.WG...
75% HPV16 CGA...K.G.WG...
80% HPV16 CGA...K.G.WG...
86% HPV16 CGA...K.G.WG...
99,99% HPV18 G...G.W.K.CW...
99% HPV18 G...G.GW...
99% HPV18 G...AGRW...
18 GGG...GG.GW...
GGG.A.GG.G...TCMTCSSMRK.C.T.TAACA...

```

**B**

```

HPV18 X05015 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810
TTTGTAACTGGTGGTGGATGACCACTCCCACTCCCAATTTAAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCTCTGACCTGGGCAATTGAGTGGTCCAAATTTAAGCAATAGTAGCAGACATGTTGAGGAAATATGATTTTTCAGTTTATTTTTCACAA
18 GGG.A.G.GT...
99,99% HPV18 GGG...G.GW.G...
99,99% HPV18 G...GT.GW...
99% HPV18 G...A.KGW...
86% HPV18 GCM.K.GCMGN.T.YG...
86% HPV18 G...K.GCMG.T.M.YG...
86% HPV18 GT...K.WG.T.T.A.G...
75% HPV18 CG...K.K.WG.A...
50% HPV16 G...K.WG...
80% HPV16 CG...G.WG...
86% HPV16 CG.A.TGT...G...
90% HPV16 CG.GC...G.A...
99% HPV16 CA...K.G.A...
99,99% HPV16 CGA...CR.AR.GA...
16 CGA...TGC.K.K.A.T.A.G...
CGA...K.C.G.A.T.A.G...

```

**C**

```

HPV16 K02718 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820
ATTGGTTAAGTGGTGGTGGATGACCACTCCCACTCCCAATTTAAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCTCTGACCTGGGCAATTGAGTGGTCCAAATTTAAGCAATAGTAGCAGACATGTTGAGGAAATATGATTTTTCAGTTTATTTTTCACAA
K3 C.GA.TA.C.G...G...
K6 GRC.CK...GA...

```

Figure 22: Sammenstilling av blandingssprøvene og urinprøve K3 og K6 mot HPV 16 og HPV 18 referansegenom, utført ved bruk av programvaren BioEdit. Konserverte baser er merket med prikk. R: Purin (adenin eller guanin), Y: Pyrimidin (cytosin eller uracil), W: Adenin eller thymin, M: Adenin eller cytosin, S: Cytosin eller guanin, K: Guanin eller thymin. A: Prøvene ned til 20% HPV 16 viser stor likhet med referansesekvensen til HPV 16. B: Prøvene ned til 99% HPV 18 viser stor likhet med referansesekvensen til HPV 18. C: Urinprøve K3 viser likhet med referansesekvensen til HPV 16. Dette gjelder derimot ikke urinprøve K6.



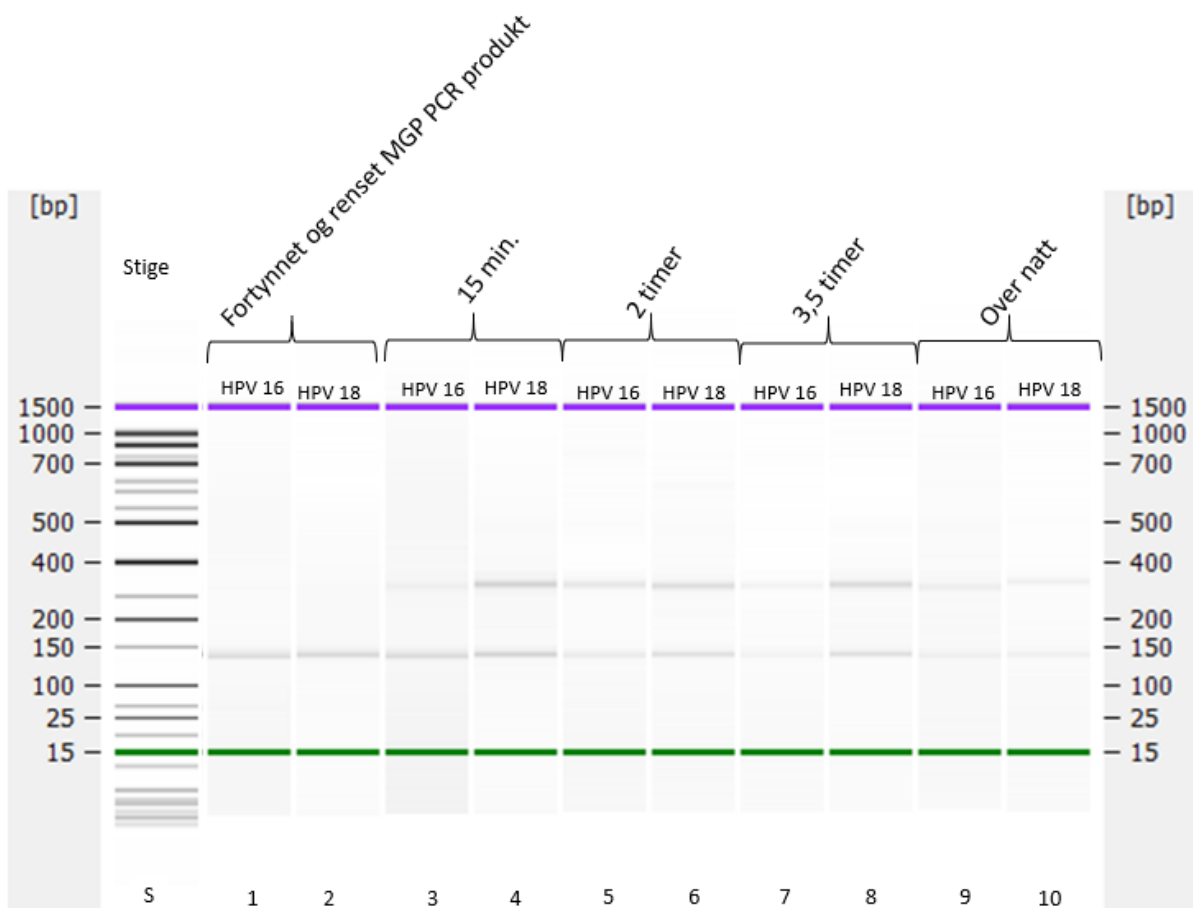
## 3.4 Nestegenerasjons sekvensering (NGS)

### 3.4.1 Optimalisering av bibliotekpreparering

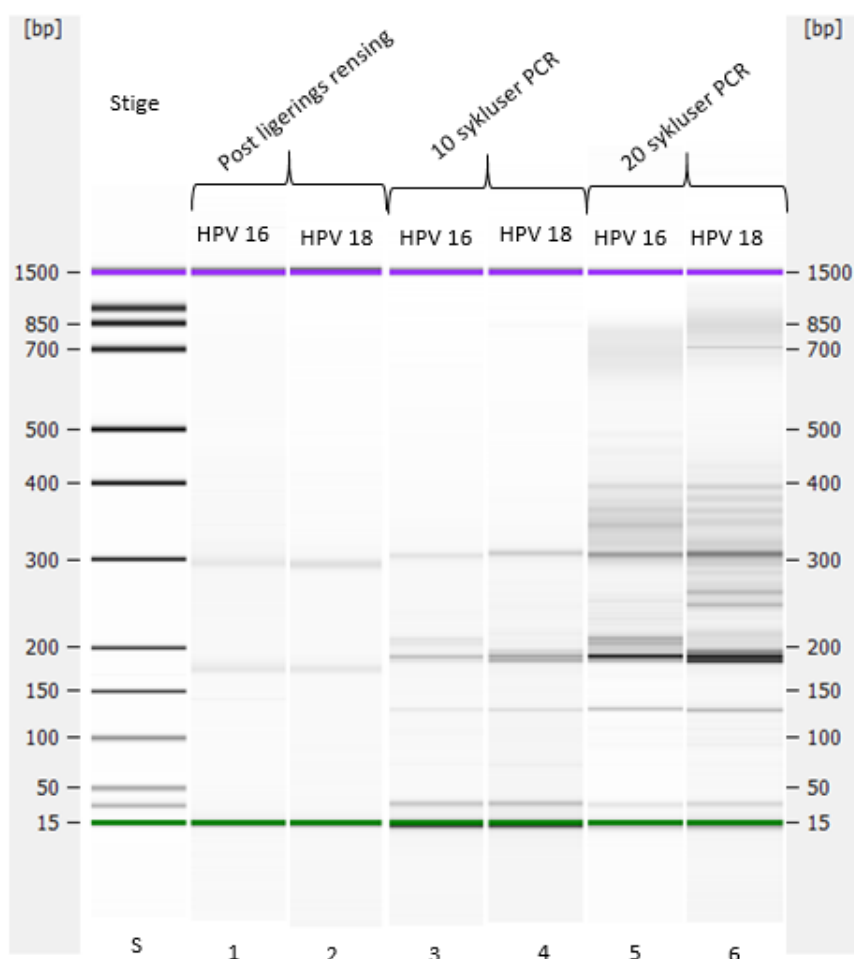
#### 3.4.1.1 Bibliotekpreparering med KAPA BIOSYSTEMS HyperPlus Kit 500 bp

For optimalisering av bibliotekspreparering slik som beskrevet i KAPA protokollen ble det testet med ulike fortynninger av MGP-amplikonet tilsatt i reaksjonen for endereparasjon og A-haling. Fortynning på 1:1 ga best resultater. Ved 1:100 og 1:10 000 fortynninger ble svært lite av PCR produktet adapterligert (data ikke vist).

Resultatet for variasjon av adapterligeringstiden fremkommer av Figur 23, hvor bare en andel av PCR-produktet er ligert. Brønn 1 og 2 viser et bånd på i underkant av 150 bp (noe kortere enn forventet) som er det 1:1 fortynnet og rensede MGP-amplikon av HPV 16 og HPV 18. Brønn 3 til 10 viser HPV MGP-amplikon ligert med NGS adaptore ved ulike ligeringsstider. Disse brønnene viser to bånd, ett på rett under 150 bp og ett på omkring 300 bp. Båndet på 300 bp er adapterligert, og båndet som er i underkant av 150 bp er ikke adapterligert. Økning i ligeringsstid fra 15 min til 2 og 3,5 timer, ga ikke mer adapterligert produkt. Inkubering over natten viser noe lavere dannelse av adapterligert produkt. Prøvene ligert i 15 min ble benyttet i de videre reaksjonene.



Figur 24 brønn 1 og 2 viser HPV 16 og HPV 18 MGP-amplikonene etter liggering og postligeringsrensing. For rensingen ble 0,8x konsentrasjon av paramagnetiske kuler benyttet, da optimaliseringsprosessen viste dette som mest effektivt (data ikke vist). Likevel har rensingen ikke klart å fjerne biproduktet på 180 bp, som dermed vises i alle brønnene i figuren. Alle brønnene viser også et bånd på omkring 300 bp som er det korrekte ligerte produktet. Brønn nummer 3 til 6 viser produktet som er adapterligert, rensert (0,8x) og amplifisert ved 10 eller 20 sykluser PCR. Amplifisering ga en svært liten økning i konsentrasjonen av produkt på 300 bp, men derimot en økning av biproduktet på 180 bp. Dette vises spesielt i prøvene som er amplifisert med 20 PCR-sykluser. Alle prøvene amplifisert med 10 eller 20 PCR-sykluser viser også dannelse av andre ulike biprodukter. Båndene på 180 bp er noe lengre enn DNA-sekvensen til HPV MGP-amplikonet og båndet på 300 bp er noe lengre enn den forventede lengden på det adapterligerte produktet. Ettersom begge båndene er lengre enn forventes antas det at stigen i gelen er noe missvisende. Prøvene som ble amplifisert med 10 sykluser ble sekvensert, hvor resultater fremkommer i avsnitt 3.4.2.2.



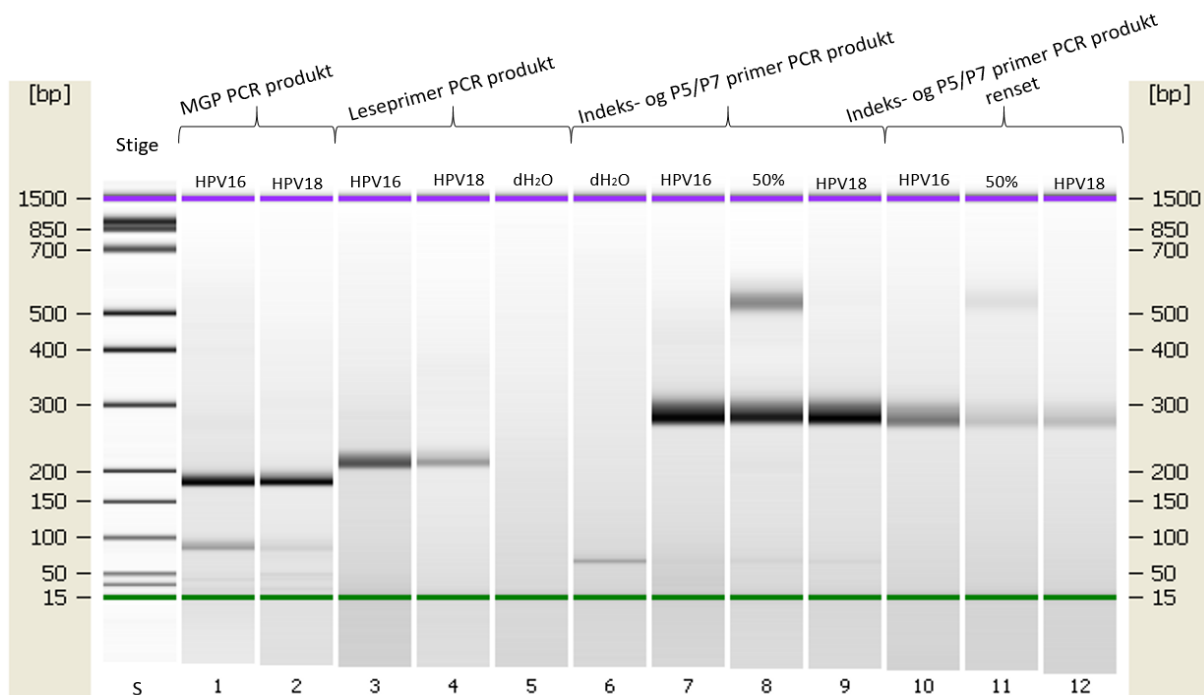
Figur 24: Gelbilde fra Agilent 2100 BioAnalyser. Brønn 1 og 2 viser DNA etter adapterligering i 15 min og rensing med paramagnetiske kuler (0,8x konsentrasjon). Brønn 3 til 4 er produkt etter 10 PCR-sykluser, mens brønn 5 til 6 er produkt etter 20 PCR-sykluser. Båndene på 300 bp er adapterligert, men båndene på 180 bp er for korte til å være korrekt adapterligert. For alle tre gruppene er den første brønnen HPV 16 og den neste HPV 18. Økning i antall PCR-sykluser ga økning i konsentrasjonen av amplikonet på 180 bp, men ikke betydelig økning av amplikonet på 300 bp.

