

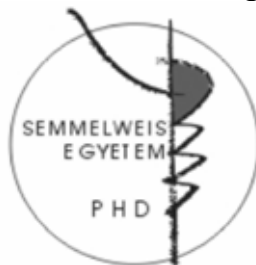
**Új molekulári diagnosztikai eljárás a humán  
papillómavírusok kimutatására: a kísérlettervezési  
módszerek alkalmazása a fejlesztésben, analitikai és  
klinikai értékelés**

Doktori tézisek

**Jeney Csaba**

**Doktori Iskola, Patológiai Tudományok  
Interdiszciplináris Doktori Iskola**

8/3 program: Mikroorganizmusok és anyagaik hatásának  
molekuláris, celluláris és organizmus szintű vizsgálata



Témavezető: Prof. Rozgonyi Ferenc, MD, DSc, PhD

Hivatalos bírálók: Deák Judit, PhD

Sziller István, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Papp Zoltán, MD, DSc, PhD

Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Nagy Erzsébet, MD, DSc, PhD

Prof. Kovalszky Ilona, MD, DSc, PhD

**Budapest, 2008**

# Bevezetés

Kísérlettervezési módszereket általánosan használnak a tudomány számos területén, azonban ezek új értelmezése sokszor jelentősen előrelendíthetik a kutatás egy-egy területét. A Taguchi optimalizálás eredeti felhasználási területe, az optimális körülmények hatékony meghatározása és ezek numerikus tulajdonságainak becslése (Taguchi, 1993). Azonban a Taguchi eljárás ennél több információt is tartalmaz, mivel nem csak az optimális, hanem a körülmények bármely kombinációjának numerikus becslése is alkalmas. Jelentős előnye a módszernek, hogy az optimalizálás és a numerikus becslés, egy lépésben megvalósítható. Továbbá a lehetséges állapotok változtatása esetén a számítások újra elvégezhetők. A módszer általánosan a multiparaméteres rendszerek optimalizálására használják, így jelen esetben ScFv fágok ELISA detektálás optimalizálására, továbbá human papillómavírusok multiplex polimeráz láncreakció (PCR) optimális primer koncentrációjának meghatározására.

Figyelembe véve, a human papillómavírusok szerepét a malignus léziókban (zur Hausen et al., 1975), a fontos és nagy mennyiségben végezhető meghatározás és genotipizálás értéke egyre nagyobb. A HPV genomok diverzitása és a többszörös infekciók nagy száma olyan módszerek bevezetését igényli a klinikai gyakorlatban, amelyek hatékonyan megkülönböztetik a HPV típusokat. Ezen tulajdonságok nem csak az epidemiológiai vizsgálatokban fontosak, hanem a betegek gondozása területén is megtalálják felhasználásukat.

A DNS alapú módszerek általánosan elterjedtek a HPV meghatározás területén. A Yoshikawa és mtsai. (Yoshikawa et al., 1991) által leírt L1 módszer két primert alkalmaz és restriktációs enzim fragment hossz polymorphismust (RFLP) alkalmaz detektálási módszerként. Ez a módszer, azonban nem kellően szenzitív számos fontos genotípus tekintetében (pl. HPV16), időigényes és nem hatékony nagyszámú minta vizsgálata esetén. Egy új módszer került

fejlesztésre, amely kiküszöböli a fenti hátrányokat a human papillómavírusok klinikai meghatározása területén. A módszer vizsgálata során m mind analitikai, mind klinikai vizsgálatokkal bizonyítottuk értékét.

## CÉLKITŰZÉSEK

A kísérlettervezési módszerek bevezetése a human diagnosztikai eszközök fejlesztésébe lehetővé teszi, hogy olyan módszerek fejlesztése is elérhetővé váljék, amelyek nehéz optimalizálási problémákkal járnak. Ezen munka célja, hogy bizonyítsa a Taguchi optimalizálás értékét egy ELISA és egy PCR módszer fejlesztése során. A módosított Taguchi eljárás segítségével lehetővé válik, hogy közvetlenül becsülhessük az ELISA több analitikai paraméterét, így meghatározható a kalibrációs görbe, az optimális körülmények között mérhető szenzitivitás, továbbá a vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti variancia közvetlenül is megbecsülhető. Az eljárás alkalmazása az optimális primer koncentráció meghatározására egy erősen multiplex humán papillómavírus detektálásra alkalmazott PCR rendszer esetén, olyan tulajdonságokkal, mint szélesebb genotípus spektruma detektálása, a rendszer nyitott legyen új genotípusok meghatározásra, továbbá kiegyenlített amplifikáció mellett lehetővé teszi automatizált alkalmazását a genotipizálás területén (hibridizálás). A gondosan kiválasztott amplikon, egy korábban publikált módszer és Yoshikawa L1 (Yoshikawa et al., 1991) amplikon rendszerén alapul. A rendszer analitikai és klinikai vizsgálata, más rendszerekkel való összehasonlítása is célja a dolgozatnak. A klinikai vizsgálat részeként, vizsgálatra kerül a kismencedei gyulladás, és HPV fertőzés együttes előfordulása, ennek vizsgálata, mint lehetséges kockázati faktor.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## ***HPV kontroll törzsek.***

A következő genotípusok kerületek klónozásra : 2a, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55/44, 57, 58, 59, 61, 66, 67, 68, 72, 73 pCR2.1 Topo vektorba (Invitrogen, Carlsbad, CA). Verifikált klinikai mintákat alkalmaztunk a következő genotípusok esetében: (HPV 30, 43, 56, 70, 74, 82, 84, 89, 90, 91).