### 3.4.1.2 PCR-basert bibliotekpreparering for NGS

Optimaliseringsresultatene for PCR-reaksjonene med ett og ett primerpar ble utført med HPV 16 og er vist i vedlegg figur 6, 7 og 8. Ved å tilsette alle 3 primerparene i en reaksjon, ble produktet aldri lengre enn 200 bp som kan tyde på at indeksprimerne ikke ble inkorporert (data ikke vist). Amplifisering med lese- og indeksprimerne i samme PCR-reaksjon ga uspesifikke bindinger og biprodukter (data ikke vist).

Derimot ga amplifisering med leseprimerparet (1 ng/ $\mu$ L) i en separat reaksjon, etterfulgt av en PCR-reaksjon med både indeks- og P5/P7 primerparene (1 ng/ $\mu$ L) ønsket lengde på amplikonet. Optimal temperaturprofil for PCR reaksjonene ble bestemt til 32 sykluser med 95 °C i 10 sek, 55 °C i 45 sek og 72 °C i 72 sek for reaksjonene med leseprimerparet. For reaksjonene med indeks- og P5/P7 primerparet ble den beste temperaturprofilen bestemt til 32 sykluser av 95 °C i 10 sek, 68 °C i 45 sek og 72 °C i 72 sek.

Resultatet av HPV 16, HPV 18 og en blanding med 50 % av hver genotype, amplifisert med alle tre primerparene, med de optimaliserte reaksjonsbetingelsene som gitt over, er vist i Figur 25. Brønn nummer 1 og 2 i denne figuren viser MGP-amplikonet på omkring 180 bp (noe lengre enn forventet), samt noen små bånd på omkring 25 bp og 70 bp. Brønn 3 og 4 viser at PCR-produktet øker til rett over 200 bp (som forventet) ved amplifisering med leseprimere. Videre viser brønn 5 at leseprimerne ikke danner noen biprodukter. Dette skjer derimot i brønn 6, som viser at indeks- og P5/P7 primerparet danner primer-dimer på omkring 80 bp. Brønn 7 til 9 viser at PCR-produktet øker til omkring 300 bp (som forventet), ved amplifisering med indeks- og P5/P7 primerparene. Disse brønnene viser også svake bånd på omkring 80 bp. I prøven med 50 % blanding av HPV 16 og HPV 18, viser brønn 8 at indeks- og P5/P7 primerparene har dannet et langt biprodukt på omkring 600 bp. Brønn 10 til 12 viser de samme PCR-produktene, men etter rensing med Illustria ExoProStar (GE Healthcare). I disse prøvene har de korte sekvensene på 80 bp blitt fjernet, samtidig som båndene på 300 og 600 bp har blitt svakere. Dette viser at amplifisering av MGP HPV-amplikonet med leseprimere etterfulgt av amplifisering med både indeks- og P5/P7 primerparene ga riktig økning i lengden på DNA-sekvensene. Dermed har primerne blitt inkorporert slik som ønsket.



Figur 25: Gelbilde fra Agilent 2100 BioAnalyzer, for optimalisering av PCR-basert bibliotekpreparering for NGS. Produktet i brønn nummer 1 og 2 er på 181 bp, noe som er litt lengre enn forventet. De resterende brønnene har forventet lengde på PCR-produktene, som viser at primerne er riktig tilsatt. Brønn nummer 8 og 11 er prøver med 50% HPV 16 og 50% HPV 18.

### 3.4.2 NGS sekvenseringsresultater

#### 3.4.2.1 Resultater med protokoll for KAPA BIOSYSTEMS HyperPlus Kit 500 bp

Sekvensering på MiSeq, Illumina, av et utvalg av blandingsprøvene (25 %, 50 % og 75 %) av HPV 16 og HPV 18 (prøvenummer 1, 7, 8, 9 og 17, Tabell 1), preparert slik som beskrevet i protokollen til KAPA, viste at en svært lav andel av genererte DNA-sekvenser var HPV-sekvenser i sammenstilling med HPV 16 eller HPV 18 referansegenom. Likevel ble alle tre blandingsprøvene genotypet som både HPV 16 og HPV 18, og prøvene med 100 % HPV 16 og 100 % HPV 18 ble bare genotypet som den gjeldende genotypen. Genotyping ble gjort ved sammenstilling mot referansegenom. Dette forekommer av Tabell 6.

Tabell 6: Resultatene for sammenstilling av blandingsprøvene med HPV 16 og HPV 18, til referansegenom (HPV 16 genbanknummer: K02718, HPV 18 genbanknummer: X05015). Sammenstillingsraten viser prosentandelen av det totale antallet sekvenser i hver prøve, som lot seg sammenstille med referansegenomet for HPV 16 og HPV 18. Alle prøvene er preparert slik som beskrevet i protokollen til KAPA protokollen.

Prøve	Totalt antall MiSeq-leste sekvenser	Rate (%) for sammenstilling med referansegenom	
		HPV16	HPV18
HPV 16	80924	4,81	-
75 % HPV 16, 25 % HPV 18	84854	0,28	0,05
50 % HPV 16, 50% HPV 18	92351	0,43	0,14
75% HPV 18, 25 % HPV 16	109643	0,23	0,13
HPV 18	91314	-	1,94

### 3.4.2.2 Optimalisert protokoll for KAPA BIOSYSTEMS HyperPlus Kit 500 bp

Dårlig utbytte ved bruk av standardprotokollen til KAPA førte til et behov for å forbedre protokollen. Med optimalisert protokoll for HPV 16 ble totalt antall parvis DNA-sekvenser fra MiSeq på 1 305 300, hvorav 79 % (1 024 572 sekvenser) ga likhet med HPV 16 referansegenom (genbanknummer NC\_001526,4). Tilsvarende ga prøven med HPV 18 et totalt antall DNA-sekvenser på 1 577 242, hvorav 48 % (750 930 sekvenser) ga likhet med HPV 18 (genbanknummer NC\_001526,4). DNA-sekvensene som ikke lot seg sammenstille med hverken HPV 16 eller HPV 18 ga i stor grad signifikante treff som bakteriofag PhiX ved nukleotid BLAST-søk. DNA av PhiX er inkludert i sekvenseringen av tekniske årsaker, se avsnitt 4.4.

## 3.5 Sammenlikning av metodene

Resultatene fra HPV-deteksjon i blandingsprøver av HPV 16 og HPV 18, analysert med de 4 ulike analysemetodene som inngikk i oppgaven er sammenstilt i Tabell 7. Dataene viser at smeltepunktanalyse kan påvise både HPV 16 og HPV 18 ned til 10 %. Luminex-analysen klarer å påvise HPV 16 ned til 0,1 % og HPV 18 ned til 1 %. Mellom disse intervallene klarer både smeltepunkt- og Luminex-analysen å påvise både HPV 16 og HPV 18. Sanger-sekvensering gir lesbar sekvens for HPV 16 ned til 75 % og HPV 18 kun ned til 99 %. Videre klarer ikke denne metoden å påvise blandinger av HPV 16 og HPV 18 og detekterer dermed ikke noen av genotypene i prøvene med mellom 50 % og 10 % HPV 16. Både Luminex-analyse og Sanger-sekvensering viser bedre deteksjon av HPV 16 enn HPV 18. NGS klarte å detektere både HPV 16 og HPV 18 i blandinger med 75 %, 50 % og 25 % av begge genotypene. Dette på tross av at en svært lav andel av de genererte sekvensene var mulig å sammenstille med referansegenomene. Prøvene som er markert grått i kolonnen for NGS ble ikke genotypet med denne metoden, grunnet tidsmangel.

Tabell 7: Sammenlikning av de forskjellige metodene sine muligheter for HPV-deteksjon i blandingsprøver med HPV 16 og HPV 18. DNA-Smeltepunktsanalyse påviser både HPV 16 og HPV 18 ned til 10 %. Luminex-analyse påviser HPV 16 ned til 0,1 % og HPV 18 ned til 1 %. Sanger-sekvensering påviser HPV 16 ned til 25 % og HPV 18 ned til 99 %. Denne metoden påviser ikke multiple infeksjoner. NGS påviste både HPV 16 og HPV 18 ved 25 %, 50 % og 75 % av begge genotypene, samt prøvene med 100 % av hver genotype. Prøvene som er merket i grått ble ikke sekvensert på NGS, grunnet tidsmangel.

Prøve	Smeltepunktsanalyse	Luminex-analyse	Sanger-sekvensering	NGS
16	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16
99,99 % 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16	
99,9 % 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16	
99 % 16	HPV 16	HPV 16/18	HPV 16	
90 % 16	HPV 16/18	HPV 16/18	HPV 16	
86 % 16	HPV 16/18	HPV 16/18	HPV 16	
80 % 16	HPV 16/18	HPV 16/18	HPV 16	
75 % 16	HPV 16/18	HPV 16/18	HPV 16	HPV 16/18
50 % 16	HPV 16/18	HPV 16/18		HPV 16/18
75 % 18	HPV 16/18	HPV 16/18		HPV 16/18
80 % 18	HPV 16/18	HPV 16/18		
86 % 18	HPV 16/18	HPV 16/18		
90 % 18	HPV 16/18	HPV 16/18		
99 % 18	HPV 18	HPV 16/18	HPV 18	
99,9 % 18	HPV 18	HPV 16/18	HPV 18	
99,99 % 16	HPV 18	HPV 18	HPV 18	
18	HPV 18	HPV 18	HPV 18	HPV 18

Resultatene fra påvisning av HPV i urinprøver omfatter kun Sanger-sekvensering og Luminex-deteksjon. Dette ettersom det var svært vanskelig å genotype HPV med smeltepunktsanalyse, og at tiden for denne oppgaven ikke strakk til for å sekvensere urinprøvene med NGS. Luminex-deteksjonene utført med og uten SYTO®9, påviste flest HPV-infeksjoner i sistnevnte analyse. Dermed ble kun disse resultatene benyttet for sammenlikning med resultatene fra Sanger-sekvensering (Tabell 8).

Luminex-analysen påviser mer enn én HPV-genotype i 90 % (18/20) av urinprøvene, mens Sanger-sekvensering med påfølgende nukleotid BLAST-søk ikke klarte å påvise multiple infeksjoner. Luminex-analysen påviste infeksjon av en eller to genotyper i 40 % (8/20) av urinprøvene, hvorav Sanger-sekvensering påviste infeksjon av én genotype i alle prøvene. Luminex påviste 3 genotyper i 25 % (5/20) av prøvene, hvorav Sanger-sekvensering ga signifikant treff for én genotype i 60 % (3/5) av prøvene. Videre påviste Luminex-analysen infeksjoner av 4, 5 eller 6 forskjellige genotyper i 30 % (6/20) av prøvene, hvor Sanger-sekvensering ga signifikant treff med kun én genotype i 67 % (4/6) av tilfellene. Luminex-analyse viste at urinprøve K6 var infisert med 9 genotyper, hvor ingen ble detektert ved Sanger-sekvensering og nukleotid BLAST-søk (Tabell 8). Dette viser at ved flere HPV-infeksjoner påviser Sanger-sekvensering kun én genotype eller gir uleselig DNA-sekvens.

Tabell 8: Resultat av hvilke HPV-genotyper som ble detektert i de to forskjellige testene. I Luminex-analysene er svakt positive resultater utelatt. I motsetning til Tabell 5 er prøve K1 og K13 inkludert i denne tabellen, ettersom forskjellen mellom de to Luminex-analysene ikke har noe påvirkning i denne sammenlikningen. Av samme grunn er HPV 58 i urinprøve K19 og HPV 33 i urinprøve K20 inkludert.

<b>Urinprøve nr.</b>	<b>Luminex uten SYTO®9</b>	<b>Sanger-sekvensering</b>
K1	16, 51, 82	56
K2	70, 90	90
K3	16, 31, 42, 89	16
K4	18, 81, 90	Uleselig sekvens
K5	18, 81, 89	18
K6	16, 30, 45, 52, 40, 72, 82, 90, 91	Uleselig sekvens
K7	11, 66	11
K8	51, 82, 89, 91	51
K9	16, 6, 40, 81, 91	Uleselig sekvens
K10	16, 18, 31	Uleselig sekvens
K11	16	16
K12	42, 81	81
K13	11, 39, 40, 52, 66	66
K14	16, 73	16
K15	83, 91	83
K16	16, 51	51
K17	16	51
K18	6, 16, 87	16
K19	43, 58, 81, 87, 91	81
K20	33, 51, 67, 91	Uleselig sekvens

## 4 Diskusjon

Ettersom livmorhalskreft og annen HPV-relatert kreft kan forebygges ved vaksinasjon, er det viktig med gode systemer og analysemetoder for overvåking av effekten av HPV-vaksinasjonsprogram. Som forklart i avsnitt 1.1.2 tar det gjennomsnittlige mellom 5 og 10 år fra initial HPV-infeksjon til utvikling av forstadiene til livmorhalskreft og opptil flere tiår for utvikling av livmorhalskreft. Dette gjør det vanskelig å undersøke hvorvidt HPV-vaksinen har ført til lavere andel HPV-assosiert kreft. Dermed er det bestemt å overvåke epidemiologien av HPV i befolkningen, som et resultat av innføringen av vaksinerne. Ettersom de forskjellige vaksinerne beskytter mot forskjellige genotyper (avsnitt 1.1.4) er det vesentlig at metodene som benyttes viser god sensitivitet for genotyping. I denne oppgaven har jeg derfor sammenlignet molekylære metoder for genotyping av HPV, spesielt med tanke på muligheten for å påvise multiple infeksjoner.

For den nasjonale HPV-overvåkingen har resultatene for den epidemiologiske forandringen blitt svært komplekse. Som beskrevet i avsnitt 1.1.4 ble de første kullene som mottok vaksine mot viruset tilbudt Gardasil®. I senere tid har både jenter i syvende klasse og kvinner i opphenningsprogrammet blitt tilbudt Cervarix®. Fra høsten 2018 blir gutter i syvende klasse tilbudt Cervarix®. Ettersom innføringen av vaksinen varierte i tid for de forskjellige gruppene i befolkningen, samt at vaksinerne beskytter mot forskjellige genotyper og har forskjellig kryssbeskyttelse er det vanskelig å bestemme den direkte effekten av de to vaksinerne. Midlertidige resultater (ikke publisert) viser også en flokkbeskyttelse, slik at også den uvaksinerte delen av befolkningen har lavere andel HPV. Dette bidrar også til å øke kompleksiteten for å måle effekten av vaksinerne. Resultatene av overvåkingen må dermed modelleres.

Utgangspunktet for overvåkingen av HPV er urinprøver, donert av kvinner i alderen 17 år. Det er utfordrende å undersøke HPV i urin, da prøvene kan gi falske negative resultater av flere grunner. Kvinnene oppfordres til å levere en «første-stråle-urinprøve», samt å sende prøvene til analyse direkte etter prøvetaking. Likevel kan senere urinstråler ha blitt samlet, som fører til et lavt celletall i prøven. Videre kan prøvene ha blitt oppbevart i romtemperatur over lengre perioder, slik at arvematerialet til HPV degraderes. Lite HPV kan gi stokastisk variasjon mellom parallelle analyser av samme urinprøve, noe som er en kjent utfordring i arbeid med HPV spesielt fra urin, men også i arbeid med celleprøver til klinisk diagnostikk [19, 51, 52].

Det er kjent at HPV-analyser basert på DNA isolert fra urinprøver, påviser færre infeksjoner sammenliknet med diagnostikk basert på celleprøver fra livmorhalsen [7, 32, 52, 53]. Undersøkelser av urinprøver fra 385 tilfeldige Skotske kvinner på 21 år, viste HPV i 32 % av prøvene. Samtidig ble det estimert, basert på celleprøver fra livmorhalsen, at 49 % av 20-åringene i landet var infisert med HPV [52]. Prevalensforskjellen kan forklares med et lavere antall HPV-kopier tilstede i urin, sammenliknet med celleprøver fra vev. Resultatet fra Skottland kan tolkes som at de detekterte HPV-infeksjonene i urinprøvene i denne oppgaven trolig er et underestimat av den faktiske HPV-prevalensen. Likevel regnes urin som et akseptabelt prøvemateriale for overvåkningsarbeid, gitt at analysemateriale er det samme for alle prøvegruppene hvor endring studeres.



## 4.1 MGP PCR og DNA-smeltepunktanalyse

I denne oppgaven ble bruk av PCR og DNA-smeltepunktanalyse for genotyping vist som uegnet ettersom mange av genotypene har svært lik smeltetemperatur. I tillegg hybridiserer MGP-primere med gDNA og gir biprodukt med en smeltetemperatur på både 71,5 °C og 79,8 °C (Figur 18), noe som er midt mellom smeltetemperaturen til ampliconet av flere HPV-genotyper. De negative kontrollene viser at MGP-primere også danner primer-dimer som er uheldig for reaksjons effektivitet. Både primernes hybridisering med gDNA og primer-dimer dannelse kan gi feiltolkninger ved bestemmelse av genotypene. Likevel kan PCR med påfølgende smeltepunktanalyse i motsetning til konvensjonell PCR, brukes til å direkte påvise hvorvidt urinprøven er positiv for HPV eller ikke. På denne måten kan negative prøver utelukkes fra videre analyser for genotyper karakterisering. For overvåkningsarbeidet kan dette bidra til å senke antallet prøver som må genotypes.

Det bør også stilles spørsmål til lengden på DNA-sekvensen til HPV MGP-ampliconene. Figur 23 viser at ampliconet er i underkant av 150 bp langt og Figur 25 viser at det samme ampliconet er omkring 180 bp langt. Dette på tross av at utgangsmaterialet for begge reaksjonene er de samme HPV-plasmidene som videre er amplifisert med de samme primerne, under de samme betingelsene. En forklaring på dette kan være uspesifikk stige i BioAnalyser-instrumentet.

En generell utfordring med multipleks PCR er den konkurrerende effekten mellom alle primerne. For HPV-genotyping ble primerne designet til å hybridisere til forskjellige genotyper (avsnitt 2.2.1) [54]. Dette kan føre til at enkelte av primerne hybridiserer bedre med enkelte genotyper enn andre, slik at ikke alle genotyper amplifiseres med samme effektivitet. Å inngå slike «kompromiss» på primersekvensene kan dermed resultere i falske negative prøvesvar [55-57]. Dette kan muligens sees i denne oppgavens deteksjonen av HPV 33 som er rapportert til å være en av de fem mest vanlige HPV-genotypene i livmorhalsen til europeiske kvinner [19]. Det er derfor oppsiktsvekkende at denne genotypen bare er påvist én gang (urinprøve K20 analysert uten SYTO®9) i de 20 urinprøvene analyser i denne oppgaven. Samtidig er det kjent at DNA-sekvensene i MGP-primere har flere ulikheter sammenliknet med DNA-sekvensen til L1-genet av HPV 33. Lav deteksjon av HPV 33 kan dermed skyldes designet av primerne. Resultatene stemmer overens med tidligere forskning [19]. Videre er PCR-amplifisering av virus utfordrende ettersom virus ofte kan mutere sitt genom. Flere slike punktmutasjoner er beskrevet for HPV samtidig som mange forskjellige subtyper av hver genotype er kjent [57-59]. Endringer i virusets nukleinsyresekvens for L1-genet kan medføre at MGP-primere hybridiserer dårligere. Slike mutasjoner kan også føre til at primerne ikke lengre er tilstrekkelig komplementære til virusets genom, slik at amplifisering av HPV ikke lar seg gjøre. Dette fører til et falske negative resultater. I tillegg peker uspesifikk hybridisering av MGP til gDNA (Figur 18) i retningen av at relative mengder gDNA kan gi negative utslag på deteksjonen av HPV, noe som stemmer med tidligere forskning [19, 58].

Bruk av konsensusprimere i en konkurrerende PCR-reaksjon kan også føre til en maskerende effekt av enkelte genotyper. Med dette menes at ved multiple infeksjoner detekteres kun de genotypene som er av overvekt i prøven eller har mest effektiv primerhybridisering. Genotypene som er lavere representert eller har lavere effektivitet i primerhybridiseringen vil ikke hybridisere med primerne og dermed ikke bli påvist (blir maskert av andre genotyper).

Ved infeksjon av bare én genotype vil denne genotypen bli påvist, uavhengig av hvilken genotype og mengde HPV som er tilstede i prøven. Dette fordi den ene genotypen ikke konkurrerer med andre genotyper om et utvalg primere. Innføring av vaksinasjon mot HPV vil trolig tilnærmet eliminere HPV 16 og HPV 18 fra den norske befolkningen. Dermed vil genotyper som tidligere ikke har blitt påvist grunnet maskerende effekter av HPV 16 og HPV 18, muligens påvises i undersøkelser av vaksinerte kvinner. Dette kan gi inntrykk av en økning i mengde av enkelte genotyper. Derimot er andelen infeksjoner av disse tidligere maskerte genotypene uendret mellom de to undersøkelsesgruppene, men påvisningen har blitt bedre grunnet eliminering av HPV 16 og HPV 18. Dette kan gi store systematiske utslag i overvåkingen.

## 4.2 Luminex-hybridisering

Luminex-analysen av blandingsprøvene med HPV 16 og HPV 18 viser best deteksjon av førstnevnte genotype. Den svake påvisningen av HPV 18, kan muligens forklares med den konkurrerende MGP PCR-reaksjonen som ser ut til å gi noe bedre amplifisering av HPV 16 sammenliknet med HPV 18 (Figur 17).

I resultatet av de to Luminex-analysene med og uten SYTO®9 viser bare 44 % av urinprøvene likhet. Ved utelukkende å vurdere positive resultater påviser analysen uten SYTO®9 22 % flere HPV-infeksjoner enn analysen med SYTO®9. Ved inkludering av svakt positive resultater påviser analysen uten SYTO®9 13 % flere infeksjoner (Tabell 4). Bruk av SYTO®9 øker bakgrunnsstøyen av det fluoriserende signalet, som kan gjøre det vanskeligere å skille negative og positive resultater. På den andre siden, bestemmes deteksjonsgrensene ut fra MFI til de negative kontrollene i hver analyse. Disse kontrollene er også amplifisert med SYTO®9 og det forventes derfor at de skal ha en bakgrunnsstøy som øker proporsjonal med økningen i bakgrunnsstøyen til de resterende prøvene. Dette tyder på at SYTO®9 ikke påvirker resultatene. Likevel bør bølgelengden til alle fluoroforene i reaksjonen diskuteres. SYTO®9 bundet til DNA eksiteres ved en bølgelengde på 485 nm, begge fluoroforene på kulene i Luminex-instrumentet eksiteres ved 635 nm og reportermolekylet i Luminex eksiteres ved 532 nm (avsnitt 1.2.2). Ettersom SYTO®9 eksiteres ved lavere bølgelengde enn begge alle tre fluoroforene i Luminex, er det grunn til å tro at SYTO®9 ikke påvirker resultatene fra Luminex-analysene. Derimot har disse bølgelengdene glidende overganger som kan påvirke hverandre. Ettersom Luminex-analysen med SYTO®9 påviste betraktelig færre infeksjoner enn analysen uten SYTO®9, er det grunn til å tro at fluoroforet har en infererende effekt på Luminex-metoden.

Likevel er det vanskelig å fastslå hvorvidt alle forskjellene i de to Luminexanalysene i denne oppgaven er grunnet SYTO®9. Varierende primer- og probehybridisering kan også ha påvirket resultatet. Eksempelvis kan kysshybridisering mellom prober ha forekommet i urinprøve K8, hvor analysen uten SYTO®9 påviser både HPV 51 og HPV 82. Derimot er den samme urinprøven analysert med SYTO®9 negativ for HPV 82 (Tabell 5). Tidligere forskning har vist at proben for HPV 82 kan krysshybridisere med HPV 51, som kan være forklaringen på de forskjellige resultatene for denne prøven [24]. Videre er det også kjent at høye konsentrasjoner av HPV 52 kan krysshybridisere med proben for HPV 66.

Standardavviket mellom de negative kontrollene for HPV 16 amplifisert uten SYTO®9 var lavere enn 5, og ble derfor justert til 5, slik som beskrevet i avsnitt 2.2.2. Dette ga en mye høyere deteksjonsgrense for HPV 16. Ved slike tilfeller er det en økt mulighet for at svakt positive genotyper ikke skiller seg fra deteksjonsgrensen og dermed påvises som falske negative resultater.

På tross av at prøvesvarene for HPV 33 analysert med SYTO®9 er underestimert i denne oppgaven, grunnet falskt negativt svar i MGP 2, ønsker jeg å kommentere disse resultatene. Urinprøvene K7 og K15 viser tydelig høyere MFI verdier for HPV 33 enn hva MGP 2 gjør (data ikke vist). Dermed er disse to urinprøvene trolig falske negative resultater. Som tidligere forklart har HPV 33 flere ulikheter i sekvensen sammenliknet med MGP primerne. Dårlig deteksjon av HPV 33, kan derfor skyldes dårlig hybridisering mellom primer og HPV 33 L1-genet. Det bør også nevnes at på lik linje med primerhybridiseringen i MGP PCR, kan virusgenomet muteres slik at probesekvensen ikke lengre er komplimenter til L1-genet.

### 4.3 Sanger-sekvensering

På samme måte som Luminex-resultatene viser nukleotid BLAST-søk av DNA-sekvensene fra Sanger-sekvensering bedre deteksjon av HPV 16 enn HPV 18 plasmidene. Igjen kan dette muligens tilskrives bedre MGP-amplifikasjon av HPV 16 enn HPV 18 (Figur 17). Videre viser nukleotid BLAST-søk av DNA-sekvensene fra blandingsprøvene med HPV 16 og HPV 18, at metoden ikke klarer å påvise multiple infeksjoner (Tabell 7). Dette stemmer med tidligere studie [60]. Analysen av urinprøvene viser at desto flere HPV-infeksjoner jo vanskeligere er det for Sanger-sekvensering og nukleotid BLAST-søk å påvise infeksjoner (Tabell 8). Således et dette en lite egent metode for påvisning av HPV i dette materiale som inneholder mye multiple infeksjoner. Derimot har metoden en stor fordel i at den ikke benytter sekvensspesifikke prober for påvisninger. Dette gjør at Sanger-sekvensering er mindre sårbar for krysshybridisering mellom prober som kan gi falske positive svar. Ved å ikke benytte prober er metoden heller ikke like sårbar for mutasjoner i DNA til HPV.

### 4.4 NGS

Sekvenseringen av HPV 16 og HPV 18 preparert med optimalisert KAPA-protokoll ga gode resultater, hvor henholdsvis 1 024 572 og 750 930 sekvenser ble genotypet til HPV 16 og HPV 18 ved sammenstilling mot gjeldende referansegеноm. Dette viser et godt antall riktige sekvenser, og denne metoden synes mulig å benytte i videre overvåkning for HPV.

Videre ga mange av DNA-sekvensene fra prøvene med HPV 16 og HPV 18 preparert med optimalisert KAPA protokoll, treff som bakteriofag PhiX ved nukleotid BLAST-søk. DNA av PhiX inkluderes i NGS sekvenseringer i prøver med et lavt mangfold, noe som var tilfellet i denne NGS-analysen. Dette for å gi presisjon i clusterjenkjenning. Videre brukes PhiX som en kvalitetskontroll både for sekvensering og sammenstilling. PhiX kontrollene skal ikke ha indeksprimere tilsvarende prøvene og skal dermed kunne utelukkes fra dataanalysene. Det er usikkert hvorfor PhiX genomet likevel ble gruppert sammen med prøvene. Det er også grunn til å tro at enkelte av de ukjente sekvensene er PCR artefakter og/eller kimere sekvenser. Ved arbeid med beslektede mikroorganismer kan korte DNA-sekvenser settes sammen til nye

sekvenser. Dette kan skje både som en naturlig genomisk rekombinasjon og som et resultat av PCR-mediert rekombinasjon [61]. Videre bør det tas i betraktning at det adapterligerte produktet har en størrelse på omkring 300 bp. Korte sekvenser gir mindre informasjon per sekvens og kan derfor gjøre det vanskeligere å sammenstille sekvensene. For å sammenstille korte sekvenser kreves det derfor en høy dekning av hver sekvens.