## ***PCR protokollok (Polymerase Chain Reaction)***

A javított PCR protokoll, az L1F/L1R használatával, a összetétellel került kivitelezésre .4  $\mu\text{M}$  L1F keverék, 3.6  $\mu\text{M}$  L1R primer keverék, 2.5  $\mu\text{l}$  10 $\times$  PCR Gold puffer (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 egység of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (Applied Biosystems, Foster City, CA) és 250  $\mu\text{M}$  mindegyik dNTP-ből (Promega, Madison, WI). Az amplifikáció 95°C 10 perc, 10 ciklus 95°C 30 másodpercig, 45°C 30 másodpercig, 72°C 30 másodpercig, 35 ciklus 95°C 30 másodpercig, 48°C 30 másodpercig, 72°C 30 másodpercig, és egy végső extenziós lépés 72°C 4 másodpercig. A reakciók térfogata 25  $\mu\text{l}$  volt 5  $\mu\text{l}$  DNS mintával reakciókként. A PCR termékeket elektroforézissel detektáltuk, majd hibridizáltuk.

## ***Szekvenálás***

A PCR termékek tisztítottuk High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) használatával. Az így elkészített templát DNS-t szekvenáló reakció segítségével,

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems), extendáltuk és jelöltük. A termékeket ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) kapilláris elektroforézis segítségével szeparáltuk. A DNS szekvenciát a NCBI szolgáltatás segítségével BLAST algoritmus segítségével azonosítottuk.

## ***Hibridizációs próbák***

A próbák (IDT, Coralville, IA) szilárdfázisú hibridizáció céljából jelöltek, fluoreszcein jelölést kapnak a genusz- és genotípus-specifikus, és digitoxin jelölést kapnak a belső kontroll próbák. Az összes próba HPLC tisztított.

## ***HPV meghatározás és genotipizálás szilárdfázisú hibridizáció segítségével***

A biotinilált PCR termékek (amplifikációs termékek, egyetlen biotin jelölt primer jelenlétében) szilárdfázison immobilizáltuk streptavidin segítségével, mikrotitrátor lemezen. A komplementer szálat eluáltuk, majd specifikus próbával hibridizáltunk (fluoreszcein jelölést kapnak a genusz- és genotípus-specifikus, és digitoxin jelölést kapnak a belső kontroll próbák). A kötött próbák anti-fluoreszcein-HRPO és anti-DIG-AP segítségével kerültek detektálásra. A szubsztrátokat egymás után reakciókkal hívtuk, a HRPO fluoreszcens szignál ex/em: 324/410 nm-en került meghatározásra, míg az AP szignál mérése ex/em: 355/460 nm-en történt.

## ***Mintagyűjtés és előkezelés***

Cervikális minták speciális mintavevő kefével kerültek levételre és PBS oldatban szállították őket a laboratóriumba, a minták bőr és nemibeteg ambulanciákról származnak. A mintákat centrifugálás után (2000 g, 10 perc), PBS-ben mosták, majd lízisre kerültek 250 µl

lízisoldat segítségével, amely egyben tartalmazza a hozzáadott HPV kontroll DNS-t is (0.5 mg/ml proteinase K, 0.01 M TRIS-HCl pH8, 0.001 M EDTA pH8). A mintákat vortexeltük és 30 percig 56°C-on inkubáltuk. A DNS izolálás további lépései egy TECAN RSP150 (Tecan Group Ltd., Maennendorf, Switzerland) roboton kerültek kivitelezésre, szilika alapú kémia felhasználásával.

## ***Az L1F/L1R rendszer és a Hybrid Capture II teszt összehasonlítása***

Cervikális minták ASCUS diagnózissal (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) vagy kifejezett diszplázia jeleivel kerültek vizsgálatra. A vizsgálat során Hybrid Capture II tesztet (HC II, Digene Corporation, Silver Spring, MD) és az L1F/L1R rendszert alkalmaztuk, mindenben követve a gyártó utasításait. Az ebben a vizsgálatban felhasznált minták a Digene Cervical Sampler mintavevő készletével kerültek levételre és kétfelé lettek osztva, annak érdekében, hogy az egyik rész a Hybrid Capture II teszt eljárása szerint, míg a másik rész a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) segítségével került preparálásra. Azon amplikonok, amelyek esetén diszkordáns eredményt kaptunk, szekvenálás is elvégzésre került, annak érdekében, hogy a minta helyes státusza meghatározásra kerüljön.

## ***A rendszer vizsgálata klinikai mintákon***

Klinikai mintákat, ASCUS vagy magasabb státussal, egy 360 személyt tartalmazó kohortból, vizsgáltunk az L1F/L1R rendszer segítségével. A negatív és pozitív esetek számát, továbbá a különböző magas-kockázatú HPV genotípusok prevalenciáját vizsgáltuk. Ezek százalékos értékei (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) összehasonlításra kerültek a publikált genotípus eloszlással (Coutlee et al., 2002).