Optimaliseringen av KAPA protokollen viste at PCR-amplifisering av adapterligert HPV ga økning i konsentrasjon av ampliconet på 180 bp, fremfor økning av ampliconet på 300 bp (Figur 24). Dette er det to mulige grunner til: (i) Adapterne har festet seg til ampliconet på 180 bp, men uten perfekt ligering og dermed gitt et for kort produkt eller, (ii) primerne i PCR-reaksjonen har hybridisert til MGP-ampliconet, på tross av at adapterne ikke er tilstede.

Analysene av urinprøvene preparert slik som beskrevet i protokollen til KAPA, viser dårligere resultater enn prøvene preparert med optimalisert protokoll. Den største forskjellen mellom disse to biblioteksprepareringene er rensing av MGP-ampliconet før endereperasjon og a-haling, som ble utført ved optimalisert protokoll, men ikke i normal protokoll. Det er også grunn til å anta at noe av HPV-ampliconet preparert med normal protokoll har forsvunnet i rensesprosessene. Blandingsprøvene av HPV 16 og HPV 18 med lavest konsentrasjon ble ikke sekvensert på NGS, grunnet tidsmangel. Dermed er det ikke mulig å sammenlikne sensitiviteten til NGS, med de resterende metodene benyttet i oppgaven.

Videre har oppgaven vist at det er mulig å sette på NGS adaptere ved bruk av PCR. En slik metode er svært mye billigere enn ligeringsbaserte metoder med kit kjøpt fra leverandør. For overvåkning av epidemiologisk endring i forekomst av HPV i den norske befolkningen er pris en viktig faktor, ettersom mange titalls tusen urinprøver skal genotypes. En PCR basert bibliotekspreparering er også en mer effektiv metode, særlig med tanke på tid og menneskelige ressurser, sammenliknet med ligeringsmetoder slik som protokollen til KAPA. Likevel bør metoden for PCR-basert bibliotekspreparering videreutvikles for ytterligere effektivisering. Blant annet er det svært tid- og ressurskrevende å fortynne alle ampliconene til  $1 \times 10^{-8}$  mellom amplifiseringene, slik det ble gjort i denne oppgaven. Videre optimaliseringsarbeid av PCR-reaksjonen med alle 3 primerparene til NGS biblioteket, kan gjøre det mulig å tilsette alle primerparene i en og samme reaksjon. Ved bruk av PCR som metode for bibliotekspreparering må det tas i betraktning at innføring av flere PCR reaksjoner øker muligheten for systematiske amplifikasjonsfeil i DNA-sekvensene [47, 62].

## 4.5 Fremtidig arbeid

For genotyping av HPV i overvåkningssammenheng, er PCR med konsensusprimere etterfulgt av forskjellige metoder for probehybridisering, de mest brukte metodene [60]. Likevel, som forklart ovenfor er konkurrerende PCR-reaksjoner med konsensusprimere slik som MGP PCR-reaksjonen, utfordrende ved multiple infeksjoner. Resultatene peker i retning av at enkelte genotyper amplifiseres mer effektivt enn andre genotyper.

Det er utviklet flere metoder for å unngå bruk av konsensusprimere og de omtalte ulempene som de medfører. Blant annet er det utviklet en metode for genotyping av HPV ekstrahert fra urin, er bruk av qPCR med sekvensspesifikke prober til E6 eller E7-genene [63]. Som tidligere beskrevet er E6 og E7-genene spesifikke for hver enkelt genotype, og kan derfor

brukes til å skille genotypene. En slik qPCR-reaksjon behøver ett primerpar og en probe per HPV-genotype. Reaksjonen vil dermed ikke være konkurrerende for et begrenset utvalg av primerpar, i samme grad som MGP-amplifisering er. En etablert qPCR metode utfører syv separate PCR-reaksjoner for kvantitativ undersøkelsen av 17 forskjellige genotyper, hvorav 12 er høyrisikotyper [63]. Metoden gir også mulighet for kvantifisering av mengde HPV DNA tilstede i urinprøven. Større mengder av virus kan være en medvirkende faktor for utvikling av livmorhalskreft [20, 21]. Enkelte studier mener L1-genet kan ødelegges ved integrering i vertens genom [64]. Ved å benytte L1-genet for genotyping, vil slike tilfeller vise falske negative resultater. Ved å benytte E6 og E7-genene unngås denne problemstillingen. Derimot er det ikke forventet en høy grad av integrerte HPV i urinprøvene som brukes for denne overvåkingen, ettersom HPV-positive 17-åringer trolig nylig er infisert. Samtidig er graden av multipleksing i qPCR noe begrenset grunnet et lavt antall (4-5) fluoroforer som kan detekteres av dagens PCR-instrumenter.

Flere rapporter at NGS DNA-sekvensering gir de beste resultatene for HPV-genotyping [60, 61, 65]. Ettersom metoden ikke behøver sekvensspesifikke primere eller prober kan et ubegrenset antall genotyper påvises og det er mulig å påvise nye og tidligere ukjente genotyper. NGS viser også bedre resultater for påvisning av svake positive prøver [60]. Disse fordelene vises blant annet i en studie av 104 urinprøver fra norske kvinner mellom 18 og 25 år, hvor NGS påviste 247 HPV-infeksjoner, mens Luminex-hybridisering påviste 189 infeksjoner i de samme prøvene [19]. Som tidligere nevnt er deteksjon av HPV 33 ved bruk av konsensusprimere og sekvensspesifikke prober utfordrende. Dette viser også den nevnte studien, hvor HPV 33 ble detektert 3 ganger av både NGS og Luminex-hybridisering, i tillegg til 12 deteksjoner gjort bare av NGS. Dette viser at bruk av sekvensspesifikke prober og primere kan gi falske negative svar, ved dårlig hybridisering. Ved å utelukke bruk av prober utelukkes også mulighetene for falske positive resultater som kan forekomme ved krysshybridisering av prober.

På tross av NGS sin mange fordeler er de fleste benyttede NGS metodene for HPV-genotyping basert på en PCR-amplifisering av viruset, med konsensusprimere. Som tidligere beskrevet er amplifisering med slike primere utfordrende, særlig i tilfeller med multiple infeksjoner. På den andre siden kan sensitiviteten til NGS være problematisk hvis metoden ikke er amplikonbasert. Som en løsning på dette er isothermal helgenomamplifisering av HPV ved rullende sirkelamplifisering (rolling circle amplification, RCA) brukt for å øke mengden virus-DNA [66]. Metoden amplifiserer hele virusgenomet i ett amplifikasjonssteg hvor temperaturen holdes konstant ved 30 °C. Dette gjøres ved bruk av  $\Phi$ -29 DNA polymerase som kan generere svært lange DNA-sekvenser samtidig som den har «tråd-forskyvnings-aktivitet» (strand displacement activity). Polymerasen amplifiserer HPV fra svært korte primere (6 nukleotider) med helt tilfeldig DNA-sekvens. Primerne hybridiserer dermed til forskjellige områder spredt ut over hele HPV-genomet. Mengden DNA kan på denne måten øke til  $1 \times 10^7$  ganger mer enn ved start. Ettersom metoden ikke benytter sekvensspesifikke primere, amplifiseres alt DNA som er tilstede i prøvematerialet. På denne måten kan et ubegrenset antall forskjellige HPV-genotyper detekteres, inkludert tidligere ukjente genotyper. Metoden er benyttet for amplifisering av HPV ved flere studier, etterfulgt av genotyping med ønsket metode [57, 67, 68]. Blant annet er genotyping av disse isotermale produktene utført ved bruk av Luminex-hybridisering, hvor det ble benyttet to forskjellige genotypespesifikke prober per kule [57]. På denne måten ble antallet falske negative resultater grunnet dårlig hybridisering til probene reduserte. Ved å bruke prober som hybridiserer til forskjellige steder på genomet,

er Luminex-metoden også mindre sensitiv for mutasjoner i DNA. Videre har det blitt utført NGS på HPV amplifisert med RCA og isotermales  $\Phi$ -29 DNA polymerase [68]. På den andre siden må det tas i betraktning at helgenomamplifisering og sekvensering genererer svært store mengder data. Ettersom formålet til overvåkningsprogrammet er å overvåke forandringen i HPV på genotypenivå, behøves bare informasjon om de genene som kan benyttes for genotyping. Dermed mener jeg analyse av hele virusgenomet krever mer ressurser enn hva som er nødvendig for å oppnå målene til overvåkingen.

For å estimere forandringene av HPV-genotypene i den norske befolkningen sammenliknes urinprøver fra uvaksinerte kvinner, med urinprøver fra vaksinerte kvinner. Analysen av urinprøvene fra uvaksinerte kvinner ble foretatt før innføring av vaksinen i befolkningen. Ettersom Luminex-metoden ble benyttet for genotypingen av HPV i urinprøvene til de uvaksinerte kvinnene, er dette en god grunn for å velge denne metoden også for analyse av de vaksinerte kvinnene. Bytte av metode krever at analysene som tidligere er utført på urinprøver fra uvaksinerte kvinner gjentas, eller at sammenlikning av gruppene gjøres ved matematiske modelleringer.



## 5 Konklusjon

Denne oppgaven har vist at DNA-smeltepunktanalyse er uegnet for HPV-genotyping. Derimot kan smeltepunktanalyse benyttes for direkte påvisning av hvorvidt urinprøven er positiv for HPV eller ikke. Videre har oppgaven vist at genotyping ved multiple HPV-infeksjoner ikke er mulig ved Sanger-sekvensering. Luminex-analyse av HPV kan påvise multiple infeksjoner. Pågående arbeid ved FHI antyder derimot at den MGP PCR-baserte Luminex-metoden har dårlig reproducerbarhet. Derimot kan ikke dette konkluderes med basert på resultatene fra oppgaven, da for mange variabler er benyttet. NGS som genotypingsmetode fungerte tilstrekkelig i denne oppgaven, men ettersom blandingsprøvene med de svakeste konsentrasjonene ikke ble analysert er det ikke mulig å konkludere med i hvilken grad metoden fungerer. For å kunne benytte PCR-basert bibliotekspreparering for NGS behøves mer optimaliseringsarbeid. Bruken av MGP-primersett som ligger til grunn for alle metodene i denne oppgaven er ikke optimal ettersom konkurrerende PCR-reaksjoner ved multiple HPV-infeksjoner kan gi tilfeldig forekommende falske negative resultater. Det er derfor viktig å definere hvilke genotyper det er ønskelig å overvåke, da dette gir utslag for valg av metode. Av de fire genotypingsmetodene benyttet i oppgaven ser NGS ut til å være den beste metoden for genotyping av HPV i prøver med multiple infeksjoner. Likevel mener jeg at for det nasjonale overvåkningsprogrammet er qPCR med sekvensspesifikke prober for E6 og E7-genene å anbefale, da det er et ønske om å unngå bruk av konsensusprimere. Den metoden krever derimot at det overvåkes for et lavere antall genotyper enn ved dagens PCR og Luminex-metode.





## Referanser

1. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I: **Human papillomavirus molecular biology and disease association.** *Reviews in medical virology* 2015, **25**(S1):2-23.
2. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W: **A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109**(26):10516-10521.
3. Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J: **Worldwide burden of cervical cancer in 2008.** *Annals of oncology* 2011, **22**(12):2675-2686.
4. Roden R, Wu T-C: **How will HPV vaccines affect cervical cancer?** *Nature Reviews Cancer* 2006, **6**(10):753.
5. Zur Hausen H: **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nature reviews cancer* 2002, **2**(5):342.
6. Clifford G, Smith J, Plummer M, Munoz N, Franceschi S: **Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis.** *British journal of cancer* 2003, **88**(1):63.
7. Molden T, Feiring B, Ambur OH, Christiansen IK, Hansen M, Laake I, Meisal R, Myrvang E, Jonassen CM, Trogstad L: **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* 2016, **2**:153-158.
8. Prakash P, Patne SC, Singh AK, Kumar M, Mishra MN, Gulati AK: **PCR and genotyping for HPV in cervical cancer patients.** *Journal of global infectious diseases* 2016, **8**(3):100.
9. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN: **Introduction to modern virology:** John Wiley & Sons; 2016.
10. Knipe DM, Howley PM: **Fields virology 6th edition:** Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
11. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J: **International standardization and classification of human papillomavirus types.** *Virology* 2015, **476**:341-344.
12. Söderlund Strand A: **Human papillomavirus testing and its application in cervical cancer prevention,** vol. 2008: Department of Medical Microbiology, Lund University; 2008.
13. Triglav T, Artemchuk H, Oštrbenk A, Elfström KM, Faust H, Poljak M, Dillner J: **Effect of naturally acquired type-specific serum antibodies against human papillomavirus type 16 infection.** *Journal of Clinical Virology* 2017, **90**:64-69.
14. Kocjan BJ, Bzhalava D, Forslund O, Dillner J, Poljak M: **Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses.** *Clinical Microbiology and Infection* 2015, **21**(9):808-816.
15. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H: **Classification of papillomaviruses.** *Virology* 2004, **324**(1):17-27.
16. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, Sahasrabudhe VV, Gravitt PE, Hsing AW, Burk RD: **Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67.** *PloS one* 2011, **6**(5):e20183.
17. Woodman CB, Collins SI, Young LS: **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues.** *Nature reviews Cancer* 2007, **7**(1):11.

18. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** *New England Journal of Medicine* 2003, **348**(6):518-527.
19. Meisal R, Rounge TB, Christiansen IK, Eieland AK, Worren MM, Molden TF, Kommedal Ø, Hovig E, Leegaard TM, Ambur OH: **HPV Genotyping of Modified General Primer-Amplicons Is More Analytically Sensitive and Specific by Sequencing than by Hybridization.** *PloS one* 2017, **12**(1):e0169074.
20. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Helzlsouer KJ, Schiffman M: **A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation.** *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2003, **12**(6):477-484.
21. Ho C-M, Yang S-S, Chien T-Y, Huang S-H, Jeng C-J, Chang S-F: **Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients.** *Gynecologic oncology* 2005, **99**(3):615-621.
22. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD: **Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women.** *New England Journal of Medicine* 1998, **338**(7):423-428.
23. Hawkes D, Lea CE, Berryman MJ: **Answering human papillomavirus vaccine concerns; a matter of science and time.** *Infectious agents and cancer* 2013, **8**(1):22.
24. Schmitt M, Bravo I, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T: **Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses.** *Journal of clinical microbiology* 2006, **44**(2):504-512.
25. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PTH, Bosch FX, Ferreccio C, Hieu NT, Lazcano-Ponce E: **Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide.** *International journal of cancer* 2006, **119**(11):2677-2684.
26. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX: **Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.** *The Lancet infectious diseases* 2007, **7**(7):453-459.
27. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun X-W, Sawo D, Brudney K, Wright Jr TC: **Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women.** *Jama* 2000, **283**(8):1031-1037.
28. Palefsky JM, Holly EA: **Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV.** *JNCI Monographs* 2003, **2003**(31):41-46.
29. Couto E, Hemminki K: **Heritable and environmental components in cervical tumors.** *International journal of cancer* 2006, **119**(11):2699-2701.
30. Hemminki K, Dong C, Vaittinen P: **Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component?** *International journal of cancer* 1999, **82**(6):775-781.
31. González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, Green J, Peto J, Skegg D: **Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies.** *Int J Cancer* 2006, **118**:1481-1495.
32. Piyathilake CJ, Badiga S, Chambers MM, Brill IK, Matthews R, Partridge EE: **Accuracy of urinary human papillomavirus testing for the presence of cervical human papillomaviruses and higher grades of cervical intraepithelial neoplasia.** *Cancer* 2016, **122**(18):2836-2844.
33. Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J, Hibma M: **Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin**

- is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *Journal of virology* 2003, **77**(15):8378-8385.
34. Moerman-Herzog A, Nakagawa M: **Early defensive mechanisms against human papillomavirus infection.** *Clinical and Vaccine Immunology* 2015, **22**(8):850-857.
  35. Garland SM, Kjaer SK, Muñoz N, Block SL, Brown DR, DiNubile MJ, Lindsay BR, Kuter BJ, Perez G, Dominiak-Felden G: **Impact and effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine: a systematic review of 10 years of real-world experience.** *Reviews of Infectious Diseases* 2016, **63**(4):519-527.
  36. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X, Skinner SR, Apter D, Naud P, Salmerón J: **Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial.** *The lancet oncology* 2012, **13**(1):89-99.
  37. Kavanagh K, Pollock KG, Cuschieri K, Palmer T, Cameron RL, Watt C, Bhatia R, Moore C, Cubie H, Cruickshank M: **Changes in the prevalence of human papillomavirus following a national bivalent human papillomavirus vaccination programme in Scotland: a 7-year cross-sectional study.** *The Lancet Infectious Diseases* 2017, **17**(12):1293-1302.
  38. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R: **Molecular biology of the gene:** John Inglis; 2014.
  39. Berg ES: **Beneficial use of internal controls in the nucleic acid amplification-based analysis:** Faculty of Mathematics and Natural Sciences; 2006.
  40. Nolan T, Bustin SA: **PCR technology: current innovations:** CRC press; 2013.
  41. Martins TB: **Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2002, **9**(1):41-45.
  42. Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL: **Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants.** *Journal of reproductive immunology* 2005, **66**(2):175-191.
  43. Dunbar SA: **Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection.** *Clinica chimica acta* 2006, **363**(1-2):71-82.
  44. Munro SB, Kuypers J, Jerome KR: **Comparison of a multiplex real-time PCR assay with a multiplex Luminex assay for influenza virus detection.** *Journal of clinical microbiology* 2013, **51**(4):1124-1129.
  45. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the national academy of sciences* 1977, **74**(12):5463-5467.
  46. Metzker ML: **Sequencing technologies—the next generation.** *Nature reviews genetics* 2010, **11**(1):31.
  47. Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, Ordoukhanian P: **Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges.** *Biotechniques* 2014, **56**(2):61.
  48. Söderlund-Strand A, Carlson J, Dillner J: **Modified general primer PCR system for sensitive detection of multiple types of oncogenic human papillomavirus.** *Journal of clinical microbiology* 2009, **47**(3):541-546.
  49. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M: **Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers.** *Journal of clinical microbiology* 2008, **46**(3):1050-1059.

50. Coordinators NR: **Database resources of the national center for biotechnology information.** *Nucleic acids research* 2016, **44**(Database issue):D7.
51. Soderlund-Strand A, Dillner J: **High throughput monitoring of Human Papillomavirus type distribution.** *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2012:cebp. 1003.2012.
52. Sinka K, Lacey M, Robertson C, Kavanagh K, Cuschieri K, Nicholson D, Donaghy M: **Acceptability and response to a postal survey using self-taken samples for HPV vaccine impact monitoring.** *Sex Transm Infect* 2011:sextrans-2011-050211.
53. Sellors JW, Lorincz AT, Mahony JB, Mielzynska I, Lytwyn A, Roth P, Howard M, Chong S, Daya D, Chapman W: **Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions.** *Canadian Medical Association Journal* 2000, **163**(5):513-518.
54. Mori S, Nakao S, Kukimoto I, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Kanda T: **Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers.** *Cancer science* 2011, **102**(6):1223-1227.
55. Berg eS: **Beneficial use of internal controls in the nucleic acid amplification-based analysis.** In., vol. Doctor Degree: University of Oslo, Faculty of Mathematics and natural Sciences; 2006.
56. Barzon L, Militello V, Pagni S, Franchin E, Dal Bello F, Mengoli C, Palù G: **Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males.** *Journal of medical virology* 2010, **82**(8):1424-1430.
57. Lowe B, Kobayashi L, Lorincz A, Mallonee R, O'Neil D, Thai H, Nazarenko I: **HPV genotype detection using hybrid capture sample preparation combined with whole genome amplification and multiplex detection with Luminex XMAP.** *The Journal of Molecular Diagnostics* 2010, **12**(6):847-853.
58. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart A-C, Hildesheim A, Jenison SA: **Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments.** *Journal of virology* 1995, **69**(12):7743-7753.
59. Cullen M, Boland JF, Schiffman M, Zhang X, Wentzensen N, Yang Q, Chen Z, Yu K, Mitchell J, Roberson D: **Deep sequencing of HPV16 genomes: A new high-throughput tool for exploring the carcinogenicity and natural history of HPV16 infection.** *Papillomavirus research* 2015, **1**:3-11.
60. Barzon L, Militello V, Lavezzo E, Franchin E, Peta E, Squarzon L, Trevisan M, Pagni S, Dal Bello F, Toppo S: **Human papillomavirus genotyping by 454 next generation sequencing technology.** *Journal of Clinical Virology* 2011, **52**(2):93-97.
61. Ekström J, Mühr LSA, Bzhalava D, Söderlund-Strand A, Hultin E, Nordin P, Stenquist B, Paoli J, Forslund O, Dillner J: **Diversity of human papillomaviruses in skin lesions.** *Virology* 2013, **447**(1-2):300-311.
62. Robin JD, Ludlow AT, LaRanger R, Wright WE, Shay JW: **Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing.** *Scientific reports* 2016, **6**:24067.
63. Micalessi IM, Boulet GA, Bogers JJ, Benoy IH, Depuydt CE: **High-throughput detection, genotyping and quantification of the human papillomavirus using real-time PCR.** *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2012, **50**(4):655-661.
64. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N: **Human papillomavirus is a necessary**

- cause of invasive cervical cancer worldwide.** *The Journal of pathology* 1999, **189**(1):12-19.
65. Yi X, Zou J, Xu J, Liu T, Liu T, Hua S, Xi F, Nie X, Ye L, Luo Y: **Development and validation of a new HPV genotyping assay based on next-generation sequencing.** *American journal of clinical pathology* 2014, **141**(6):796-804.
  66. Johne R, Müller H, Rector A, Van Ranst M, Stevens H: **Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase.** *Trends in microbiology* 2009, **17**(5):205-211.
  67. Rector A, Tachezy R, Van Ranst M: **A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification.** *Journal of virology* 2004, **78**(10):4993-4998.
  68. Meiring TL, Salimo AT, Coetzee B, Maree HJ, Moodley J, Hitzeroth II, Freeborough M-J, Rybicki EP, Williamson A-L: **Next-generation sequencing of cervical DNA detects human papillomavirus types not detected by commercial kits.** *Virology journal* 2012, **9**(1):164.
  69. Schwarz E, Dürst M, Demankowski C, Lattermann O, Zech R, Wolfsperger E, Suhai S, Hausen H: **DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b.** *The EMBO journal* 1983, **2**(12):2341-2348.
  70. Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, zur Hausen H: **The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11.** *Virology* 1986, **151**(1):124-130.
  71. Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG: **Human papillomavirus type 16 DNA sequence.** *Virology* 1985, **145**(1):181-185.
  72. Cole S, Danos O: **Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products.** *Journal of molecular biology* 1987, **193**(4):599-608.
  73. Goldsborough MD, DiSilvestre D, Temple GF, Lorincz AT: **Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus.** *Virology* 1989, **171**(1):306-311.
  74. Cole ST, Streeck RE: **Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer.** *Journal of virology* 1986, **58**(3):991-995.
  75. Delius H, Hofmann B: **Primer-directed sequencing of human papillomavirus types.** In: *Human pathogenic papillomaviruses.* Springer; 1994: 13-31.
  76. Volpers C, Streeck RE: **Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39.** *Virology* 1991, **181**(1):419-423.
  77. Lungu O, Crum C, Silverstein S: **Biologic properties and nucleotide sequence analysis of human papillomavirus type 51.** *Journal of virology* 1991, **65**(8):4216-4225.
  78. Kirii Y, Iwamoto S-c, Matsukura T: **Human papillomavirus type 58 DNA sequence.** *Virology* 1991, **185**(1):424-427.
  79. Rho J, Roy-Burman A, Kim H, de Villiers E-M, Matsukura T, Choe J: **Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59.** *Virology* 1994, **203**(1):158-161.
  80. Longuet M, Beaudenon S, Orth G: **Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39.** *Journal of clinical microbiology* 1996, **34**(3):738-744.



## Vedlegg

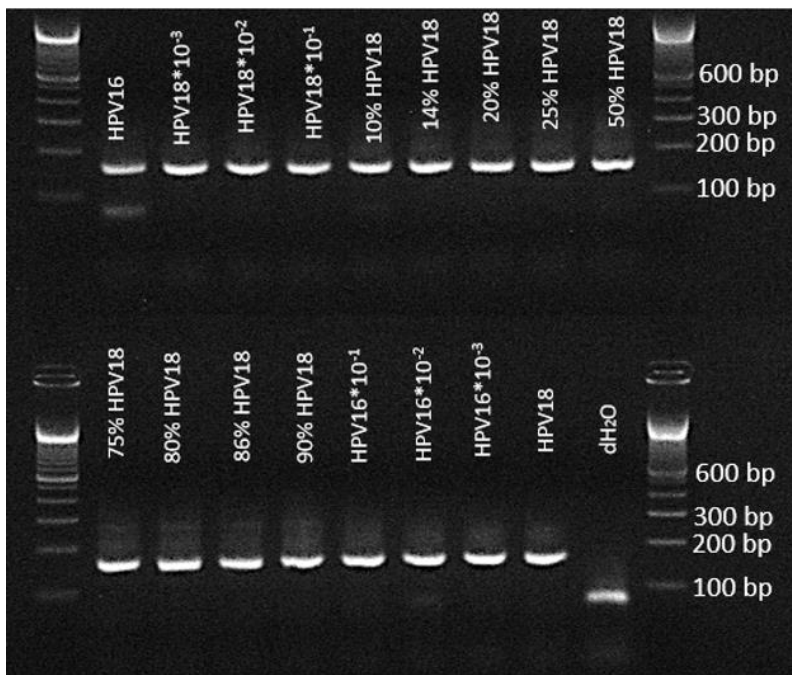
Vedlegg tabell 1 viser informasjon om DNA-sekvensen til L1-genet av HPV-genotypene i MGP-kontrollene som ble benyttet i oppgaven. Tabellen viser hvilket virus, slekt og art som ble benyttet og det tilhørende genbanknummeret. Videre fremkommer årstallet for innsendelse av DNA-sekvensen til det internasjonale referansesenter for HPV (IHPVRC), Karolinska Institutt, Stockholm, Sverige.

*Vedlegg tabell 1: Publisering av DNA sekvensen til L1-genet i HPV for genotypene som er benyttet som kontroller.*

Virus	Slekt	Art	Genbank-nummer	Dato for innsendelse	Innsendt av
HPV6	Alpha	Alpha-10	X00203	1984	L. Gissman [69]
HPV11	Alpha	Alpha-10	M14119	1984	L. Gissman [70]
HPV16	Alpha	Alpha-9	K02718	1984	M. Durst og L. Gissman [71]
HPV18	Alpha	Alpha-7	X05015	1984	M. Boshart [72]
HPV31	Alpha	Alpha-9	J04353	1985	A. Lorincz [73]
HPV33	Alpha	Alpha-9	M12732	1985	G. Orth [74]
HPV35	Alpha	Alpha-9	X74477	1986	A. Lorincz [75]
HPV39	Alpha	Alpha-7	M62849	1987	G. Orth [76]
HPV45	Alpha	Alpha-7	X74479	1986	Z. Naghashfar [75]
HPV51	Alpha	Alpha-5	M62877	1987	C. Crum [77]
HPV52	Alpha	Alpha-9	X74481	1987	W. Lancaster [75]
HPV56	Alpha	Alpha-6	X74483	1987	A. Lorincz [75]
HPV58	Alpha	Alpha-9	D90400	1988	T. Matsukura [78]
HPV59	Alpha	Alpha-7	X77858	1989	T. Matsukura [79]
HPV66	Alpha	Alpha-6	U31794	1981	G. Orth (Delius,H., ikke publisert)
HPV68	Alpha	Alpha-7	X67161	1981	G. Orth [80]

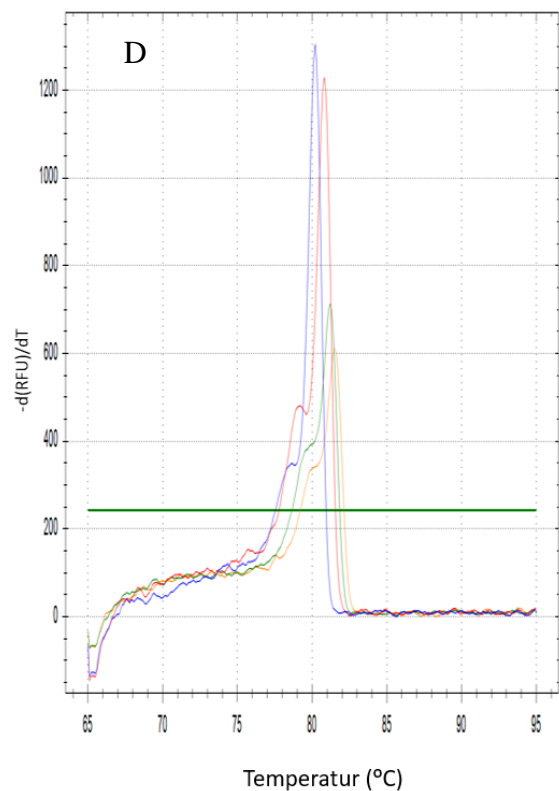
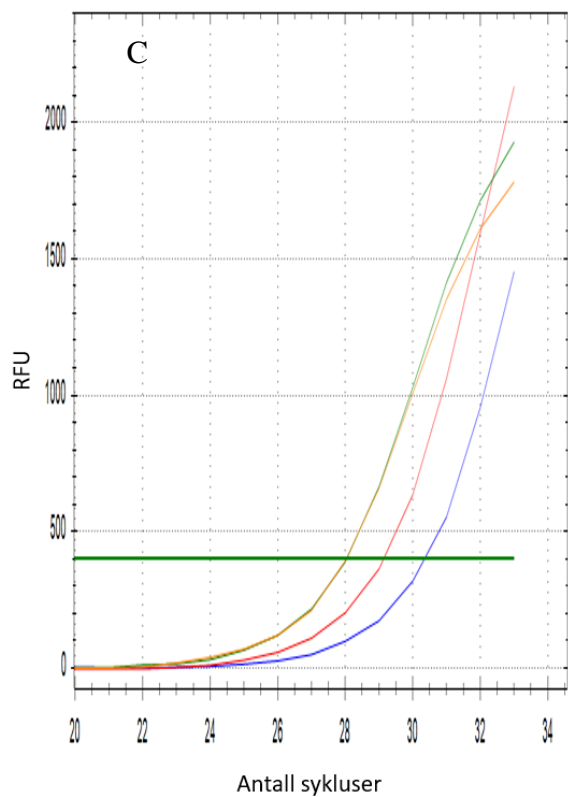
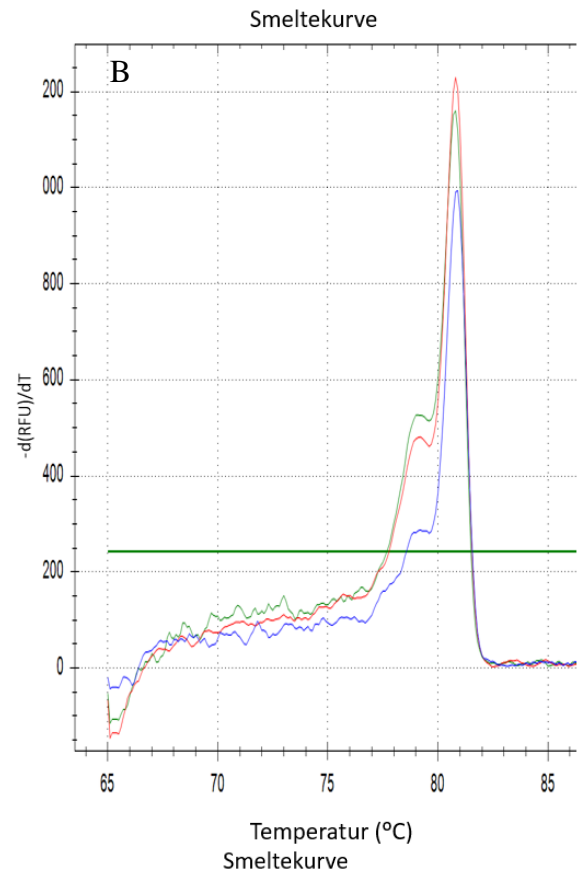
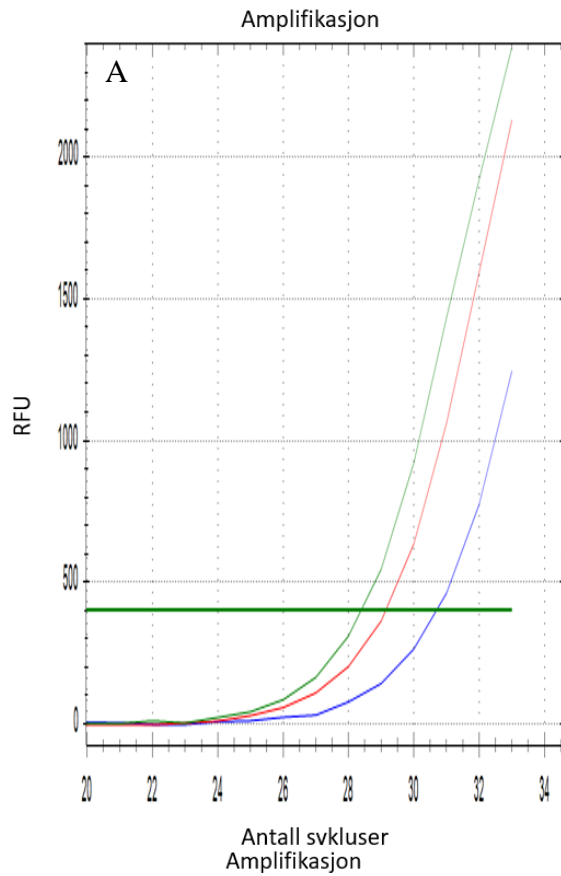


Vedlegg figur 1 viser agarosegelbilde av MGP-amplikonene av HPV 16 og HPV 18 blandingsprøvene (Tabell 1). Alle HPV-amplikonene har et bånd i overkant av 150 bp. Prøven med HPV 16 har i tillegg et bånd på omkring 50 bp. Dette båndet viser likhet med båndet til den negative kontrollen (dH<sub>2</sub>O), som trolig er primer-dimer. Smeltepunktanalysen av HPV 16, HPV 18 og prøven med 50 % av hver genotype samt den negative kontrollen (Figur 17) viser god overensstemmelse med agarosegelen.



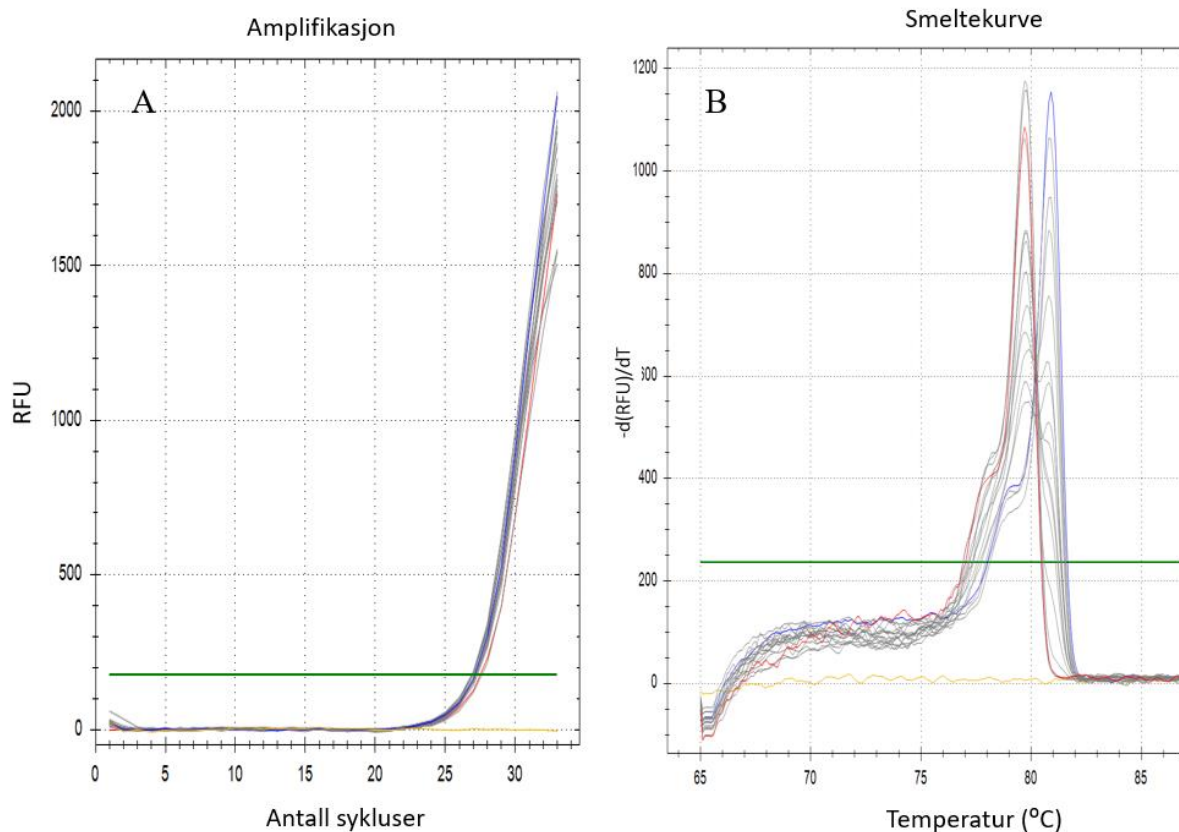
Vedlegg figur 1: Agarosegelbilde av HPV 16 og HPV 18 blandingsprøvene, amplifisert med MGP. Total HPV konsentrasjon er 2500 GEQ/ $\mu$ L i alle prøvene, men med varierende forhold mellom HPV 16 og HPV 18. Alle prøvene viser et sterkt bånd i overkant av 150 bp. Den negative kontrollen (dH<sub>2</sub>O) viser dannelse av primer-dimer.

Vedlegg figur 2 A og B viser smeltepunktanalysen for optimaliseringen HPV 18 amplifisert med M13 hale-PCR. MgCl<sub>2</sub> konsentrasjon er på 2 mM, 3 mM og 4 mM og primerhybridiseringstemperatur på 59 °C. Vedlegg figur 2 C og D viser smeltepunktanalysen for optimalisering HPV 18 med M13 hale-PCR med primerhybridiseringstemperatur på 55 °C, 59 °C og 64 °C og MgCl<sub>2</sub> på 3 mM. Alle smeltekurvene viser en «skulder» på venstre side av smeltekurven, som tyder på at det er en ekstra sekvens i prøven med lavere smeltetemperatur. Trolig er dette enkelte av amplikonene som ikke har fått M13-halesekvensen inkorporert.



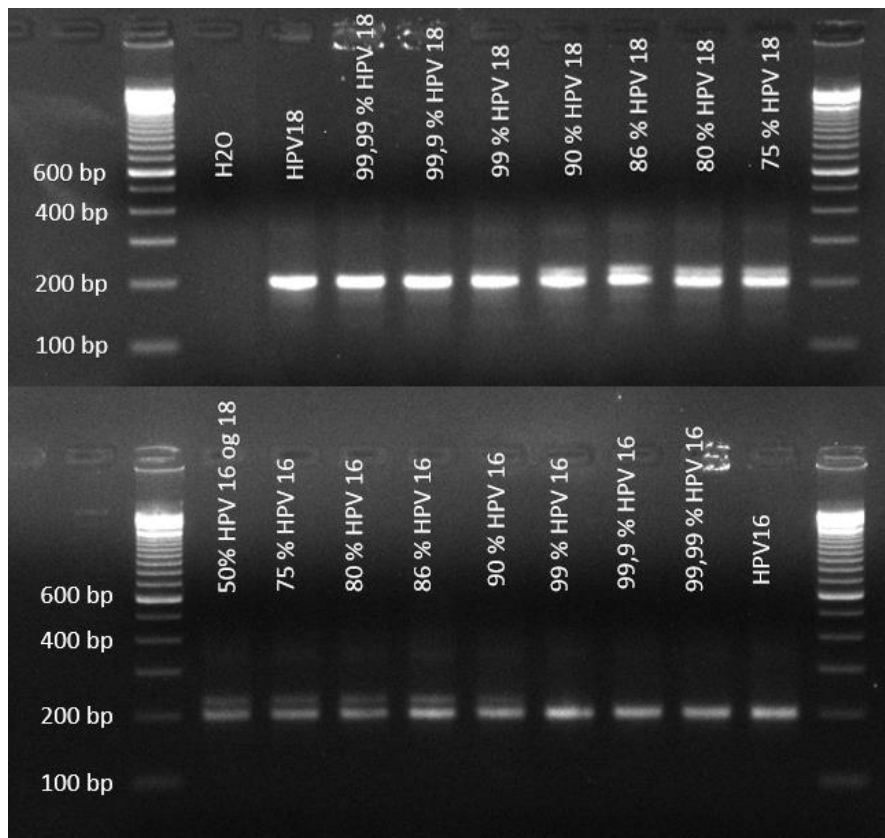
Vedlegg figur 2: Smeltepunktsanalyse for optimaliseringen av M13-hale PCR for HPV 18. A og B: 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Grønn kurve: Primerhybridisering ved 55 °C, C<sub>i</sub> på 28,4 og S<sub>i</sub> på 79 °C og 80,9 °C. Rød kurve: Primerhybridisering ved 59 °C, C<sub>i</sub> på 29,2 og S<sub>i</sub> på 79,2 °C og 80,8 °C. Blå kurve: Primerhybridisering ved 64 °C, C<sub>i</sub> 30,7 og S<sub>i</sub> 79,2 °C og 80,9 °C. C og D: Primerhybridiseringstemperatur på 59 °C. Blå kurve: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 30,4 og S<sub>i</sub> på 78,6 °C og 80,2 °C. Rød kurve: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 29,2 og S<sub>i</sub> på 72,2 °C og 80,8 °C. Grønn kurve: 4 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 28,1 og S<sub>i</sub> 81,2 °C. Oransje kurve: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> på 28 og S<sub>i</sub> på 81,5 °C.

Vedlegg figur 3 viser smeltepunktanalyse for blandingsprøver av HPV 16 og HPV 18, amplifisert med M13-haleprimere. HPV 16 har  $S_t$ -verdi på 79,7 °C og HPV 18 på 80,9 °C. Alle prøvene viser smeltekurve i en eller begge av disse temperaturene. Alle prøvene har en utflating på venstre side av smeltekurven. Dette viser at ikke alle amplikonene har fått inkorporert M13-haleprimer og derfor har en kortere sekvens som medfører en lavere smeltetemperatur.