## ***Antigének és antitestek***

A ScFv phagemid, átrendezett hexon specifikus antitestet kódoló, fágokat SURE E. coli sejtek pCANTAB5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) transzformálásával és M13KO7 helper fág fertőzéssel nyertük (Ruzsics et al., 1994). A további lépések a Pharmacia Recombinant Phage Antibody System Expression Module kit-ben leírtaknak megfelelően történtek. Az anti-M13 poliklonális antitest készítése és tisztítása a leírtaknak megfelelően történt (Cooper and Paterson, 1991). A szérum ammónium szulfát precipitációval, majd kationcserélő kromatográfiával volt tisztítva, a nem oldódó komponensek ultracentrifugálással kerültek eltávolításra (Andrew, 1991). Biotinilált anti-nyúl antitest számból származott (Amersham Buckinghamshire, UK) és az Extravidin-HRPO Sigma Deisenhofen, Germany terméke.

## ***ELISA ScFv fágok meghatározására***

Minden reagens PBS került hígításra, és a körülmények és a koncentrációk a Taguchi módszert által előírtaknak megfelelően került kivitelezésre. Minden inkubáció 37 °C-on történt. Minden vizsgálat triplikálva történt. Az ELISA lemezek kötési koncentrációi a következők szerint alakultak: 12 600, 6300, 630, 6.3, 0.063, 0.0063 ng/ml fág PBS-ben hígítva. A protein koncentrációk Coomassie módszerrel lettek meghatározva. Teljes éjszakai inkubáció után a kötött lemezeket négyszer mostuk. A nyúl primer antitest 1:5000, 1:10000 vagy 1:20000 hígításokban 1 óra időtartamban került felvitelre. A lemezeket ezek után vagy blokkoltuk, vagy a további lépések következtek, a Taguchi kiosztásnak megfelelően. A biotinilált anti-nyúl számár antitest, mint másodlagos antitest, 1:500, 1:1000, 1:2000 hígításokban, egy óra időtartamban használtuk. Hasonlóan, mint fent, négyszer mostunk, blokkolás nélkül. Extravidin-HRPO konjugátum 1:500, 1:1000, 1:2000 hígításokban került hozzáadásra, hogy a biotin jelet detektálhassuk és a lemezeket négyszer mostuk. OPD szubsztrátot alkalmaztunk 5, 8, 12 perc előhívási időkkel 4 N kénsavas leállítással. A mérések 492 nm

történtek 620 nm-en mérve a kivonandó háttérrel. Egy párhuzamos kísérletet is elvégeztünk, ahol a fágok felvitele helyett csak a blokkolási lépes került megvalósításra.

### ***Taguchi módszer***

A számítások egy általunk írt Microsoft Excel makróval kerültek kivitelezésre. Minden vizsgálat triplikálva készült. A Taguchi kísérleteket az L18 tábla szerint végeztük. Az L18 táblát használtuk, mert számos előnye van a mi kísérleti rendszerünkben. A teljes optimalizálás csak 18 párhuzamos kísérletet igényel, továbbá segítségével a faktorok egymásrahatásai csökkenthetők, amelyek máskülönben jelentős hatást gyakorolhatnának az optimális körülmények számítására. Ez utóbbi fontos, mivel ilyen interakciók igen gyakoriak ELISA rendszerekben. Az egyik alkalmazott módosítás az L18 tábla első két faktorának összevonása és egy hat-szintű faktor létrehozása, annak érdekében történt, hogy a kötött fágok koncentrációja faktorizálható legyen. Ennek a faktornak, hogy a kalibrációs görbe hatékonyan számítható legyen, legalább négy nagyságrendet kell átfognia. A többi faktor az optimalizáció céljainak megfelelően rendelhető a kísérleti körülményekhez. Az utolsó faktor nem kap hozzárendelést, segítségével mérjük a számítások hibáját. További biokémiai paramétereket a következők szerint számítjuk:

- i. szenzitivitás: a becsült logisztikus görbe alsó korlátja a standard hiba kétszeresével növelve, a 18 kísérlet standard hibái közül a legnagyobbat használtuk
- ii. a vizsgálatokon belüli 18 párhuzamos kísérlet triplikált kísérleteiből azok átlagos varianciájából számítottuk
- iii. a vizsgálatok közötti varianciát triplikátumok átlagos varianciáinak átlaga plusz a vizsgálatokon belüli variancia.

### ***Lépésenkénti optimalizációs módszer***

Minden változót változatlanul alkalmaztuk, egy kivételével, és az első vizsgálat ennek a változónak a harmadik szintjén történt. A



második vizsgálat a második szinten és így tovább. Végül kiválasztva a legjobb szintet, ez a változót fixáltuk és hasonló eljárást követtünk a második változóval, végül az összes változó vizsgálatra került.

### ***Taguchi optimalizáció a primerek optimális koncentrációjának meghatározására***

A változók, melyek ebben az esetben, primer csoportok, a clustalw algoritmus segítségével lettek meghatározva. A PCR és a hibridizáció a fentebb leírtaknak megfelelően történt, ahol is a minták a klónozott genotípusok plasmid hígításai voltak (100, 10, 1 kópia/ul). Az értékelés a detektálási érzékenységek összehasonlításán alapult (alacsonyabb mennyisége detektálása vagy azonos mennyisége magasabb szignállal) az alapul szolgáló eredeti (L1F/L1R) rendszer és a többi kísérlet között. A szignálok az NTC-re normalizált szignálok voltak.

### ***Vizsgálat a kismedencei gyulladásnak, mint kockázati faktornak, meghatározásra***

A vizsgálat két nőbeteg csoportot hasonlított össze. Mintegy 2215 nőbeteg alkotta első csoport, 1999-2001 között, PID (pelvic inflammatory disease – kismedencei gyulladás) diagnózissal került beválasztásra. A PID fizikális, klinikai és laboratóriumi eredmények alapján került diagnózisra. Míg a másik csoport (4217 nőbeteg), 2000-ben jelent meg rutin nőgyógyászati vizsgálaton és a PID diagnózis kizárható volt. HPV vizsgálatok történtek, mindkét csoportban, amint az fentebb leírásra került.

# EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

## ***ELISA optimalizálás Taguchi eljárással***

A Taguchi optimalizációs módszer vizsgálatára ELISA rendszerekben, egy ismertén nehéz ELISA detektálási eljárást választottunk, antigén kötött ScFv fágok detektálását poliklonális antitestek segítségével. Ezen rendszer alkalmazása során magas háttérrel és alacsony érzékenységet találtunk, ami megakadályozta, hogy antigén specifikus fágokat azonosíthassunk. A probléma megoldása érdekében, új anti-fág szérum készült nyúl immunizálással és ennek felhasználása egy sok-változós ELISA optimalizációs problémával állított minket szembe. Taguchi optimalizációs kísérletet végeztünk, fág kötött lemezeken és anélkül, hogy meghatározhatnánk az optimális körülményeket. A háttér kivonása után a “nagyobb jobb” transzformációt végeztük el.

A számított paraméterek egy mintegy 55.80 ng/ml ED50 értéket mutattak és a logisztikus illesztés paraméterei a következők voltak :  $a = 0.37$ ,  $b = .0.68$ ,  $c = 55.80$ ,  $d = 1.54$ , 1.47 ng/ml szenzitivitás mellett (Chard, 1997). A vizsgálatok közötti variancia 6.35%-nak, míg a vizsgálatokon belüli 4.06%-nak adódott. Vizsgáltuk az optimalizálás hatékonyságát, lépésenkénti optimalizációval (Anderson and McLean, 1974), ami nagyon hasonló optimális körülményeket adott. Az egyetlen különbség az Extravidin peroxidáz konjugátum koncentrációban és az extra blokkolási lépésben volt, amik azonban nem rendelkeznek jelentős súllyal az ANOVA szerint, így a szintek között nehezen mérhető bármi különbség. A két eljárás eredménye között az ED50 nem volt statisztikus különbség  $p > 0.05$   $F[1,18] = 0.001618$  az ED50-re és  $F[1,18] = 0.000742$  a meredekségre.

## ***Az ELSIA paraméterek becslése az optimális körülmények esetére***

Annak érdekében, hogy ne csak az optimális körülmények

meghatározásra használjuk a Taguchi optimalizációs eljárást, hanem további hasznos paraméterek becslését is el tudjuk végezni, a speciális hatértékű faktort hozzárendeljük a kötött fág koncentrációkhoz.

Ennek alapján a Taguchi kísérletek eredményei segítségével el tudjuk végezni a standard görbe becslését, az optimális körülmények esetére. Véve a hatértékű faktor, mind a hat értékét, a számításokat elvégezve megkapjuk, az ezen koncentrációkhoz tartozó OD értékeket és ennek alapján a standard görbe megkonstruálható.

Továbbá figyelem veendő, azon változók meghatározása, amik a háttér meghatározásban vesznek részt, azonban nem vesznek részt az eljárás érzékenységének meghatározásában. Ezen változókat azon kísérletek Taguchi értékeléséből határozhatjuk meg, amelyekben nem kötöttünk fágot a lemezekhez, ezeket összehasonlítva az fág kötött Taguchi kísérletek számításaival megkapjuk azon változókat, amelyek csak a háttér meghatározásban vesznek részt. Ezek a számítások és megfontolások nem távolítanak el minden interakciót, azonban igen jól egyező becslésekhez vezetnek: a kísérletes és a becsült görbék a paraméterei tekintetében,  $a = 0.15$ ,  $b = 0.68$ ,  $c = 145.91$ ,  $d = 1.27$  illetve  $a = 0.37$ ,  $b = 0.68$ ,  $c = 55.80$ ,  $d = 1.54$ , a görbék a chi-négyzet teszt szerint is egyetlen eloszláshoz tartoznak 0.99 valószínűséggel. Mindemellett az érzékenységek is meglehetősen közeli: 7.22 ng/ml és 5.57 ng/ml. Végül az vizsgálatok közötti és a vizsgálatokon belüli varianciák és közeli: a becsült értékek 7.02% és 4.66%, míg a meghatározott 6.35% és 4.06%. Ezek az eredmények aláhúzzák a módszer hatékonyságát ezen értékek becslésében. Ezen előzetes kísérletek alapján gondoltuk, hogy ezen optimalizációs módszer alkalmas lesz, más területeken is, így az L1F/L1R primer rendszer optimalizációjára is.

### ***Az L1F/L1R primer rendszer fejlesztése.***

A fejlesztés első lépéseként meghatároztuk a L1C-PCR rendszer érzékenység 46 HPV genotípus tekintetében. Ezen eredmények és a primerkötő régió alapján egy 15 forward és 16 reverz primert

tartalmazó primer rendszert terveztünk. A primer amplifikációs hatékonyságát optimalizáltuk, mind a primerek relatív koncentrációjának változtatásával, mind a primer szekvenciák újratervezésével. Nem illeszkedő bázisok segítségével csökkenthető a primerek belső versengése, azonban a nem illeszkedő bázisok számát nem szabad túlságosan megnövelni, különösen, a primerek 3' végénél. Ez a megközelítés hatékony és egyenletes primer hatékonyságot eredményezett. Az optimalizált reakció igen magas szenzitivitást mutatott, továbbá az egyenletes amplifikációs hatékonyságot. Megjegyzendő, hogy a reakció igen széles genotípus spektrummal is rendelkezik.

Az L1F/L1R rendszer, elméletileg, 52 genotípus detektálásra képes, azonban ennek ellenőrzése csak 46 genotípus esetén volt megvalósítható. További vizsgálatok szükségesek a HPV 69, 81, 83(MM7), 85 és az új HPV 86, 87 (Menzo et al., 2001) genotípusok esetén.

Az első fejlesztési lépések után, a lehetséges kísérleti teret tovább vizsgáltuk, hogy esetleg, jobb megoldást találjunk, a filogenetikai csoportokba rendezett primerek relatív koncentrációinak meghatározására. A clustalw algoritmust használva határoztuk meg a primerek filogenetikai csoportjait. Optimalizációs kísérleteket terveztünk, annak érdekében, hogy a legjobb szenzitivitást érjünk el a legtöbb genotípus esetén. A Taguchi optimalizációs megoldást választottuk, azonban mivel a Taguchi eljárás alapfeltevése, hogy a faktorok között az interakciók egy bizonyos szint alatt maradnak és ez a mi rendszerünk nem reális feltevés, egy módosított kiértékelést választottunk. A eljárás szerint kivitelezett kísérleteket elvégeztük, azonban az optimális körülményeket közvetlenül a megvalósított kísérletek közül választottuk. A Taguchi eljárás ortogonális mátrixot használ, annak érdekében, hogy a megvalósított kísérletek, minél jobban elkülönüljenek a kísérleti térben. Számos más esetben is azt találtuk, hogy ez a megközelítés hatékonyan találja meg a rendszer lokális vagy globális optimumát. Mind a lokális, mind a globális optimumokat tovább finomíthatjuk, azzal, ha a további kísérleteket

ezen optimum körül vizsgáljuk tovább. Azonban, általában, egy optimalizációs lépés elegendő, hogy megfelelő megoldást találjunk. Az eredményeknek megfelelően, egy kevéssel érzékenyebb megoldást találtunk, összehasonlítva az eredeti kísérleti felállással, a különbség általános kevesebb primer használatával érhető el. Amint azt más rendszerben kimutatták (alacsony multiplexiánál), a primer koncentráció általában rendelkezik egy optimummal (Linz et al., 1990), azonban nagy multiplexitású rendszerekben ez az első bizonyíték.

## ***Az amplifikáció vizsgálata***

Összehasonlítottuk az eredeti Yoshikawa rendszert (Yoshikawa et al., 1991), az újonnan fejlesztett L1F/L1R rendszerrel. A következő genotípusok detektálási érzékenységét teszteltük, mindkét rendszerben, alacsony-kockázatú HPV: 6, 11, 42, 55/44, magas-kockázatú HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66, 68. Összehasonlítottuk a legalacsonyabb detektálható kópiaszámokat, az L1F/L1R rendszer nagyságrendekkel érzékenyebbnek bizonyult.

Mindkét rendszert vizsgáltuk a genotípus spektrum tekintetében, 46 genotípust vizsgáltunk nagy kópiaszám mellett. A Yoshikawa rendszer nem vagy igen gyengén amplifikált számos genotípust (2a, 3, 7, 13, 27, 29, 35, 40, 42, 43, 55/44, 57, 73, 74, 84), míg L1F/L1R rendszer kiegyenlített és érzékeny amplifikációt produkált. Yoshikawa módszer általában kevésbé volt érzékeny az alacsony kockázatú genotípusokra így HPV 11, HPV 42, HPV 44/55 tekintetében, továbbá bizonyos magas kockázatú genotípusra (HPV 16, HPV 35), ezeket csak igen magas kópiaszám mellett detektálta, ami klinikailag elfogadhatatlan. Annak figyelembevételével, hogy a klinikai minták sokszor csak alacsony mennyiségű vírust tartalmaznak, a Yoshikawa módszer általános érzéketlennek bizonyult.

A reakciók specificitását számos cervixpatogén kórokozóval vizsgáltuk. Herpes simplex virus, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma

genitalium. Az L1F/L1R rendszer csak a HPV pozitív mintákat amplifikálta.

## ***Genusz-specifikus detektálás***

A klinikumban előnyös, ha a HPV kimutatás összességében, a vizsgált genotípusok összességére nézve, is lehetséges. Az amplifikációs rendszer általában sokkal szélesebb genotípus spektrummal rendelkezik, mint amit a detektálásnál kihasználnak, így a nem detektált genotípusok jelenléte csak egy általános detektálási megközelítéssel lehetséges. Ez a lehetőség segít a technikailag álnegatív eredmények elkerülésében, továbbá ezen genotípusok klinikai értéke bár nem ismert, azonban lehetséges, hogy bizonyos esetekben, akár klinikailag érdekes lehet. Az általános detektálás és a genotipizálási eredmény szükséges konkordanciája, gyakorlatilag lehetetlenné teszi a technikai hibákat.

Az L1F/L1R amplikon rendelkezik egy erősen konzervált régióval, ahová genusz specifikus próbák tervezhetők. A szekvencia adatok alapján 16 oligonukleotid próba keverékét terveztünk.

## ***Genotípus specifikus detektálás***

A próbák egy egyedülállóan variábilis régióra lettek tervezve, amelyet konzervált régiók fognak közre. Számos mikrodéláció, mikroinzerció adja a régió variabilitását, ennek megfelelően igen specifikus próbák tervezhetők erre a szakaszra. Chan és mks. (Chan et al., 1995) összehasonlították egy 291 bázispár hosszú szakaszt a 460 bázispár hosszú MY09-MY11 amplikonnak, annak érdekében, hogy 95 HPV genotípus filogenetikai rokonsága felderíthető legyen. Ezekre adatokra alapítva, kiválasztottuk a HPV 6, 11, 44 típusokat az A10 filogenetikai csoportból, hogy a hibridizáció specificitását tesztelhesük. Azért választottuk ezt a csoportot, mert ezek a genotípusok igen közeli rokonságban állnak (Chan et al., 1995). Az összehasonlítás érdekében a genotípusok sorozathígításait vizsgáltuk, belső kontroll jelenlétében. Mindegyik amplifikációt hibridizáltuk mindhárom próbával. A kereszthibridizációk szintjét a kapott

szignálok alapján értékeltük. A genotípusok mindegyike csak a megfelelő genotípusú próbával adott pozitív reakciót, ennek megfelelően az öt nem illeszkedő bázispár, ami a HPV6 és HPV11 között van, elegendő a teljes diszkrimináció eléréséhez, még nagyon magas kópiaszám esetén is. Erre a kísérletre alapozva a továbbiakban, minimálisan, öt nem illeszkedő bázispár meglétére törekedtünk bármely két próba között.

Az L1F/L1R rendszer szekvenciáira illesztve, az elméletileg amplifikálható 52 genotípusra terveztünk specifikus próbákat. A gyakorlatilag azonos szekvenciájú, alacsony kockázatú HPV 44 (Lorincz et al., 1992) és HPV 55 (Favre et al., 1990) genotípusok kivételével, a próbák ezzel az öt bázispáros szabállyal megtervezhetők voltak.

## ***Klinikai vizsgálatok***

A rendszer klinikai teljesítőképességét a Hybrid Capture II teszttel való összehasonlításában vizsgáltuk, 81 olyan mintán, amely citológiai diagnózisa ASCUS vagy ennél súlyosabb volt. A vizsgálat során a magas kockázatú genotípusok meghatározását vizsgáltuk (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). A nem egyező eredményeket szekvenálás segítségével tisztáztuk. Továbbá genotipizálást végeztünk, mind az alacsony kockázatú, mind a magas kockázatú vírusok esetében.

A vizsgálatok első körében egyező pozitív minta 28, míg egyező negatív 40 adódott. Hat minta esetében az L1F/L1R rendszer pozitív volt a HCII negatív, míg 7 minta esetében a HCII rendszer adott pozitív eredményt és az L1F/L1R volt negatív. Az egyezés a két rendszer között megfelelő volt, 83.9% (68 a 81 mintából egyezett) ( $\kappa=0,67$ , McNemar's chi négyzet  $P<0,0001$ ;  $Q=0.65$ , Yule teszt).

Ezekután a diszkordáns eredményeket adó minták szekvenálását végeztük el, annak érdekében, hogy a magas kockázatú/ alacsony kockázatú vírus jelenlétét bizonyíthassuk. Ennek megfelelően 13 esetből 10-ben az L1F/L1R eredményről bizonyítottuk, hogy

megfelelő és csak három esetben feltételezhető az L1F/L1R rendszer álpozitivitása. Nem volt L1F/L1R álnegatív eredmény és összehasonlítás kiváló eredményt adott 96.2% (78 a 81 mintából egyezett) ( $p=2,58 \cdot 10^{-19}$ , Fisher Exact Probability teszt). L1F/L1R rendszer becsült érzékenysége 91,1% (31/34) specificitása 100% (47/47). A nem egyező eredmények elsősorban a PCR nagyobb érzékenységének tudhatók be, továbbá ismert (HPV 6, 42, 53), továbbá eddig nem ismert keresztreakcióknak (HPV 30, 82) köszönhető.

További vizsgálatok (szemikvantitatív HPV DNS mérés, genotipizálás és egyéb analitikai adatok) alapján a fennmaradó három álpozitív minta esetleg máshogy is interpretálható. Ennek megfelelően megpróbáltunk keresztreakciót detektálni a HPV90 és a HPV45 között (a HPV90 a szekvenálás alapján mutattuk ki a mintában, míg a L1F/L1R alapján a HPV45 jelenléte tűnt bizonyítottnak), azonban nem voltunk képesek kimutatni keresztreakció, tiszta DNS használva. Következésképpen, mind a HPV45, mind HPV90 DNS valószínűleg jelen volt a mintában, azonban a szekvenálás nem volt képes információt szolgáltatni a kisebb mennyiségű HPV45 genotípus jelenlétéről.

Az L1F/L1R további tesztelése érdekében egy 360, ASCUS diagnózissal rendelkező, személyt tartalmazó kohortot is vizsgáltunk. A kohortban 198 HPV negatív, 162 pozitív találtunk, ahol a pozitív eseteket tovább bontva, 120 esetben egyetlen genotípust találtunk, 33 esetben két HPV típust sikerült azonosítani, míg 9 esetben 3 vagy többes infekciót detektáltunk. A leggyakoribb típus a HPV16 volt (36 eset), ezt követte a HPV31 23 esete. Alacsony kockázatú vírust találtunk 19 esetben. Összehasonlítva a fenti eredményeket Coutlee és mks. (Coutlee et al., 2002) eredményeivel, 14 HPV genotípus tekintetében, nagyon hasonló eloszlást kaptunk, az eltérések mögött populáció különbségeket feltételezve. A statisztikai elemzés erős korrelációt tart fel a két vizsgálat között. Mind a Wilcoxon signed-ranks teszt ( $t= 1.005398$ ,  $P < 0.05$ ) és a Mann-Whitney U-test ( $z= -0.781111$ ,  $P < 0.05$ ) is erős összefüggést mutatott.



A továbbiakban vizsgáltuk a HPV jelenlétét 2,215 pozitív kismencedei gyulladás (PID) diagnózisú és negatív betegekben. A HPV infekció gyakorisága szignifikáns eltérést mutatott, 33.74% és 26.40% ( $p < 0.001$ )

A Taguchi optimalizáció kísérlettervezési eljárás bevezetésével képesek voltunk optimális megoldásokat találni több multifaktoriális optimalizációs problémára, így egy ELISA és egy erősen multiplex PCR eljárás esetén is, bizonyítva a módszer könnyű alkalmazhatóságát többféle biomolekuláris detektáló eljárás esetén.

A HPV fertőzések diagnosztikája érzékeny és specifikus vírus DNS kimutatási eljárásokat igényel. A HPV genom L1 régiója általánosan használt ilyen konszenzus primer rendszerek felállítására, mint például a MY09/11, PGMY, SPF és a GP5+/6+ rendszerek (Kleter et al., 1999). A dolgozatban egy új eljárást leírást adtuk, amely számos előremutató tulajdonsággal rendelkezik a korábban publikált eljárásokkal szemben. Annak érdekében, hogy a genotípusok egyenletesen érzékeny detektálását elérjük egy több primeres rendszer került megvalósításra.

A HPV vakcináció területén elért újabb eredmények (Munoz et al., 2004) (Berencsi et al., 2006) előtérbe helyezik a genotipizálást, különösen fontos, hogy a genotípus meghatározás megfelelő korrelációt mutasson a típusok evolúciós szegregációjával.

A párhuzamos genusz és típus-specifikus meghatározás növeli a rendszer megbízhatóságát, továbbá a genusz specifikus detektálás lehetővé teszi új genotípusok meghatározását, és lehetővé teszi, hogy szemikvantitatív értékelése becslést ad a jelenlévő vírus mennyiségére. Saját gyakorlatunkban erős korrelációt láttunk a genusz és a típus specifikus szignálok között, egyszeres infekciók esetén, így ez az egyezés, akár a többszörös infekciók kizárására is alkalmazható.

A rendszer hatékonyságát a Taguchi optimalizálási kísérlet is alátámasztotta. Az eredményeknek megfelelően csak egy alig jobb megoldás adódott, az eredeti reakcióval összehasonlítva (L1F/L1R). Amint az más rendszerekben bizonyított a primer koncentráció

általában rendelkezik egy optimummal. Az eredeti rendszert lépésenként fejlesztettük és tulajdonságai igen kiemelkedőek (kevesebb, mint 100 kópia érzékenység, több mint 20 genotípus esetén), továbbá a fejlesztése igen hosszú időt vett igénybe, ennek fényében a Taguchi optimalizáció kiemelkedő hatékonysága nyilvánvaló, hiszen egy jobb megoldást bizonyított egyetlen lépésben. A másik oldalról ez a kísérlet alkalmas volt, hogy az eredeti reakció képességeit megfelelően nyilváníthassuk.

Összehasonlítottuk az L1F/L1R és a Hybrid Capture II (HCII) rendszerek klinikai képességeit, a HCII reakciót széleskörűen használják és a terület kvázi standard reakciójaként fogadhatjuk el. Összességében az eredmények kiváló egyezést bizonyítottak, mivel 78 minta a 81-ből bizonyult egyezőnek.

Hasonlóan a genotípus meghatározás, egy 360 személyt tartalmazó kohortban, nagyon hasonló eloszlást mutatott a Coutlee és mkts. (Coutlee et al., 2002) által publikált PGMY rendszer adataival, erős összefüggést mutatva a két rendszer között.

Továbbá a HPV infekció PID estében szignifikánsan magasabb mutatkozott, mint a nélkül.

A HPV diagnosztikai eljárások klinikai alkalmazása a folyamatosan szélesedik, így a nemzeti hatóságok a HPV diagnosztika bevezetését fontolgatják, annak érdekében, hogy növeljék a szűrési programok hatékonyságát. Azokban az országokban, ahol a HPV szűrést már bevezették, az epidemiológiai vizsgálatok szerint a méhnyakrák csökkenő tendenciát mutat (Berkhof et al., 2005). A vakcinálás hamarosan ugyancsak hatással lesz a HPV diagnosztikai igényekre, valószínűleg növeli. Ezzel a háttérrel számolva, a meglévő eljárások további fejlesztése elengedhetetlen, hogy a még meglévő problémákat kiküszöbölhessük.

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

Új kísérlettervezési módszereket javasoltunk a human diagnosztikai eszközök fejlesztése területén. A Taguchi optimalizáció hatékonyságának bizonyítását két rendszer esetében is elvégeztük, egy ScFv fágokat detektáló ELISA és egy multiplex PCR módszerre is sikeresen alkalmaztuk. A módszer gyors, egy lépésben elvégezhető, ellentétben a tradicionális lépésenkénti optimalizációval. A módszer alkalmazhatóságot tovább javítottuk, a faktorok speciális hozzárendelésével, így lehetővé vált, hogy az ELISA biokémiai paramétereit is megbecsülhessük az optimális körülmények esetén. Hasonlóan sikeresen bizonyítottuk az optimális primer koncentráció létét a L1F/L1R PCR rendszer esetében, egy módosított Taguchi optimalizációs eljárás segítségével.

Egy új PCR eljárást fejlesztettünk, ami alkalmas a HPV genotípus spektrummal rendelkezik, mint a korábbi rendszerek, lehetséges alkalmazása új genotípusok detektálására, kiegyenlített amplifikációt eredményez és automatizálható. Az új eljárás genusz és típuspecifikus detektálást alkalmaz, amelyek optimális tervezését két szeparált ampikon régió felismerése tette lehetővé. Az új PCR rendszer, az optimalizált primerek alkalmazásával, automatizált genotipizálást tesz lehetővé.

Összehasonlítva más rendszerekkel az analitikai és klinikai viselkedést vizsgáltuk. A Hybrid Capture II (HCII) összehasonlítása az L1F/L1R rendszerrel kiváló eredményt adott, a HCII, elterjedtsége miatt, általános összehasonlítási alap, így magas szenzitivitás 91,1%, és a 100%-os specificitás megfelelően validálja az új rendszer használhatóságát. Az eredmények szekvenálás segítségével elvégzett verifikálása után, 78 minta helyes eredményt adott a 81 vizsgált mintából.

A klinikai vizsgálat részeként vizsgált kismencedencei gyulladós esetekben a HPV prevalencia magasabbnak adódott a pozitív PID diagnózisú populációban (33.74%), összehasonlítva a negatív

kontroll csoporttal (26.40%) ( $p < 0.001$ ). felvetve, hogy a PID betegek körében magasabb a HPV fertőzés kockázata.

## **Saját közlemények jegyzéke**

### ***Az értekezés témájával összefüggő***

Jeney C, Takacs T, Sebe A, Schaff Z.

Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer

system based multiplex PCR and hybridization.

J Virol Methods. 2006 Dec 11; [Epub ahead of print]

Skapinyecz J, Smid I, Horvath A, Jeney C, Kardos L, Kovacs P.

Pelvic inflammatory disease is a risk factor for cervical cancer.

Eur J Gynaecol Oncol. 2003;24(5):401-4.

Jeney C, Dobay O, Lengyel A, Adam E, Nasz I.

Taguchi optimisation of ELISA procedures.

J Immunol Methods. 1999 Mar 4;223(2):137-46.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretném kifejezni hálámat mindazok iránt, akik lehetővé tették ezen tézisek megszületését. Köszönetet szeretnék mondani az Orvosi Mikrobiológiai Intézet kollektívájának, akik lehetővé tették a munkák kivitelezését és támogattak engem az évek során. Köszönet illeti azokat a segítőttemet, akik az utóbbi hónap alatt, tevőleges segítséget nyújtottak tézisek elkészítéséhez. Hálás vagyok a Genoid Kft. Tulajdonosinak és ottani kollégáimnak, az ő hitük, türelmük nélkül valószínűleg ezek a tézisek nem készültek volna el. Legvégül, de korántsem utolsó sorban, szeretném megköszöni, feleségem, Erika türelmes szerelmét, hogy lehetővé tette, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.