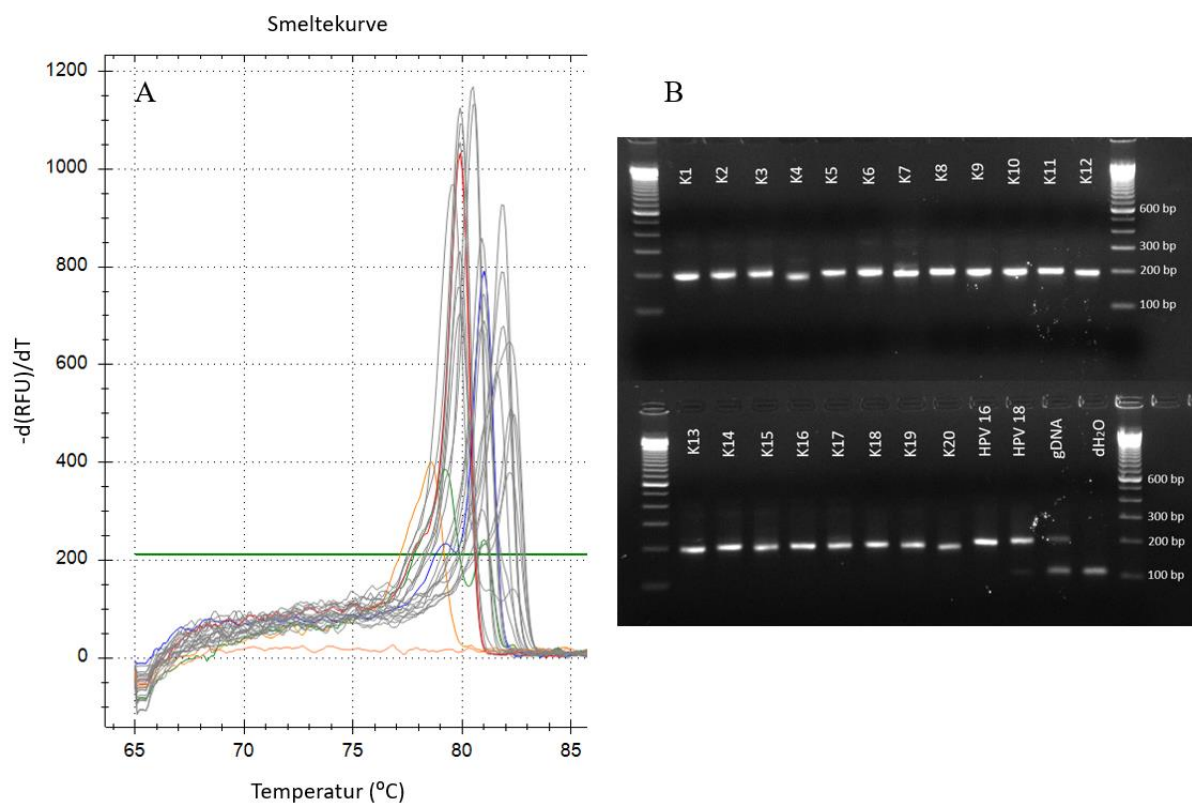
Vedlegg figur 3: Smeltepunktanalyse for M13-hale amplikonet av HPV 16 (rød kurve) og HPV 18 (blå kurve), samt blandinger av disse to genotypene (grå kurver) (Tabell 1). Gul kurve er negativ kontroll. Resterende balanseringsprøver er fremstilt i grått. A: Amplifiseringskurvene hvor  $C_t$ -verdiene for HPV 16 og 18 er henholdsvis 27,5 og 27,1. Resterende prøver ligger mellom 27 og 27,6. B: HPV 16 har  $S_t$  på 79,7 °C og HPV 18 på 80,9 °C, og alle blandingsprøvene har smeltekurve i en eller begge av disse temperaturene.

Vedlegg figur 4 viser agarosegelbilde av HPV 16 og HPV 18 blandingsprøvene, amplifisert med M13-haleprimere. Alle prøvene mellom 10 % HPV 16 og 10 % HPV 18 (prøvenummer 5 til 13, Tabell 1) viser heterodupleks. Disse prøvene har et bånd som er noe lengre enn de resterende prøvene. Dette forklares med at HPV 16 har hybridisert med HPV 18, grunnet like primere. Den negative kontrollen dH<sub>2</sub>O viser ikke noe bånd.



Vedlegg figur 4: Agarosegelbilde av HPV 16 og HPV 18 i blandinger (Tabell 1), amplifisert med M13-haleprimere. DNA sekvensene er omtrent 200 bp lange. Alle prøvene mellom 10 % HPV 16 og 10 % HPV 18 viser heterodupleks.

Vedlegg figur 5 viser smeltepunktanalyse (A) og agarosegelbilde (B) av urinprøvene amplifisert med M13-haleprimere. Amplifiseringen er utført med 3 mM MgCl<sub>2</sub> og 59 °C. Analysen hadde to prøver med H<sub>2</sub>O, begge merket med gule kurver i denne figuren. Den ene av disse prøvene er tidligere amplifisert med MGP og viser her to smeltetopper. S<sub>t</sub> for urinprøvene ligger mellom 79,6 °C og 82,2 °C. For HPV 16 er den 79,9 °C, for HPV 18 er den 81 °C, for gDNA 78,6 °C og for den positive prøven med dH<sub>2</sub>O er den 79,2 °C og 81 °C. Vedlegg figur 5 B viser at alle urinprøvene har bånd på omkring 200 bp. Prøven med gDNA ga et bånd på omtrent 200 bp og ett på rett over 100 bp. Den negative kontrollen viser et bånd på omtrent 100 bp. Denne prøven har tidligere blitt amplifisert med MGP, og viser derfor annerledes resultater enn dH<sub>2</sub>O i Vedlegg figur 4.



Vedlegg figur 5: Smeltepunktanalyse (A) og agarosegelbilde (B) av MGP HPV-amplikonene fra de 20 HPV-positive kvinnene, amplifisert med M13-haleprimere. A: Som positive kontroller er HPV 16 og HPV 18 benyttet, hvor førstnevnte er fremstilt med rød kurve og sistnevnte med blå kurve.  $S_i$  for HPV 16 er 79,9 °C og for HPV 18 er den 81 °C. Videre er gDNA (10 ng/μL) fremstilt i grønn kurve, med  $S_i$  på 79,2 °C og 841 °C. Videre fremstilles to forskjellige prøver med dH<sub>2</sub>O i to gule kurver. Prøven med smeltetopp ( $S_i$  78,6 °C) er tidligere amplifisert med MGP. Den gule prøven uten smeltetopp er rent dH<sub>2</sub>O.

B: Båndene til alle urinprøvene er omkring 200bp lange, med noe variasjon. Prøven med gDNA viser dannelse av biprodukt med ett bånd på omkring 200 bp og et på omkring 100 bp. Dette stemmer overens med smeltepunktanalysen for prøven. Prøven med dH<sub>2</sub>O er tidligere amplifisert med MGP og viser derfor et biprodukt på omkring 100 bp. Den gule kurven uten  $S_i$  i smeltepunktanalysen er dessverre ikke inkludert i agarosegelen.

Vedlegg tabell 2 viser DNA-sekvensen til de 42 probene som ble benyttet i Luminex-analysen, for spesifikk deteksjon av 37 forskjellige HPV-genotyper. HPV 35, HPV 58 og HPV 68 har to forskjellige prober for best mulig deteksjon av virusene. Videre er universalprobene designet for å detektere genotyper hvor det ikke er laget en egen probe. Probene er mellom 17 og 22 bp lange og hybridiserer med den genotypespesifikke delen v L1-genet til HPV.

Vedlegg tabell 2: Probene benyttet i Luminex-hybridisering for spesifikk deteksjon av 37 forskjellige HPV-genotyper. To forskjellige prober ble benyttet for HPV 35, HPV 58 og HPV 68. Universelle prober detekterte andre genotyper.

Probe ID	DNA sekvens
6	5'amino-modified C12- TCC GTA ACT ACA TCT TCC A 3'
11	5'amino-modified C12- TCT GTG TCT AAA TCT GCT AC 3'
16	5'amino-modified C12- TAC CTA CGA CAT GGG GAG 3'
18	5'amino-modified C12- TGC TTC TAC ACA GTC TCC T 3'
26	5'amino-modified C12- GTA CAT TAT CTG CAG CAT C 3'
30	5'amino-modified C12- TCT GCA ACC ACA CAA ACG TT 3'
31	5'amino-modified C12- GCA ATT GCA AAC AGT GAT AC 3'
33	5'amino-modified C12- TGC ACA CAA GTA ACT AGT GA 3'
35	5'amino-modified C12- CTG CTG TGT CTT CTA GTG A 3'
35 pos 6624:a	5'amino-modified C12- CTG CTG TGT CTA CTA GTG A 3'
39	5'amino-modified C12- TAC ATT ATC TAC CTC TAT AGA 3'
40	5'amino-modified C12- AGT CCC CCA CAC CAA CC 3'
42	5'amino-modified C12- GCC ACT GCA ACA TCT GGT G 3'
43	5'amino-modified C12- TCT ACT GAC CCT ACT GTG 3'
45	5'amino-modified C12- TAA TTT AAC ATT ATG TGC CTC 3'
51	5'amino-modified C12- TGC TGC GGT TTC CCC AA 3'
52	5'amino-modified C12- GAA TAC CTT CGT CAT GGC 3'
53	5'amino-modified C12- TGT CTA CAT ATA ATT CAA AGC 3'
54	5'amino-modified C12- CAC GCA GGA TAG CTT TAA T 3'
56	5'amino-modified C12- GAT GCA CGA AAA ATT AAT CAG 3'
58	5'amino-modified C12- TAT GCA CTG AAG TAA CTA AG 3'
58 6688a	5'amino-modified C12- TAT GCA CTG AAG TAA ATA AG 3'
59	5'amino-modifierad C12-AGA ATA TGC CAG ACA TGT G 3'
61	5'amino-modified C12- CCC TGT ATC TGA ATA TAA AGC 3'
66	5'amino-modified C12- CGT GAA ATC AAT CAA TAC CTT C 3'
67	5'amino-modified C12- CTA CAT ACA AAA ATG AAA AC 3'
68 (orth)	5'amino-modified C12- CTA CAT ACA AAA ATG AAA AC 3'
68 (ME180)	5'amino-modified C12-CTG AAT CAG CTG TAC CAA A 3'
69	5'amino-modified C12- CAT CTG CCA CTT TTA AAC C 3'
70	5'amino-modified C12- TTT ACA TTG TCT GCC TGC A 3'
73	5'amino-modified C12- GTA TGC CAA CTC WAA TTT TAA 3'
74	5'amino-modified C12 –CAG ACT ACA AAC AAT ACA TC 3'
81	5'amino-modified C12- GCT ACA TCT GCT GCT GC 3'
82	5'amino-modified C12- ACT CCA RCA AAC TTT AAG CAG T 3'
83	5'amino-modified C12- TGC TGC TAC ACA GGC TAA 3'
86	5'amino-modified C12- ATT AGT GCC GCT ACC CAG AA 3'
87	5'amino-modified C12- CCA CTG AAT ATG ACC CCA 3'
89	5'amino-modified C12- AAT ACA GTT CTA CAC GCT 3'
90	5'amino-modified C12- CAC ATA CAA GGC TTC CAA TT 3'
91	5'amino-modified C12- TAC CTA CTA CAT ATG ACA AC 3'
Universal 1	5'amino-modified C12- GiC ATG iiG ARG AAT ATG A 3'
Universal 2	5'amino-modified C12- GMC AYR CAG ARG AAT ATG A 3'

Vedlegg tabell 3 viser hvilke genotyper i MGP-kontrollene som ble påvist positive, svakt positive eller negative. Ved 100 kopier/μL påvises to genotyper (HPV 33 og HPV 58) som negative. Ved 10

kopier/ $\mu$ L påvises fire genotyper som negative og fire genotyper som svakt positive. Resultatene er fra Luminex-analysen med SYTO®9 i PCR mastermiksen.

*Vedlegg tabell 3: Resultatene av MGP kontrollene analysert med Luminex-deteksjon. Ved 100 kopier/ $\mu$ L ga HPV 33 og HPV 58 negative resultater. Ved 10 kopier/ $\mu$ L ga HPV 33, HPV 58, HPV 56 og HPV 68 negative resultater. I tillegg ga HPV 31, HPV 52, HPV 56 og HPV 35 svakt positive resultater ved 10 kopier/ $\mu$ L.*

Navn	HPV- genotyper	Kopier/ $\mu$ L	Kopier/PCR	Negativ	Svakt positive
MGP-1	6, 16, 18, 51	100	500		
MGP-2	11, 31, 33, 58	100	500	33, 58	
MGP-3	39, 45, 52, 56	100	500		
MGP-4	35, 59, 66, 68	100	500		
MGP-5	6, 16, 18, 51	10	50		
MGP-6	11, 31, 33, 58	10	50	33, 58	31
MGP-7	39, 45, 52, 56	10	50		52, 56
MGP-8	35, 56, 66, 68	10	50	56, 68	35

Vedlegg tabell 4 viser DNA-sekvensene av HPV 16 og HPV 18 blandingsprøvene (Tabell 1), påvist med Sanger-sekvensering. Prøvene er amplifisert med MGP PCR og sens M13-sekvenseringsprimere. DNA-sekvensen til i MGP er merket med understrek og M13-haleprimerne er merket med fet skrift. Prøvenummer 9 til og med 13 har muterte MGP og M13-halesekvenser. Nukleotid BLAST-søk av sekvensene påviste HPV 16 i prøvenummer 1 (100 % HPV 16) til og med prøve nummer 8 (75 % HPV 16). Videre ble HPV 18 påvist fra prøvenummer 17 (100 % HPV 18) til og med prøvenummer 14 (99 % HPV 18). Prøve nummer 9 til 13 ga ikke treff med noen genotype med BLAST-søk.

Vedlegg tabell 4: DNA-sekvensen til prøvene med blanding av HPV 16 og 18 (Tabell 1), generert med Sanger-sekvensering. De understrekede basene er MGP DNA sekvens og basene merket med uthevede skriften er M13 halesekvens.

Prøve	DNA sekvens
1-HPV 16	CGAACTGTTCTGACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGGT <b>CATAGCTGGTTCCC</b>
2	CGGATGCTTGTGAACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGG <b>TCATAGCTGGTTCCC</b>
3	CGAAATGCGGTGGAACCTACACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA AAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATG <b>GTCATAGCTGGTTCCCAG</b>
4	CAACTGTTGTGAACTACACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAA TACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGGTC <b>ATAGCTGGTTCCC</b>
5	CGAACGCTGTGGAACCTACACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGGT <b>CATAGCTGGTTCCA</b>
6	CGAAATGTGTGGTCTACACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAA TACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGGTC <b>ATAGCTGGTTCCACCA</b>
7	CGACGGGGTGGACTACACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAA TACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGGTC <b>ATAGCTGGTTCCACCA</b>
8	CGGCTGGGGTGGTCTACACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGGT <b>CATAGCTGGTTCCACCA</b>
9	GTCTGTGGAGGACTACCGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAAATA CTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCTTCTCCGTCATGGTGAT AGCTGGTTCCACCA
10	GAGACTGTGGAGAACTACCGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCGAAACTGCATATAATAA TACTAACTTTTTGAGTACCTACGACATGATGAGGAATAATTTATTTATTTTTTTTTCTCCTCCGTCGTGGTGAT CATTGGTGCCACCA
11	GTCTGGTGTGGTCTAACGCAGTACAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTGCATATAATAATA CTAACTTTTTGAGTACCTACGACATGATGAGGAGGAATATTATTTATTTTTTTTTTCCCTCCGTCGTGGTGATA ACTGGTGCCACCA
12	TTGGCAGACTACCGCAGTACCAATTTGTCATTATGTTGCTTGTACATCTACTCTGAACCTGGTAATATAATAGC TACTTTTTGAGCACCTTAGAAGAGATGTTGAGGAATATTATTTACTTTTTTTTTTCCCTCCAACGTGGTGGTCAT AGCTGGCCACCA
13	GCAGTTGCTGTCTACTGCAGTACAATTTGTCATTATGTGCTTGTACATCTACTCTGAACCTGGTATTATGATAGC TACTTATTTGAGCACCTTAGAAGACATGTTGAGGAATATGATTACTTTTTATTTTTCCCTCCAACGTGATGGTCAT AGCTGGCCACCA
14	GACATGGGTGAACTACTCCAGTACCAATTTAACATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACTGGCAATATGAT GCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGG <b>TCATAGCTGGTTCC</b>
15	GACTGTGGTGAACCTACTCCAGTACCAATTTAACATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACTGGCAATATGAT GCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCATGG <b>TCATAGCTGGTTCC</b>
16	GGGCTGGGGTGGACTCCTCGAGTTCCAATTTAACATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACTGGCAATAT GATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTC <b>TGGTCATAGCTGGTTCC</b>
17-HPV18	GGGCAGGGGTGAACTACTCGAGGTACCATTTAACATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACTGGCAATATG ATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTACAATTTATTTTTCCATCCAACGTCAT <b>GGTCATAGCTGGTTCCA</b>

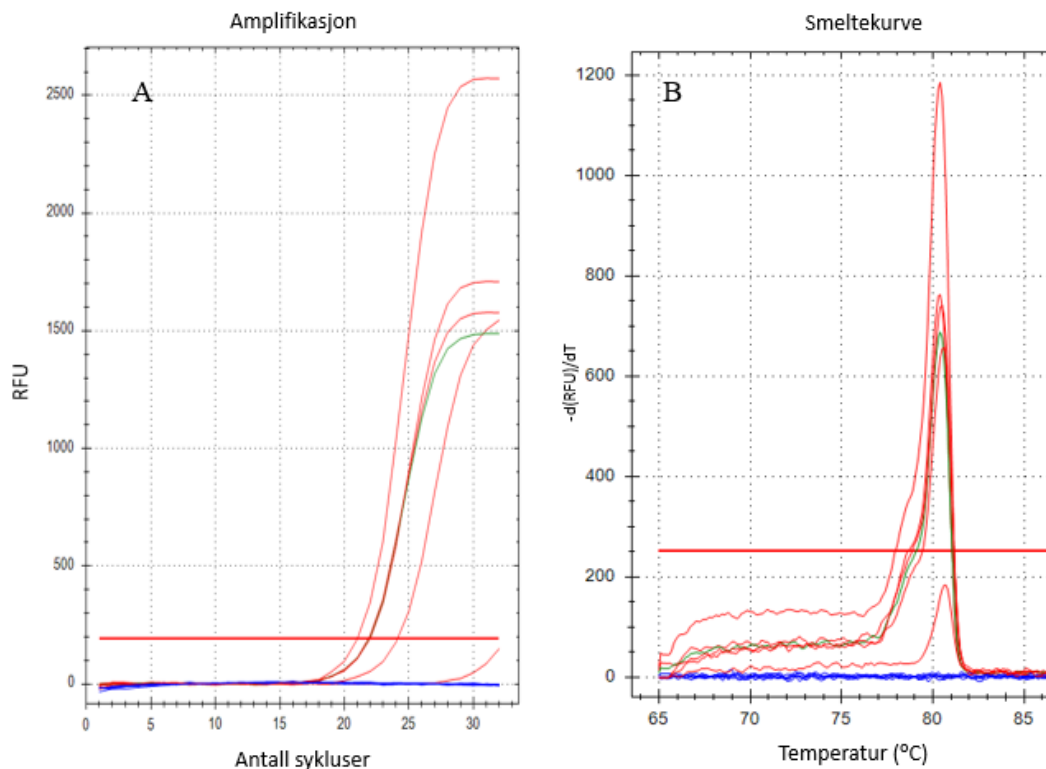


Vedlegg tabell 5 viser DNA-sekvensen til de primersettene benyttet for PCR-basert bibliotekpreparering for NGS. De uthevede basene i indeksprimerne er indeksene. For amplifisering av HPV 16 ble indeksprimer S502 og N701 benyttet, for HPV 18 ble S503 og N701 benyttet og for prøven med 50 % v hver genotype ble S505 og N701 benyttet.

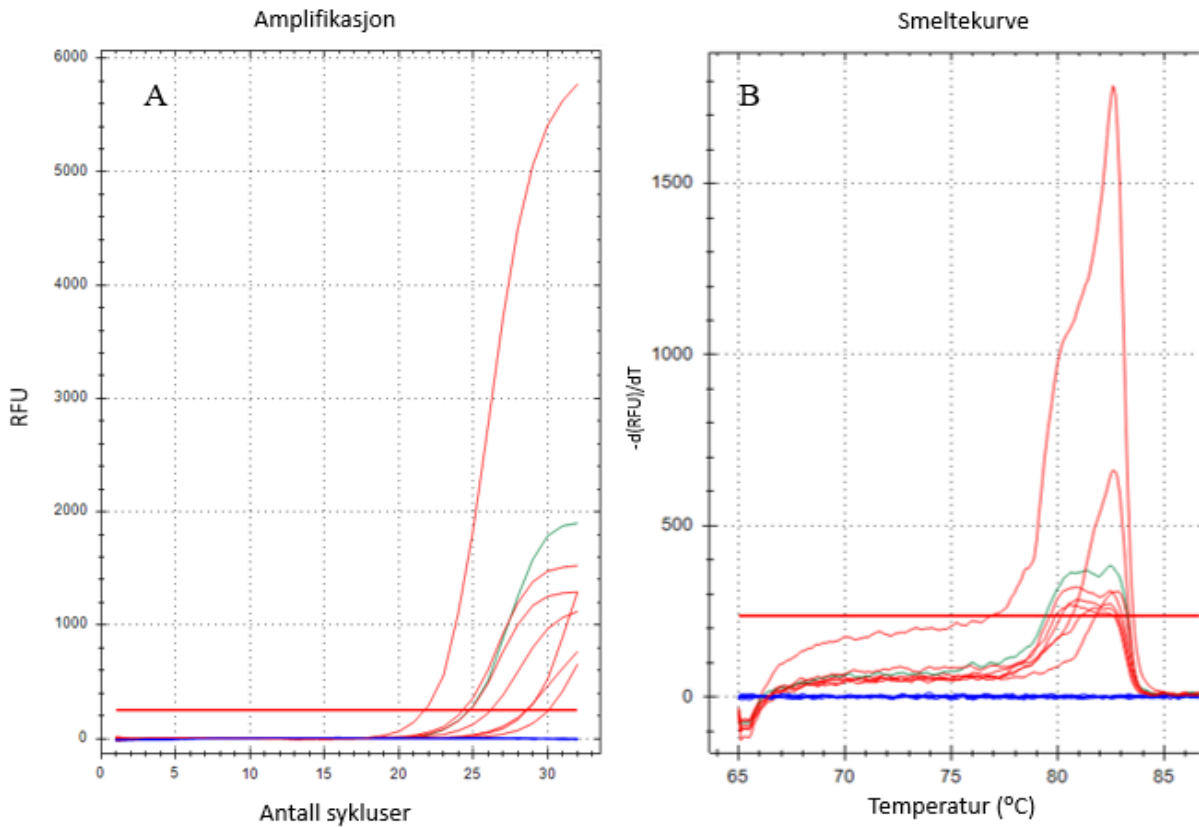
Vedlegg tabell 5: Primere benyttet for dannelse av PCR-basert NGS bibliotek av HPV-amplikon. De uthevede basene i indeksprimerne er indeksene.

Primernavn	DNA-sekvens 5'-3'
Leseprimer 1	TCGTCGGCAGCGTCACGTTGGATGTTTGTAC
Leseprimer 2	GTCTCGTGGGCTCGGACGTTGGATGGAAAAATAAYTG
Indeksprimer S502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <b>CTCTATT</b> CGTCGGCAGCGTC
Indeksprimer S503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT <b>ATCCTCTT</b> CGTCGGCAGCGTC
Indeksprimer S505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <b>GTAAGGAGT</b> CGTCGGCAGCGTC
Indeksprimer N701	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TCGCCTT</b> AGTCTCGTGGGCTCGG
P5	AATGATACGGCGACCACCGAGA
P7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT

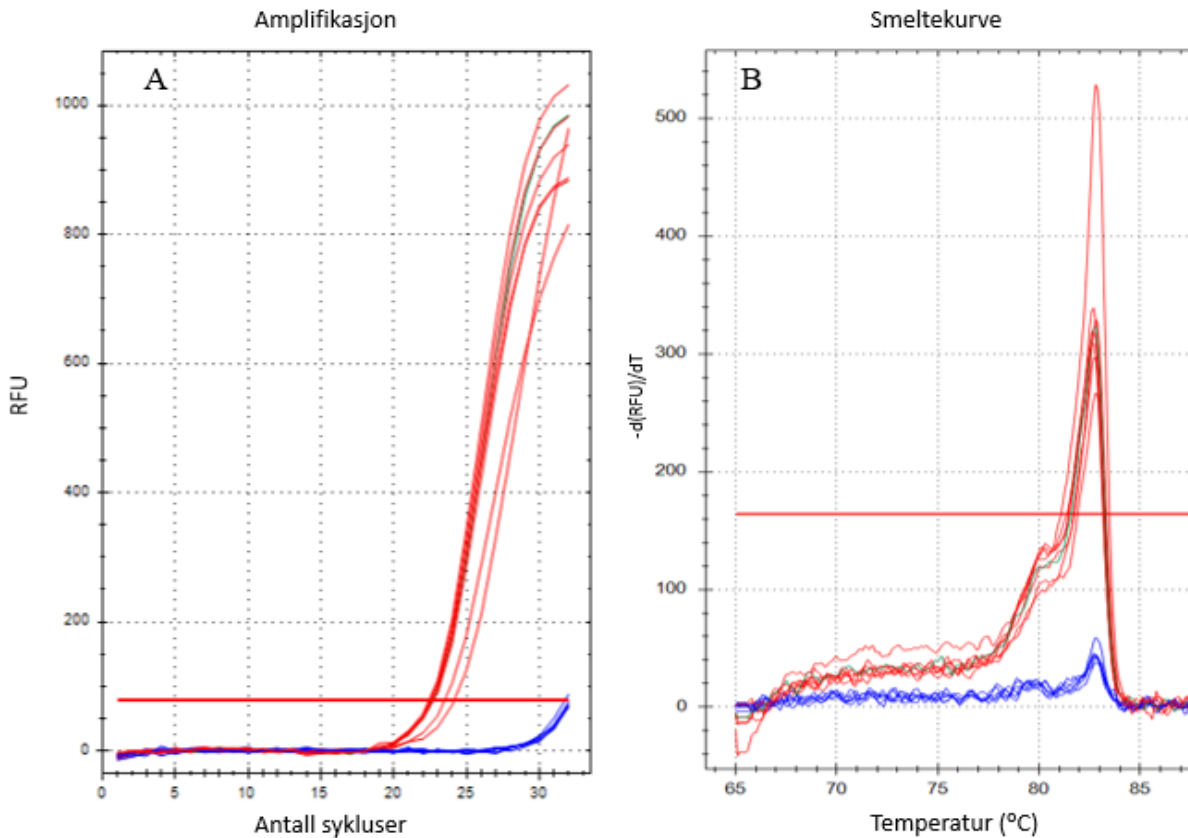
Vedlegg figur 6, 7 og 8 viser smeltepunktsanalyse av optimaliseringsreaksjonene for PCR-basert bibliotekpreparering av HPV til NGS. Vedlegg figur 6 viser resultatene av amplifisering av HPV-amplikon med leseprimerparet, hvor hybridiseringstemperatur for primerparet var best ved 55 °C. Vedlegg figur 7 viser resultater fra amplifisering med indeksprimere og Vedlegg figur 8 viser resultater fra amplifisering med P5/P7 primerparet. For både reaksjonene med indeks- og P5/P7 primerparet var optimal hybridiseringstemperatur 68 °C.



Vedlegg figur 6: Smeltepunktsanalyse for amplifisering av HPV 16 MGP-amplikon, med leseprimerparet. Den grønne kurven viser forholdene som ble benyttet videre,  $C_i$  på 21,9. Smeltepunktet for alle prøvene ligger på 80,4 °C. Blå kurver er dH2O.



Vedlegg figur 8: Smeltepunktsanalyse for amplifisering av HPV 16 amplikon, med indeksprimere. Den grønne kurven viser forholdene som ble benyttet videre, Ct på 22,7 og St på 81,4 og 82,5. Blå kurver er dH<sub>2</sub>O.



Vedlegg figur 7: Smeltepunktsanalyse for amplifisering av HPV 16 amplikon, med P5/P7 primerparet. Den grønne kurven viser forholdene som ble benyttet videre, Ct på 22,7. Smeltepunktet for alle prøvene ligger på 82,7  $^{\circ}\text{C}$ . Blå kurver er dH<sub>2</sub>O.





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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway