

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Blanka KUŠAR

**DIPLOMSKA NALOGA**

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ  
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2011

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



Blanka KUŠAR

**DOKAZOVANJE IN TIPIZACIJA VIRUSA *MOLLUSCUM CONTAGIOSUM* V  
KLINIČNIH VZORCIH Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO**

DIPLOMSKA NALOGA

**DETECTION AND TYPISATION OF *MOLLUSCUM CONTAGIOSUM* VIRUS IN  
CLINICAL SAMPLES USING POLYMERASE CHAIN REACTION AND  
SEQUENCING**

GRADUATION THESIS

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca, dr. med. in somentorstvom dr. Boštjana Kocjana, univ. dipl. mikrobiol.

## **Zahvala**

Iskrena hvala mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med., ki mi je svetoval, pomagal z različnimi nasveti in nenazadnje tudi zaupal vame. Hvala.

Hvala tudi somentorju, dr. Boštjanu Kocjanu, univ. dipl. mikrobiol., ki mi je pomagal pri praktičnem delu me usmerjal ter mi strokovno svetoval in mi posvetil tudi veliko časa in truda pri nastanku mojega končnega izdelka. Hvala.

Hvala prof. dr. Mariu Poljaku, da mi je omogočil delo v njegovem laboratoriju.

Hvala prim. dr. Marku Potočniku, za vso pomoč pri zbiranju kliničnega materiala.

Hvala gre tudi vsem mojim sodelavcem iz laboratorija, za vso pomoč in prijetne trenutke pri delu; Maji Lunar, Tini, Robiju, Petri, Kristini, Anji K.

Nenazadnje hvala tudi mojim staršem, sestri, Mitji za vso podporo, zaupanje in zato da ste verjeli vame. Brez vas mi ne bi uspelo.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca in somentorstvom dr. Boštjana Kocjana.

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Član diplomske komisije: asist. dr. Jurij Trontelj

## KAZALO:

<b>POVZETEK</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>X</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 VIRUS <i>MOLLUSCUM CONTAGIOSUM</i> .....	1
1.1.1 <i>Virus Molluscum Contagiosum in njegov genom</i> .....	2
1.1.2 <i>Patogeneza okužbe z virusom MCV</i> .....	3
1.2 EPIDEMIOLOGIJA MCV .....	3
1.3 KLINIČNA SLIKA MCV .....	4
1.4 DIAGNOZA MCV .....	5
1.4.1 <i>Verižna reakcija s polimerazo</i> .....	5
1.4.1.1 PCR v realnem času .....	6
1.4.1.2 Določanje nukleotidnega zaporedja .....	9
1.5 ZDRAVLJENJE .....	10
1.6 HUMANI PAPILOMA VIRUSI .....	11
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>13</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1 MATERIAL .....	14
3.1.1 <i>Vzorci</i> .....	14
3.2 METODE DELA .....	14
3.2.1 <i>Postopek osamitve celokupne DNA</i> .....	14
3.2.2 <i>Preverjanje kakovosti osamljene DNA in odsotnost zaviralcev PCR</i> .....	16
3.2.3 <i>Določanje DNA MCV z metodo verižne reakcije s polimerazo</i> .....	17
3.2.3.1 PCR v realnem času .....	17
3.2.3.2 Klasični PCR .....	18
3.2.4 <i>Dokazovanje DNA HPV</i> .....	19
3.2.5 <i>Dokazovanje pridelkov PCR, pomnoženih s klasičnim PCR</i> .....	19
3.2.6 <i>Čiščenje pridelkov PCR</i> .....	20
3.2.7 <i>Določanje koncentracije pridelkov PCR</i> .....	21
3.2.8 <i>Sekvenčna reakcija</i> .....	22
3.2.9 <i>Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije</i> .....	22
3.2.10 <i>Določanje nukleotidnega zaporedja</i> .....	24
3.2.11 <i>Analiza nukleotidnih zaporedij in določitev podtipa MCV</i> .....	24

<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>25</b>
4.1	DOLOČANJE GENA ZA HUMANI BETA-GLOBIN.....	25
4.2	POMNOŽEVANJE DNA MCV .....	26
4.2.1	<i>Pomnoževanje MCV z RT-PCR.....</i>	<i>26</i>
4.2.2	<i>Pomnoževanje MCV DNA s klasično metodo PCR.....</i>	<i>27</i>
4.3	POMNOŽEVANJE HPV DNA.....	27
4.3.1	<i>Pomnoževanje HPV s klasično metodo PCR.....</i>	<i>27</i>
4.4	REZULTATI DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA IN GENSKEGA PODTIPA .....	28
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>32</b>
	<b>PRILOGA.....</b>	<b>33</b>
	<b>VIRI .....</b>	<b>35</b>

## KAZALO SLIK:

Slika 1: Shematski prikaz poksvirusa (23). .....	2
Slika 2: <i>Molluscum contagiosum</i> , prikazan z elektronsko mikroskopijo (8).....	3
Slika 3: Shematski prikaz poteka reakcije PCR (12).....	5
Slika 4: Mehanizem delovanja TaqMan sonde.....	8
Slika 5: Pomnoževalna krivulja za tri vzorce (36).....	9
Slika 6: Shematski prikaz ročne osamitve nukleinskih kislin.....	15
Slika 7: Shema in princip delovanja čiščenja sekvenčne reakcije.....	23
Slika 8: Prisotnost beta globina v tkivnih vzorcih MCV.....	25
Slika 9: Primer uspešnega pomnoževanja DNA MCV.....	26
Slika 10: Fotografija elektroforeznega gela 9 nanešenih pridelkov PCR.....	27
Slika 11: Fotografija elektroforeznega gela 4 nanešenih pridelkov PCR.....	28
Slika 12: Določitev nukleotidnega zaporedja ter razlike med podtipom 1 in 2.....	29

## KAZALO PREGLEDNIC:

1. Preglednica: Program za pomnoževanje pri PCR v realnem času .....	18
2. Preglednica: Program za pomnoževanje pri klasičnem PCR .....	18
3. Preglednica: Prikaz kvalitativnih rezultatov pri dokazovanju MCV DNA z RT-PCR.....	27
4. Preglednica: Prikaz dobljenih genetskih podtipov pri 39 izolatih MCV.....	29

## POVZETEK

*Molluscum Contagiosum* (MC) je virusna kožna bolezen, ki jo povzroča virus *Molluscum contagiosum* (MCV) iz družine poksvirusov. Najpogosteje kožne spremembe, ki nastanejo kot posledica okužbe z MCV najdemo pri otrocih in spolno aktivnih osebah. Na prizadeti koži jih vidimo kot posamezne spremembe z gladko ali bisernato površino, različnih velikosti, ki so v sredini ugreznjene. Lahko se pojavijo kjerkoli na koži. Inkubacijska doba naj bi trajala od 1 tedna do 1 meseca. Moluski so lahko podobni tudi navadnim kožnim ali genitalnim bradavicam, ki jih povzroča humani papiloma virus (HPV), in jih zato občasno zamenjamo z njimi.

Osnovni namen naloge je ugotoviti, ali so v spremembah, ki jih klinično opredelimo kot *molluscum contagiosum* (MC), prisotni virusi *Molluscum contagiosum* (MCV) in kateri genetski podtipi in njihove podtipske različice se v njih pojavljajo.

Iz vseh vzorcev smo najprej osamili DNA po protokolu za osamitev DNA iz tkiv. Na kar smo vse vzorce DNA pred začetkom dokazovanja okužbe z MCV testirali s PCR za humani beta-globin, da smo dokazali uspešnost osamitve DNA. Sledilo je določanje DNA MCV z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času ter s klasičnim PCR. Dokazovali smo tudi DNA HPV. Vse uspešno pomnožene pridelke s klasičnim PCR smo dokazovali kvalitativno z gelsko elektroforezo. Pred izvedbo sekvenčne reakcije smo pridelke PCR očistili ter jim odstranili soli, encime, nevgrajene nukleotide in ostale nečistoče. Čiščenju pridelkov PCR je sledilo določanje njihovih koncentracij. Naslednji korak pri določitvi nukleotidnega zaporedja DNA MCV je bila izvedba sekvenčne reakcije. Pred analizo z avtomatskim sistemom za določanje nukleotidnih zaporedij smo pridelke sekvenčne reakcije očistili. Z metodo avtomatskega sekveniranja smo vsem izolatom določili nukleotidno zaporedje.

Z obema metodama (verižna reakcija s polimerazo v realnem času in klasični PCR) smo določili enako število pozitivnih in negativnih vzorcev. In sicer 39 (90,7 %) MCV pozitivnih vzorcev in 4 (9,3 %) negativne MCV vzorce. Od tega smo 24 (55,8 %) vzorcem določili genotipom 1 in 15 (34,9 %) vzorcem genotipom 2. V vseh vzorcih, ki so bili negativni na DNA MCV, smo dokazali prisotnost DNA HPV.



## ABSTRACT

*Molluscum Contagiosum* (MC) is a benign skin tumour, caused by a poxvirus, that affects mostly children and young adults. It mainly affects children, sexually active adults. The typical molluscum contagiosum lesion is a small firm umbilicated papule with a smooth, waxy, or pearly surface. They can appear anywhere on the skin. The incubation period may be 1 week to several months. *Molluscum contagiosum* lesions may be mistaken for Human Papilloma Virus (HPV).

In this graduation thesis was detecting of MCV DNA in Molluscum Contagiosum lesions and determining which genotype is mostly present in Slovenian population.

DNA was first extracted from all samples according to the protocol for the isolation of tissues. All DNA samples prior evidence of infection with MCV were tested by PCR for human  $\beta$ -globin gene to prove the extraction of DNA. This was followed by determination of MCV DNA with the method of real-time polymerase chain reaction PCR and conventional PCR. All successfully amplified products from conventional PCR were detected qualitatively by gel electrophoresis. Before carrying out the sequential reactions PCR products were purified and salts, enzymes, unmounted nucleotides and other impurities were removed. Then their concentrations were determined. The next step in determining the nucleotide sequence of DNA MCV was implementing sequential reactions. Prior to analysis by an automatic system for determining the nucleotide sequences the products of sequential reactions were cleaned. Then nucleotide sequences were determined with an automatic sequencing.

With both methods (real-time PCR and conventional PCR), we determined an equal number of positive and negative samples with both methods were determined: 39 (90.7%) MCV positive samples and 4 (9.3%) MCV negative samples. Genotype 1 was present in 24 (55.8%) samples and genotype 2 in 15 (34.9%) samples. In all samples which were negative for MCV DNA, the presence of HPV DNA was detected.

## SEZNAM OKRAJŠAV

- MCV: *Molluscum contagiosum* virus (angl. *M. C. V.*)
- DNK: Deoksiribonukleinska kislina (angl. *DeoxyriboNucleic Acid*)
- PCR: Verižna reakcija s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*)
- BP: Bazni par (angl. *Baise Pair*)
- HIV: Virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl. *Human Immunodeficiency Virus*)
- RPM: Obrati na minuto (angl. *Rotations Per Minute*)
- RT-PCR: Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *Real-Time PCR*)
- OZ: Oligonukleotidni začetnik
- ddNTP: Dideoksi nukleozid trifosfat (angl. *DiDeoxy Nucleoside TriPhosphate*)

## 1 UVOD

Poksvirusi so skupina velikih DNA virusov. Bolezni povzročajo tako pri ljudeh kot pri živalih. So epitelotropni, zato se okužba z njimi pojavlja na koži. Povzročajo različne klinične slike. Okužba z njimi najpogosteje povzroča lokalizirane spremembe na koži, na primer virusa orf in MCV, vendar lahko poteka tudi kot fulminantna sistemska bolezen, kot na primer variola vera oz. črne kože. Virusi imajo toksičen učinek na celice in povzročajo spremembe v celični zgradbi in obliki ter nastanek citoplazemskih vakuol.

### 1.1 VIRUS MOLLUSCUM CONTAGIOSUM

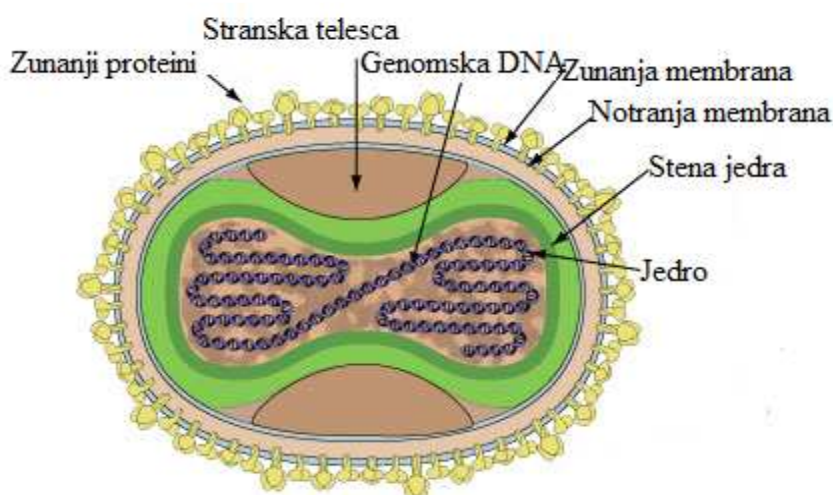
Družina *Poxviridae* je skupina virusov, ki prizadene ljudi in živali. So med največjimi živalskimi virusi (3). Imajo nekatere značilnosti, ki spominjajo na primitivno celico. Tako kot vsi ostali virusi, tudi poksvirusi niso sposobni presnavljati, kar pomeni, da so za popolno sintezo beljakovin odvisni od gostitelja (2). Človeške okužbe povzroča 11 vrst poksvirusov, ki pripadajo več rodovom.

Poksviruse delimo v dve poddružini (7):

- 1) Poddružina *Chordopoxvirinae* (virusi vretenčarjev), kamor spadajo naslednji rodovi:
  - rod *Orthopoxvirus*: virus variole ali črnih koz, virus vakcinije, virus opičjih koz in virus govejih koz;
  - rod *Parapoxvirus*: virus pustularnega dermatitisa – orf, virus mlekarских koz;
  - rod *Yatapoxvirus*: virus yabapox in tanapox;
  - rod *Molluscipoxvirus*: virus molluscum contagiosum;
  - rod *Aviapoxvirus*: poksvirus ptic; in
- 2) Podružina *Entomopoxvirinae* (virus insektov).

Poksviruse prištevamo med največje viruse; so pravokotni, podobni briketom, 220–450 nm dolgi in 140–260 nm široki. Virion obdaja večslojna ovojnica, ki obdaja sredico in stranski telesci (15). Jedro vsebuje z membrano obdano dvojno vijačnico DNA (3).

Velikost genoma različnih poksvirusov je med 130 in 360 kb (6, 7). Genom virusa vakcinije je velik 200 kb in nosi zapis okoli 200 beljakovin. Virusi imajo toksičen učinek na celice in povzročajo spremembe v celični zgradbi in obliki ter nastanek citoplazemskih vakuol (3, 31). Okužba z njimi najpogosteje povzroča lokalizirane spremembe na koži, na primer virusa orf in MCV, vendar lahko potekata tudi kot fulminantna sistemska bolezen, kot je bila na primer variola vera oz. črne kože (3, 32).



Slika 1: Shematski prikaz poksvirusa (23).

### 1.1.1 Virus *Molluscum Contagiosum* in njegov genom

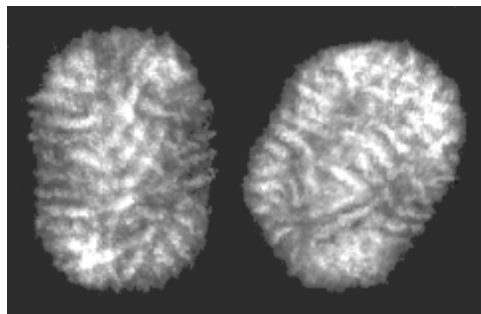
MCV uvrščamo v družino *Poxviridae*, poddružino *Chordopoxvirinae* in v rod *Molluscipoxvirus*.

Prvi je opisal kožno spremembo molluscum raziskovalec Edward Jenner (1749–1823) kot gladko izboklino na koži, ki se pogosteje pojavlja pri otrocih (5).

Elektronska mikroskopija je razkrila, da so telesa v velikosti 360 x 210 nm poksvirusi (3).

Poznamo dva genetska podtipa MCV: MCV I, MCV II, ter še nekaj genetskih različic, ki pripadajo vsakemu od podtipov. Različice so določali tudi z restriksijskimi analizami kompletnih genomov MCV ali s PCR pomnoženih delov genomov. Določili so kompletni genom MCV I in še dve zaporedji p43K, ki ustrezata MCV I in MCV II. Vsako odstopanje od teh zaporedij p43K določa različico MCV I in II. Veljavno poimenovanje virusov je

MCV I, MCV II. To poimenovanje se sklada s tistim od znanstvenika Daraija in sodelavcev (1).



Slika 2: *Molluscum contagiosum* prikazan z elektronsko mikroskopijo (8).

### 1.1.2 Patogeneza okužbe z virusom MCV

Virusi MCV povzročajo podobne klinične slike in se pojavljajo na različnih delih telesa, ne glede na to, kateri podtip ali različica je okužbo povzročil. Najpogosteje osamimo iz kožnih sprememb MCV I (v 70–90 %). MCV II naj bi okužbe pogosteje povzročal pri imunsko oslabljenih bolnikih (14). Navadno je posameznik okužen le z enim od genetskih podtipov. Opisanih je bilo tudi že več primerov mešanih okužb z različicami istega podtipa (1, 3).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIJA MCV

MCV je bil klinično prvič prepoznan leta 1817. Okužbe z MCV se pojavljajo po celem svetu, vendar so pogostejše v tropskem podnebjju. Bolezen največkrat prizadene otroke, spolno aktivne odrasle osebe in bolnike z oslabljenim imunskim sistemom (3, 9). Nespolni prenos je posledica neposrednega stika kože s kožo ali preko okuženega predmeta ali osebe (9).

Domnevajo, da je eden od možnih prenosov tudi preko stika kože z obolelo kožo ali praskanja, vključno s samookužbo (Koebnerjev pojav) (3). Zgodovinski primeri kažejo tudi na prenos z okuženih rok kirurga na operiranca, okužbo, pridobljeno na bazenu, med rokoborci ter pri tetoviranju. Pri prenosu okužbe, kjer ni prisoten predmet, je potreben

intimni stik ali neposredni stik z obolelo kožo. Inkubacijska doba je slabo raziskana. Epidemiološke študije kažejo, da traja od enega tedna do enega meseca (3, 9).

Zanimivo je, da MCV povzroča benigni tumor, namesto običajnih lezij, ki jih povzročajo ostali poksvirusi (3).

### 1.3 KLINIČNA SLIKA MCV

Moluski klinično izgledajo kot različno velike čvrste papule z ugreznjeno sredino ter z gladko, voščeno ali bisernato površino. Po velikosti se močno razlikujejo, in sicer od 1 mm do 1 cm v premeru. Običajno ima en bolnik od 10 do 20 kožnih sprememb, lahko pa jih ima tudi več kot 100. Na koži vztrajajo do 1 meseca, nato po navadi spontano izginejo (3, 4, 13). Pojavijo se lahko kjerkoli na površini kože, vendar najpogosteje v predelu pazduhe, komolčni ali kolenski kotanji in v dimeljskem predelu spolovil pri spolno aktivnih odraslih (3, 4). Lahko se pojavijo tudi na obrazu, predvsem pri imunsko oslabljenih, redkeje na sluznici ali očesni veznici (3, 33).

Pri bolnikih z atopijskim ali kroničnim dermatitisom se na predelih, ki jih dolgotrajno zdravimo z glukokortikoidi, lahko razvije več kot 100 moluskov. Posamezne papule lahko na koži ostanejo tudi več kot 2 meseca in večinoma izginejo v 2 letih. Čez nekaj časa se lahko ponovijo.

Diagnostično lahko moluske zamenjamo za kožne ali genitalne bradavice, herpes ali za katerega od drugih adneksalnih tumorjev. Večje posamezne MCV lahko zamenjamo tudi za keratoakantom, bazalno-celični karcinom ali nevrilemom (3, 13). Pri bolnikih okuženih s HIV se MCV najpogosteje pojavlja na obrazu kot multiple majhne papule ali kot velikanski nodularni tumorji.

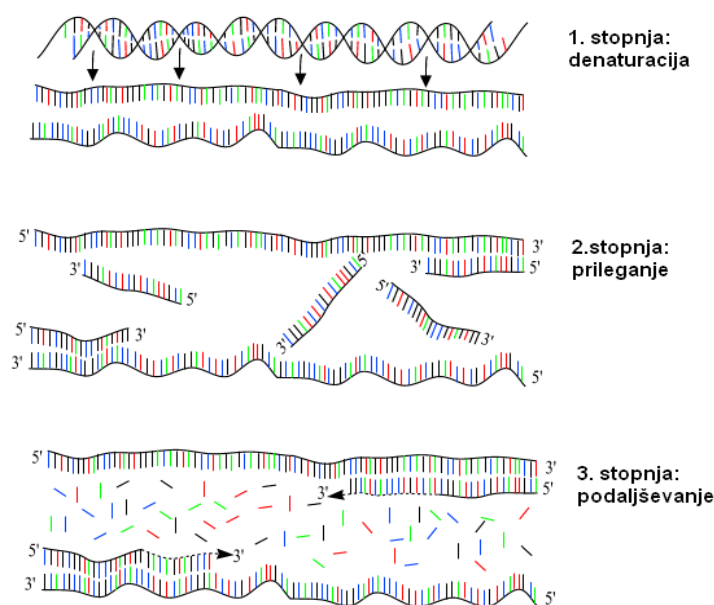
## 1.4 DIAGNOZA MCV

Diagnoza MCV je predvsem klinična. Prisotnost virusa v kožnih spremembah lahko dokažemo tudi z molekularnimi virološkimi metodami. Prisotnost virusnih nukleinskih kislin dokazujemo s PCR, genetske podtipe virusa pa z metodo določanja nukleotidnega zaporedja. V histoloških preparatih lahko v okuženih epitelijskih celicah, ki zaradi razpada vezi med njimi ne držijo več tesno skupaj, vidimo značilna inkluzijska telesa (4).

### 1.4.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je najpogostejša metoda za dokazovanje virusnih nukleinskih kislin pri diagnostiki infekcijskih bolezni. S PCR lahko pomnožujemo DNA, pri predhodni inkubaciji z obratno transkriptazo (RT) pa tudi RNA. Potek PCR lahko v osnovi razdelimo na tri stopnje, ki se 30- do 40-krat ponovijo (slika 3):

1. Denaturacija dvovijačne DNA poteka pri temperaturi nad 90 °C.
2. Prileganje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50–60 °C.
3. Podaljševanje verige pri temperaturi 70–78 °C (11).



Slika 3: Shematski prikaz poteka reakcije PCR (12).

Podaljševanje verige poteka s termostabilno polimerazo DNA. Najpogosteje se uporablja polimeraza Taq, ki izvira iz termostabilne bakterije *Thermus aquaticus*. Polimeraza Taq najbolje deluje pri temperaturi okoli 72 °C, preživi pa tudi večkratno segrevanje do 90 °C. Kot druge polimeraze DNA tudi Taq za svoje delovanje potrebuje začetne oligonukleotide s prosto 3' hidroksilno skupino (21).

PCR je zelo specifična in občutljiva metoda. Njen predpogoj je predhodno dobro poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj dela genoma (18). Na specifičnost pomnoževanja vpliva izbira tarčne sekvence, posledično pravilen izbor oligonukleotidnih začetnikov in lovke ter ustrezne koncentracije reagentov, zajetih v reakcijski mešanici. Za čim večjo specifičnost je pomembna tudi optimalna nastavitev temperatur tristopenjskega cikla in število ponovitev (18). Za najpomembnejši dejavnik specifičnosti se je pokazala optimalna vezava začetnih oligonukleotidov pred začetkom pomnoževanja. Optimalno vezavo dosežemo z izpostavitvijo reakcijske mešanice ustrezni temperaturi pred začetkom podaljševanja tarčne DNA (19).

Na občutljivost PCR vpliva izguba tarčne DNA med osamitvijo, prisotnost tuje DNA ali inhibitorjev PCR v kliničnem vzorcu in izbira metode pomnoževanja (npr. klasična, ugnezdena) (18). Povečanje občutljivosti metode PCR je možno z izbiro ugnezdene PCR, ki z dodatnim notranjim parom oligonukleotidnih začetnikov poveča občutljivost na minimalno količino PCR-pridelka in potrdi njegovo specifičnost (18).

#### 1.4.1.1 PCR v realnem času

PCR v realnem času je metoda, pri kateri naenkrat potekata pomnoževanje nukleinske kisline in zaznavanja pridelkov istočasno. V primerjavi s tradicionalnimi PCR metodami je s tem tveganje glede izpusta pomnoženih nukleinskih kislin v okolje in kontaminacije poznejših analiz zanemarljivo. Pomnoževanje nukleinske kisline in zaznavanje pridelkov sta končana v približno eni do dveh urah, kar je nekajkrat hitreje kot pri tradicionalnih metodah PCR (34). Večja hitrost te metode je posledica posebej prilagojenih reagentov, neizvajanja detekcijskih metod po PCR reakciji in uporabe lovke, označenih s fluorofori (35).



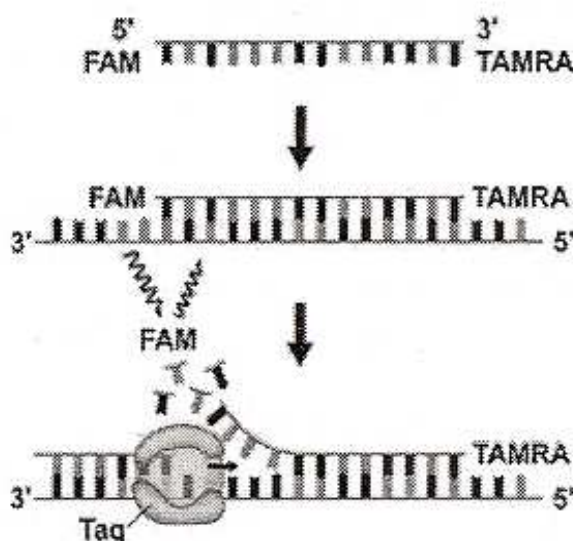
Za identifikacijo mikroorganizma ali za določanje njegove količine mora biti tarčni odsek na nukleinski kislini ohranjen. Če zaporedje, ki ga nameravamo pomnožiti, kaže na pomembne polimorfizme, je treba izbrati bolj ohranjen tarčni odsek nukleinske kisline (34).

Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov in lovka mora biti specifično, da lahko zaznamo določen organizem (ali skupino) oziroma določimo njegovo količino (34). Zaznavanje PCR pridelkov lahko poteka s pomočjo lovka (specifična detekcija) ali brez njih (nespecifična detekcija).

Pri nespecifični zaznavi se največkrat uporablja fluorescentno barvilo SYBR Green I. Nevezano barvilo oddaja le malo fluorescence. Med PCR reakcijo pa se nespecifično vgradi v katero koli dvovijačno DNA in povečana količina vezanega barvila poveča fluorescenco. Za specifičnost pridelka PCR je potrebna analiza talilne temperature (36).

Specifično zaznavanje temelji na prenosu fluorescenčne resonančne energije (FRET) med fluoroforom in dušilcem. V tem primeru uporabimo lovke, ki so označene s fluorofori, najpogosteje lovke TaqMan (imenujemo jih tudi 5' nukleazne lovke) (34).

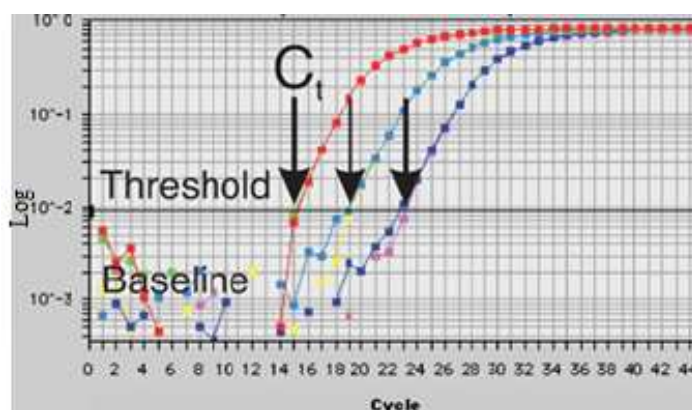
Lovka TaqMan je kratek oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezan reporterski fluorofor (6-karboksi-fluorescein, FAM), na 3' koncu pa dušilec (6-karboksi-tetrametil-rodamin, TAMRA). Da se pojavi signal, se mora lovka najprej vezati na komplementarno verigo DNA pri 60 °C, nato pa mora, pri enaki temperaturi, polimeraza Taq s svojo 5' nukleazno aktivnostjo cepiti 5' konec sonde TaqMan in s tem ločiti fluorofor od dušilca. Na ta način se razdalja med njima veča, posledično pa se FRET zniža, kar povzroči signal (slika 4) (34).



Slika 4: Mehanizem delovanja TaqMan sonde.

Različica sonde TaqMan je sonda MGB, ki ima na 5' koncu vezan fluorofor, na 3' koncu pa dušilec in del, ki se imenuje MGB (minor groove binder). Ta molekula se skriva v mali jarek dvovijačne DNA in tvori zelo stabilen dupleks s komplementarnim odsekom enovijačne DNA (11). Signal se pojavi enako kot pri sondi TaqMan, zaradi 5' nukleazne aktivnosti polimeraze Taq. Fluorescenčno ozadje pri sondah MGB ima nižjo stopnjo fluorescence kot pri sondah brez molekule MGB. To omogoča uporabo krajših sond, zato se zmanjša tudi razdalja med fluoroforom in dušilcem (37).

Količina odcepljenega (prostega) fluorofora se večja po vsakem PCR temperaturnem ciklu in je odvisna od količine vezane in posledično razgrajene sonde. Signal lahko zato merimo kadar koli med pomnoževanjem, običajno po končanem koraku podaljševanja verige (34). Meritve so prikazane s krivuljami (slika 5).



Slika 5: Pomnoževalna krivulja za tri vzorce (36). Ct vrednost, ki je označena s puščicami, predstavlja cikel, ko je instrument prvič zanesljivo zaznal povešanje fluorescence, torej kjer krivulja seka linijo praga (threshold), ki jo lahko določi instrument sam ali oseba, ki ga upravlja. Fluorescenčni signal, ki je v prvih nekaj ciklih pod zaznavo instrumenta, se imenuje ozadje.

#### 1.4.1.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Z metodo sekveniranja določamo nukleotidno zaporedje molekule DNA in RNA (posredno preko njene DNA kopije). Določanje nukleotidnega zaporedja je tudi edina molekularna metoda, s katero neposredno in nedvomno dokažemo virusno DNA. Računalniška tehnologija je omogočila analizo zaporedij in njihovo shranjevanje v genske baze. Napredek v tehnologiji gelske elektroforeze je omogočil ločevanje fragmentov DNA, ki se razlikujejo le za en nukleotid. Vse te izboljšave so omogočile razvoj dveh različnih metod določanja nukleotidnega zaporedja.

Pri Sangerjevi metodi ali terminacijski metodi se pri *in vitro* sintezi DNA uporabljajo radioaktivno označeni nukleotidi in specifični terminatorji. Terminatorji so spremenjeni nukleotidi (di deoksinukleozid trifosfat ali ddNTP), ki imajo na mestu 3' –H namesto –OH skupine. Podaljševanje nukleotidne verige se pri ddNTP ustavi, saj polimeraza DNA za podaljšanje potrebuje –OH skupino. V reakcijski mešanici je razmerje dNTP : ddNTP običajno 100 : 1. Po sekvenčni reakciji dobimo mešanico različno dolgih odsekov, ki se končajo na vsakem terminacijskem mestu. V sekvenčni reakciji uporabljamo polimeraze DNA, ki so manj občutljive na ddNTP in temperaturno obstojne. Tudi pri tej metodi se štiri reakcije izvajajo ločeno, vsaka s specifičnim terminatorjem (ddATP, ddCTP, ddGTP in

ddTTP). Pridelke reakcije naneseemo na gel vzporedno in jih ločimo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Zaporedje preberemo iz autoradiograma gela (17).

Sangerjeva metoda je danes že prilagojena računalniški tehnologiji in je komercialno dostopna v avtomatiziranih sistemih. Na trgu je več sistemov, ki temeljijo na fluorescentno označenih ddNTP-jih. Sekvenčno reakcijo lahko izvajamo ločeno za vsak terminator (4 reakcije) ali v eni epruvetki, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilom. Odseke DNA avtomatizirano ločujemo s kapilarno gelsko elektroforezo. Laserski čitalec zazna terminalne nukleotide glede na značilen fluorescentni spekter. V nadaljevanju z ustreznim računalniškim programom rezultate analiziramo in sestavimo nukleotidno zaporedje (16).

Na osnovi nukleotidnega zaporedja je mogoče določiti tudi aminokislinsko zaporedje in predvideti funkcijo beljakovine.

## **1.5 ZDRAVLJENJE**

Moluski lahko izginejo same od sebe, brez posebnega zdravljenja. Če ne izginejo spontano, jih lahko zdravimo kirurško z ekskoleacijo ali z zamrznjenjem s tekočim dušikom. Lahko jih namažemo tudi s kremo, ki vsebuje imikvimod, s podofilotoksinom ali jih odstranimo z lasersko ablacijo (3). Uspešno izginotje moluskov, predvsem pri tistih, ki so se jim ponavljali, so dosegli z intravenskim zdravljenjem s cidofovirom. Isto zdravilo se lahko na moluske nanaša tudi v lokalni obliki (4). Področno zdravljenje, je kljub temu, da ga je zaradi ponovitve moluskov potrebno večkrat ponavljati, večinoma dokaj uspešno. Slabši uspeh zdravljenja pričakujemo pri imunsko oslabljenih bolnikih.

## 1.6 HUMANI PAPILOMA VIRUSI

Viruse papiloma (PV) taksonomsko uvrščamo v družino *Papillomaviridae*, ki po najnovejših raziskavah obsega 31 rodov, v katere spada 217 PV in od tega je 146 humanih virusov papiloma (HPV) (25).

Rodovi so poimenovani z grško abecedo in vsi genotipi HPV so porazdeljeni v 5 rodov. Rod *alfa* vsebuje 13 vrst HPV in 1 vrsto opičjega PV, rod *beta* vsebuje 5 vrst HPV in 1 vrsto opičjega PV, rod *gamma* vsebuje 10 vrst HPV, rod *mu* vsebuje 2 vrsti HPV, rod *nu* pa vsebuje 1 vrsto HPV (26). Največji in klinično najpomembnejši je rod *alfa*, kamor uvrščamo visokorizične in nizkorizične genotipe HPV, ki jih povezujemo z nastankom novotvorb na koži in sluznicah (27).

Nukleotidno zaporedje strukturne beljakovine L1 je najbolj ohranjeno zaporedje v genomu HPV in se zato uporablja za identifikacijo in taksonomsko razvrščanje novih virusnih genotipov (28).

Kot posamezen rod se opredeli skupino HPV, ki z drugo skupino HPV deli manj kot 60 % nukleotidnega zaporedja L1. Virus, katerega nukleotidno zaporedje gena L1 kaže več kot 10 % odstopanje v primerjavi z nukleotidnimi zaporedji L1 uradno priznanih genotipov HPV, opredelimo kot nov genotip HPV. Če razlika v nukleotidnem zaporedju varira med 2–10 %, opredelimo nov virus kot virusni podtip, razlika manjša od 2 % pa opredeli nov virus kot podtipsko različico enakega genotipa (28). Genotipi HPV so oštevilčeni po vrstnem redu osamitve in ne po bioloških lastnostih ali po genomski sorodnosti (29).

HPV lahko razvrščamo tudi glede na tropizem HPV za določeno vrsto epitela. Delimo jih v 4 skupine:

1. **Sluznični oziroma anogenitalni genotipi HPV:** povzročajo transformacije ploščatoceličnega epitela sluznic. Glede na to, ali povzročajo benigne ali maligne novotvorbe jih delimo še na visokorizične, verjetno visokorizične, nizkorizične in genotipe HPV z nejasnim onkogenim potencialom.

2. **Neslužnični oziroma kožni genotipi HPV:** najpogosteje povzročijo benigne kožne novotvorbe, oziroma navadne kožne bradavice.
3. **Kožno-sluznični genotipi HPV:** okužijo poroženeli in neporoženeli večvrstni ploščatocelični epitel.
4. **EV-HPV genotipi:** virusi so bili prvotno osamljeni iz novotvorb pri bolnikih z dedno boleznijo, ki se imenuje bradavičasta epidermodisplazija oziroma *epidermodysplasia verruciformis*. Značilne spremembe povrhnjice se lahko razvijejo tudi pri z EV-HPV okuženih imunsko kompromitiranih osebah (po presaditvi, HIV okužba) (29).

Po zadnjih raziskavah med visokorizične genotipe HPV uvrščamo HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59. Povezujemo jih z nastankom raka na materničnem vratu, medtem ko nizkorizični genotipi HPV povzročajo nastanek benignih novotvorb (30).

Posebnost je genotip HPV-68, ki je edini »verjetno« visokorizični HPV genotip, medtem ko genotipe 26/30/34/53/66/67/69/70/73/82/85/97 uvrščajo v skupino morda visokorizičnih genotipov, saj je še premalo dokazov o njihovi nedvomni povezavi z nastankom raka materničnega vratu (30).

Med klinično najpomembnejše nizkorizične genotipe HPV uvrščamo genotip HPV-6 in HPV-11, ki povzročata več kot 90 % vseh genitalnih bradavic in papilomov grla in 12,1 % intraepitelijskih neoplazij nižje stopnje (angl. LSIL) (38).

## 2 NAMEN DELA

V Sloveniji do naše raziskave še niso molekularno potrjevali okužb z MCV. Zato je bil osnovni namen naloge ugotoviti, ali so v spremembah, ki jih klinično opredelimo kot molluscum contagiosum (MC), prisotni virusi *Molluscum contagiosum* (MCV), in kateri genetski podtipi in njihove podtipske različice se v njih pojavljajo.

Da bi to dokazali, smo vse vzorce, vključene v raziskavo, testirali s PCR v realnem času ter s klasičnim PCR na prisotnost DNA MCV. Za določitev genetskih podtipov smo uporabili metodo za določitev nukleotidnega zaporedja.

Pričakovali smo, da bomo v večini moluskov našli DNA MCV. Spremembe, ki ne bodo vsebovale MCV, po vsej verjetnosti niso moluski, ampak spremembe, ki so jim klinično podobne. V njih bomo poskušali dokazati še prisotnost HPV, saj so si spremembe, ki jih povzročata ti dve skupini virusov, včasih lahko zelo podobne.

Z raziskavo smo skušali razjasniti, v kakšni meri so odstranjene spremembe pravi moluski in ne spremembe, ki so jim le klinično podobne. S tem bomo pripomogli k izboljšanju kliničnega prepoznavanja MCV. Poleg tega smo z dokazom MCV in določitvijo njihovih genetskih podtipov in podtipskih različic želeli ugotoviti, kateri in koliko različnih podtipov kroži v naši populaciji.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 MATERIAL**

#### **3.1.1 Vzorci**

V našo raziskavo smo vključili 43 bolnikov, ki so bili sprejeti v Ambulanto za spolno prenosljive okužbe na Dermatovenerološki kliniki Kliničnega centra v Ljubljani. Vzorce smo zbirali od septembra 2009 do oktobra 2010. Vstopni kriterij za vključitev bolnikov v raziskavo je bil klinični sum na okužbo z MCV. Pri vsakem bolniku je bil odvzet vzorec kožne spremembe z ekskohleacijo.

Vsi odvzeti vzorci so bili nato poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer so bili do obdelave shranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2 METODE DELA**

Celokupno DNA smo iz prejetih tkivnih vzorcev osamili z uporabo diagnostičnega kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), in sicer po protokolu za osamitev DNA iz tkiv. Po osamitvi smo preverili ustreznost vzorcev s pomnoževanjem 268 bp velikega dela za humani beta-globin. Sledilo je dokazovanje prisotnosti DNA MCV s PCR v realnem času z diagnostičnim kompletom Quanti Tect<sup>TM</sup> SYBR Green PCR kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), in klasičnim PCR s kompletom HotStarTaq<sup>Plus</sup>PCR (Qiagen, Hilden, Nemčija).

#### **3.2.1 Postopek osamitve celokupne DNA**

Vse vzorce smo osamili po protokolu za osamitev DNA iz tkiv (10).

Pred začetkom osamitve smo si nastavili toplotni blok za stresanje in inkubacijo na  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Epruvetke z vzorci smo postavili iz zamrzovalnika na sobno temperaturo, da so se odtalili ter jim nato dodali  $180\text{ }\mu\text{L}$  pufru ATL in  $20\text{ }\mu\text{L}$  proteinaze K. Mešanico smo premešali na mešalniku vstavili v termoblok in inkubirali čez noč. Naslednje jutro smo vzorce za nekaj



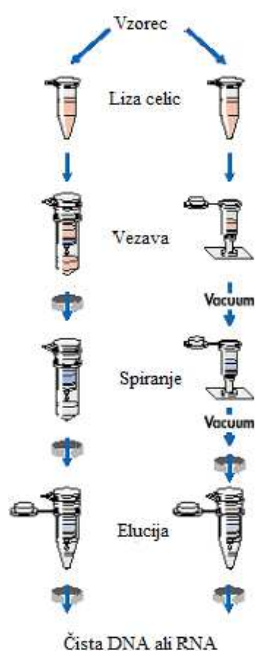
sekund centrifugirali na najvišjih obratih in s tem omogočili, da se je vsa vsebina spolzela iz sten epruvetk na dno.

Temperaturo na termobloku smo nato povečali na 70 °C. V epruvetke smo dodali 200 µL pufra AL in vsebino mešali 15 sekund. Vzorce smo ponovno inkubirali 10 minut, tokrat na 70 °C, ter jih nato centrifugirali za nekaj sekund.

Po končani inkubaciji in centrifugiranju smo dodali 200 µL etanola. Vzorce smo mešali ter centrifugirali.

Lizate iz epruvet smo prenesli v QIAamp kolone in jih centrifugirali 1 minuto pri 8000 RPM (6010 × g). Zatem smo previdno odstranili kolone ter jih postavili v nove zbiralne epruvetke in dodali 500 µL AW1 pufra ter jih centrifugirali 1 minuto pri 8000 RPM (6010 × g). Po končanem centrifugiranju smo ponovno kolone postavili v nove zbiralne epruvetke ter dodali 500 µL AW2 in centrifugirali 3 minute pri 14000 RPM. Po koncu centrifugiranja smo epruvetke še enkrat postavili v nove zbiralne epruvetke in centrifugirali 1 minuto na najvišjih obratih.

Na koncu smo postavili kolone v epruvetke za elucijo in dodali 100 µL AE pufra. Vzorce smo inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi in nato še centrifugirali pri 8000 RPM (6010 × g) 1 minuto. Izolate smo shranili na – 20 °C.



Slika 6: Shematski prikaz ročne osamitve nukleinskih kislin.

### 3.2.2 *Preverjanje kakovosti osamljene DNA in odsotnost zaviralcev PCR*

Vsak vzorec osamljene DNA smo pred začetkom dokazovanja okužbe z MCV testirali s PCR z začetnimi oligonukleotidi PC04 (5`CAACTTCATCCACGTTACACC3`) in GH20 (5`GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3`), ki omogoča pomnoževanje 268 bp velikega dela gena za humani beta-globin (24). Za pomnoževanje smo uporabili računalniško vodeno aparaturo LightCycler Instrument tip 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Švica), ki omogoča zaznavanje pridelkov PCR v realnem času.

Za pomnoževanje humane DNA smo uporabili mešanico kemikalij, ki so sestavni del kompleta LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Basel, Švica). Pomnoževanje smo izvedli po naslednjem postopku. V sterilno reakcijsko kapilaro smo odpipetirali 15  $\mu$ L reakcijske mešanice in 5  $\mu$ L osamljene DNA. Reakcijska mešanica je vsebovala 2  $\mu$ L LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I, 2,4  $\mu$ L 25 mM  $MgCl_2$ , po 0,2  $\mu$ L 50 mM oligonukleotidnih začetnikov PC04 in GH20 ter 10,2  $\mu$ L vode.

Pomnoževanje gena za humani beta-globin smo izvedli s 45-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 15 s pri 95 °C, 4 s pri 67 °C in 10 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 10 min pri 95 °C, kar naj bi zagotavljalo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo FastStart Taq DNA polimeraze.

Pomnoževanju DNA je sledila analiza specifičnosti pridelkov PCR z metodo talilne krivulje (angl. *Melting curve analysis*). Metodo smo izvedli z enkratnim temperaturnim ciklom: 0 s 95 °C, 30 s 72 °C, 0 s 95 °C in 30 s z ohlajevanjem reakcijske mešanice na 40 °C. Kot beta-globin pozitivne smo opredelili vzorce z vrednostmi talilne temperature pridelkov PCR ( $T_m$ , angl. *Melting temperature*) 88–89 °C oziroma enakim  $T_m$  kot pozitivna kontrola PCR.

### **3.2.3 Določanje DNA MCV z metodo verižne reakcije s polimerazo**

V nalogi smo DNA MCV določali z dvema različicama verižne reakcije s polimerazo, in sicer s PCR v realnem času na aparaturi LC 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Švica) ter s klasičnim PCR na cikličnem termostatu Eppendorf.

#### *3.2.3.1 PCR v realnem času*

Z metodo PCR smo identificirali DNA MCV. Uporabili smo komercialno dostopni komplet kemikalij QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Hilden, Nemčija) ter oligonukleotidne začetnike za gen p43K pripravljene v koncentraciji 50  $\mu$ M. Omenjena OZ pomnožujeta 150 bp velik del gena p43K (14).

Oligonukleotidni začetniki (zaporedje 5' proti 3') :

- MCVf 5'-AACCTACGCTACCTGAAGCTGGA-3'
- MCVr 5'-CAGGCTCTTGATGGTCGAAATGGA-3'

Za posamezno reakcijo PCR smo v sterilno reakcijsko posodico (stekleno kapilaro) odpipetirali 10  $\mu$ L QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0,2  $\mu$ L MCVf, 0,2  $\mu$ L MCVr in 4,6  $\mu$ L deionizirane vode. Vsebino smo dobro premešali na kratko centrifugirali in prenesli v stekleno kapilaro. Na koncu smo dodali 5  $\mu$ L DNA MCV. Končni reakcijski volumen je bil 20  $\mu$ L. Tako pripravljene kapilare smo prenesli v krožno stojalo, ki smo ga centrifugirali in nato namestili v analizator Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Švica) in s pomočjo računalniškega programa (preglednica 1) pričeli s pomnoževanjem v realnem času.

1. **Preglednica:** Program za pomnoževanje pri PCR v realnem času

Programski koraki		Temperatura/Čas	Število ciklov
Denaturacijski program		95 °C/15 min	1
Pomnoževalni program	Denaturacija	94 °C/15 s	30
	Prileganje / podaljševanje	60 °C/45 s	
Talilni program		95 °C/0 s	
		80 °C/30 s	
		95 °C/0 s	
Ohlajevalni program		40 °C/ 30 s	

3.2.3.2 *Klasični PCR*

Za klasični PCR smo uporabili komercialno dostopni komplet kemikalij HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Nemčija) ter enake oligonukleotidne začetnike in v isti koncentraciji kot pri dokazovanju MCV DNA s PCR v realnem času.

Za posamezno reakcijo PCR smo v sterilno reakcijsko posodico odpipetirali 0,5 µL 10 mM nukleotidne mešanice (dNTP mix), 2,5 µL pufru PCR (10 x CoralLoad PCR Buffer), po 0,1 µL OZ MCVf (50 µM) in MCVr (50 µM), 0,125 µL encimske mešanice HotStarTaq Plus DNA polymerase (5U/µL) ter 16,675 µL deionizirane vode. Vsebino smo dobro premešali in na koncu dodali 5 µL MCV DNA. Končni reakcijski volumen je bil 25 µL. Pomnoževanje smo izvedli po programu navedenem v preglednici 2 na cikličnem termostatu Eppendorf.

2. **Preglednica:** Program za pomnoževanje pri klasičnem PCR

Programski koraki		Temperatura/Čas	Število ciklov
Denaturacijski program		95 °C/5 min	1
Pomnoževalni program	Denaturacija	94 °C/30 s	35
	Prileganja	60 °C/30 s	
	Podaljševanje	60 °C/1 min	
Talilni program		72 °C/10 min	1
Ohlajevalni program		40 °C/ 30 s	1

### **3.2.4 Dokazovanje DNA HPV**

Za dokazovanje DNA HPV z OZ GP5+ (5`TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC3`) in GP6+ (5`GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C3`) za gen L1 dolg 150 bp smo uporabili diagnostični komplet HotStarTaq® Plus DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Nemčija).

V sterilno reakcijsko posodico smo dodali 2,5 µL 10 x CoralLoad Buffer, 2,5µL 4 mM MgCl<sub>2</sub>, po 200 µM dATP, dCTP, dGTP, 600 µM dUTP, 0,625 U HotStarTaq Plus DNA Polymerase, 0,5 U uracil glikozilaze (UNG) (Roche Diagnostics, Basel, Švica), po 1 µM vsakega OZ ter 5 µL (100 ng) osamljene DNA. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil 25 µL.

Pomnoževanje DNA HPV smo izvedli na cikličnem termostatu GenAmp® PCR System tip 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Za aktivacijo UNG smo najprej izvedli 10 min inkubacijo pri 25 °C, nato še 5 min pri 95 °C, kar je povzročilo popolno denaturacijo DNA in aktivacijo polimeraze. Sledila je 1 min pri 94 °C, 2 min pri 50 °C ter 1,5 min pri 72 °C. Prvih 21 ciklov je temperatura padala za 0,5 °C/cikel. Zadnjemu ciklu je sledila še 4 minutna inkubacija pri 72 °C. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C.

### **3.2.5 Dokazovanje pridelkov PCR, pomnoženih s klasičnim PCR**

Pridelke PCR smo dokazovali kvalitativno z gelsko elektroforezo. Uporabljali smo elektroforezni sistem SEA 2000® (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica) in že pripravljene komercialno dostopne hidrogelne za večkratno uporabo – PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica). Geli so sestavljeni iz 1 % agaroze, prečno zamrežene s polimerom BG (1,4-butanedioldiglycidylether), in omogočajo optimalno zaznavanje delcev velikosti od 100 do 4000 bp.

Pufersko raztopino za elektroforezo smo pripravili sami: v čašo smo nalili 1950 ml deionizirane vode in 50 ml 40 x pufra TAE (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica), dobro premešali in dodali 100  $\mu$ L etidijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics, Gent, Belgija). Pufersko raztopino smo nato vlili v kadičko zgoraj omenjene elektroforezne aparature in vanjo vstavili gel.

V prvo vdolbinico gela smo nanесли 1,6  $\mu$ L molekularnega označevalca XVI (Roche Diagnostics, Basel, Švica), ki vsebuje delce velikosti 100, 200, 300, 1500 bp in s tem omogoča ugotavljanje velikosti na gel nanošenih pridelkov PCR. V vsako naslednjo vdolbinico gela smo nanašali po 7,6  $\mu$ L mešanice posameznega pridelka PCR (6  $\mu$ L) in nanašalnega pufra Sample Loading Buffer (Elchrom Scientific AG, Cham, Švica) (1,6  $\mu$ L).

Elektroforeza je potekala v gelu pri napetosti 120 V, 20 min pri 25 °C. Črpalka za kroženje pufra se je samodejno vklopila 1,5 minute po vklopu elektroforeze. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV lučjo ter ga fotografirali z aparatom BIS 303 PC (DNR Bio-Imaging System, Jeruzalem, Izrael).

### **3.2.6 Čiščenje pridelkov PCR**

Pridelke PCR smo pred izvedbo sekvenčne reakcije očistili ter jim odstranili soli, encime, nevgrajene nukleotide in ostale nečistoče. Pridelke smo čistili s komercialno dostopnim kompletom QIAquick PCR purification system (Qiagen, Hilden, Nemčija).

Eni volumski enoti pridelkov PCR, ki je znašala 19  $\mu$ L, smo dodali pet volumskih enot pufra PBI, ki učinkovito veže predvsem OZ in neželene majhne eno- in dvoverižne nespecifične pridelke PCR (velikosti do 100 bp). Mešanico pufra in pridelkov PCR smo premešali na mešalu, jo nanесли na ločevalno mikrokolono s silikatno membrano, vloženo v 2 ml zbiralno epruvetko in vse skupaj centrifugirali 1 minuto pri 13000 RPM ( $15871 \times g$ ) v centrifugi. S tem so se skozi membrano mikrokolone izločili nespecifični pridelki PCR oz. dimeri in tudi ostale nečistoče medtem, ko se je DNA obdržala na membrani. Epruvetko z izpirkom smo zavrgli, mikrokolono pa vstavili v novo čisto zbiralno epruvetko.

V nadaljevanju smo v mikrokolono dodali 750  $\mu\text{L}$  pufra PE, s pomočjo katerega smo s centrifugiranjem 1 minuti pri 13000 RPM ( $15871 \times g$ ) sprali preostanek soli, vezanih na DNA. Odsotnost soli je ključna za uspešno spiranje DNA z membrane mikrokolone. Po centrifugiranju smo ponovno zavrgli zbiralno epruvetko in izpirek, mikrokolono pa vstavili v novo zbiralno epruvetko in centrifugirali še 1 minuto pri 13000 RPM ( $15871 \times g$ ). S tem smo odstranili tudi ostanke pufra PE. Mikrokolono smo nato prestavili v čisto epruvetko, staro zbiralno epruvetko pa smo zavrgli.

DNA smo z membrane mikrokolone eluirali z dodatkom 30–50  $\mu\text{L}$  pufra EB (volumne elucijskega pufra EB je odvisen od jakosti pridelka PCR dokazanega na elektroforeznem gelu) in enominutnim centrifugiranjem mikrokolone pri 13000 RPM ( $15871 \times g$ ). Očiščene pridelke smo do nadaljnje uporabe shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.7 Določanje koncentracije pridelkov PCR**

Čiščenju pridelkov PCR je sledilo določanje njihovih koncentracij. Tudi ta postopek je vključeval uporabo agaroznega gela (1,7 %), ki smo ga pripravili po naslednjem postopku: v stekleno čašo smo vlili 50 ml 1 x pufra TAE (0,04 M Tris-HCL, 0,02 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,02 M Na-acetat pH = 8,3), dodali 0,8 g agaroze v prahu A9539 AGAROSE for routine use (Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA), dobro premešali ter nastalo raztopino v mikrovalovni raztopini segreli do vrelišča. Še vroči raztopini agaroze smo dodali 5  $\mu\text{L}$  etidijevega bromida koncentracije 10 mg/ml (Innogenetics, Gent, Belgija), dobro premešali in vlili v kalup z vstavljenimi glavnički, ki v strjenem gelu tvorijo luknjice za nanos vzorcev.

Ko se je gel strdil, smo odstranili glavničke in gel vstavili v elektroforezno kadičko HE 33 Mini Submarine Unit (Hoefler, San Francisco, ZDA) in ga prelili z 1 x puffrom TAE, predhodno ohlajenim na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V prvo luknjico smo nanесли 10  $\mu\text{L}$  koncentracijskega molekularnega označevalca MassRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder, Low Range, (Fermentas, Vilnius, Litva). Ta vsebuje 11 delcev različnih velikosti (80–1031 bp) in koncentracij (0,8; 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 9 in 10 ng/ $\mu\text{L}$ ). v vsako naslednjo luknjico smo nanесли 12  $\mu\text{L}$  mešanice,

očiščenega pridelka PCR (5  $\mu$ L), deionizirane vode (5  $\mu$ L) in nanašalnega pufru 6 x MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas, Vilnius, Litva) (2  $\mu$ L).

Koncentracijo posameznega pridelka PCR smo določili tako, da smo primerjali jakost njihove emitirane fluorescentne svetlobe pod UV lučjo z jakostjo delcev z znano koncentracijo DNA na lestvici molekularnega označevalca.

### **3.2.8 Sekvenčna reakcija**

Naslednji korak pri določitvi nukleotidnega zaporedja DNA MCV je izvedba sekvenčne reakcije. Uporabili smo aparat GENAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in komercialno dostopen komplet Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, ZDA).

Za izvedbo sekvenčne reakcije smo za posamezen pridelek PCR potrebovali sterilno reakcijsko posodico. V posamezno reakcijsko posodico smo dodali 1,5 pmol OZ, 2  $\mu$ L 5 x pufru za sekveniranje BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer, 0,5  $\mu$ L reakcijske mešanice Big Dye® Terminator v 1.1, 1,5 ng DNA in dopolnili z ddH<sub>2</sub>O do končnega reakcijskega volumna 10  $\mu$ L. V posebni sobi smo reakcijski mešanici dodali očiščene pridelke PCR in v aparatu GENAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) izvedli sekvenčno reakcijo.

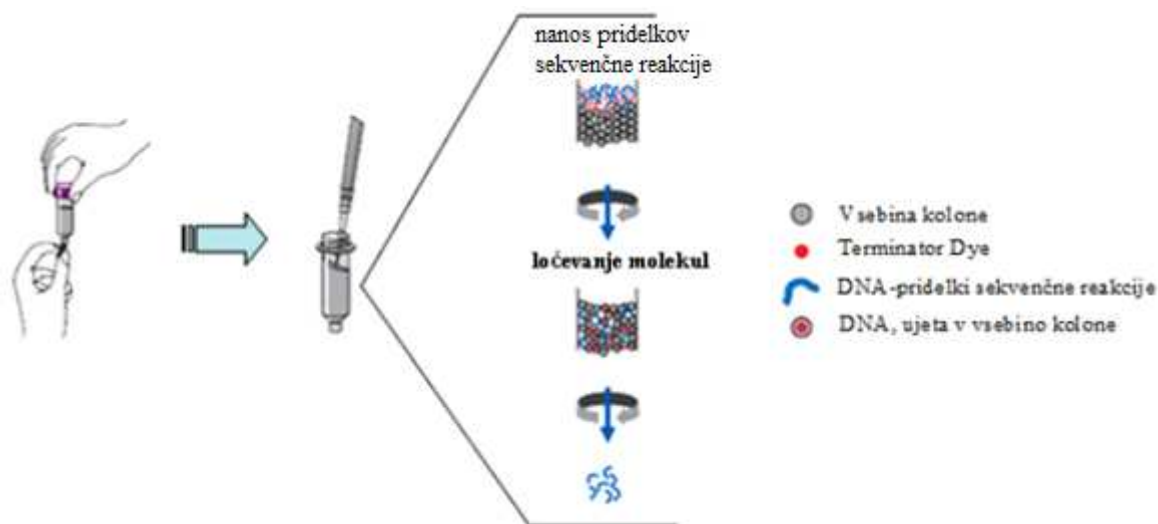
Sekvenčna reakcija je potekala po protokolu SteP. Začetni enominutni inkubaciji pri 96 °C je sledilo 15 temperaturnih ciklov naslednjih treh inkubacij: 96 °C 10 sekund, 50 °C 5 sekund, 60 °C 75 sekund. Sledilo je 5 temperaturnih ciklov inkubacij 96 °C 10 sekund, 50 °C 5 sekund, 60 °C 90 sekund in še 5 ciklov, sestavljenih iz inkubacij 96 °C 10 sekund, 50 °C 5 sekund, 60 °C 2 minuti. Encimsko reakcijo smo ustavili z ohladitvijo na 8 °C.

### **3.2.9 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije**

Pred analizo z avtomatskim sistemom za določanje nukleotidnih zaporedij smo pridelke sekvenčne reakcije očistili nevgrajenih dideoksinukleotidov s komercialno dostopnim



kompletom DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Komplet DyeEx je hiter, preprost ter učinkovit sistem odstranjevanja nevgrajenih dideoksinukleotidov. Princip čiščenja temelji na gelski kromatografiji, ki ločuje molekule med seboj glede na velikost. V kompletu se nahajajo pripravljene mikrokolone, ki so napolnjene z raztopino smole. Leta se med centrifugiranjem strdi v gel. V nastalem gelu so kroglaste tvorbe, ki tvorijo pore. Skozi te pore molekule v snovi, ki so nanesene na kolono, potujejo z različno hitrostjo. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti oz. molekulske mase. Manjše molekule, kot so dideoksinukleotidi, se ujamejo v porah gela. Večje molekule, kot so molekule DNA, v pore ne morejo vstopiti. Zaradi tega se ločijo od manjših molekul, ki hitreje potujejo skozi gel.



Slika 7: Shema in princip delovanja čiščenja sekvenčne reakcije.

Mikrokolone, napolnjene s smolo, smo rahlo pretresli, malo odprli pokrovček (s tem preprečimo nastanek vakuumu v mikrokoloni) ter odlomili spodnji del mikrokolone. Mikrokolono smo nato vstavili v 2 ml zbiralno epruvetko in jo centrifugirali 3 minute pri 2660 RPM ( $659 \times g$ ). Zbiralno epruvetko smo zavrgli, mikrokolono pa vstavili v novo 1,5 ml epruvetko.

V mikrokolono smo na sredino strjenega gela nanesli 10  $\mu$ L pridelkov sekvenčne reakcije ter ponovno centrifugirali 3 minute pri 2660 RPM ( $659 \times g$ ). Med centrifugiranjem so se nevgrajeni dideoksinukleotidi ujeli v pore gela, medtem ko so se pridelki DNA sekvenčne

reakcije izločili iz gela in se skoncentrirali v eluatu v 1,5 ml epruvetki. Epruvetko smo prenesli v vakuumsko centrifugo Speed VAC SC 110 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, ZDA) ter sušili 10 minut. V osušeno DNA smo dodali 25  $\mu$ L denaturacijske raztopine Hi-Di™ Formamide (Applied BioSystems, Foster City, ZDA), ogrete na sobno temperaturo. Epruvetko smo nato premešali na mešalniku in nastalo mešanico prenesli v 0,2  $\mu$ L reakcijske epruvetke za PCR. Tako pripravljene vzorce smo v aparaturi PCR GenAmp® System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) nazadnje denaturirali 2 minuti pri 95 °C in jih takoj za tem za najmanj 10 minut postavili v ledeni blok, ohlajen na – 20 °C.

### **3.2.10 Določanje nukleotidnega zaporedja**

Z metodo avtomatskega sekveniranja smo vsem pridelkom PCR (150 bp dela gena p43K) določili nukleotidno zaporedje po naslednjem postopku.

Očiščene pridelke sekvenčne reakcije smo vstavili v posebna stojala in jih prenesli v aparaturo za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied ZDBiosystems, Foster City, CA). Aparatura zabeleži neobdelane podatke o določenem nukleotidnem zaporedju, ki se nato prenese v računalniški program ABI PRISM™ Sequencing Analysis (Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Le-ta vse zbrane podatke analizira in jih poda v obliki elektrograma s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

### **3.2.11 Analiza nukleotidnih zaporedij in določitev podtipa MCV**

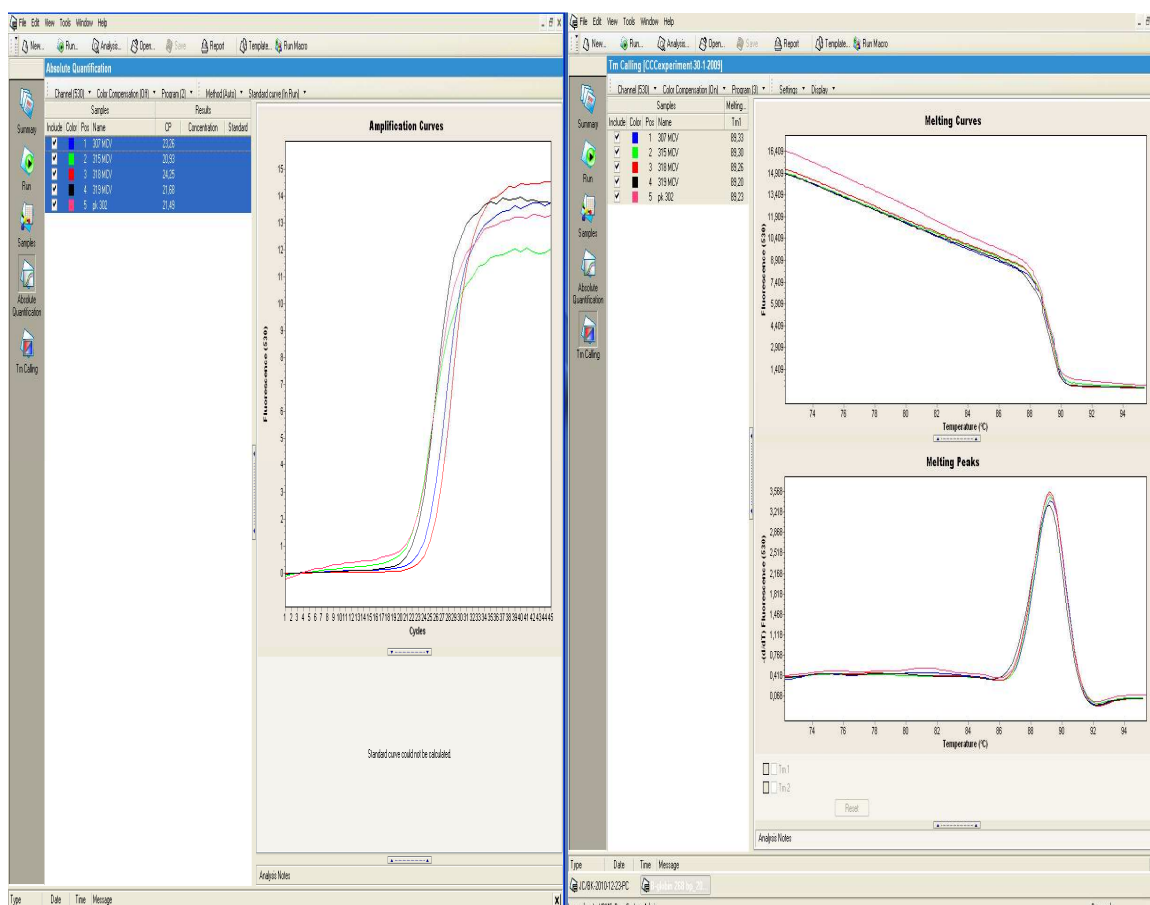
Pridobljena nukleotidna zaporedja smo analizirali in obdelali z računalniškim paketom Vector NTI Advance v 10.1.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Z uporabo specifičnih algoritmov smo za vsak pridelek PCR uskladili nukleotidna zaporedja in na ta način pridobili del nukleotidnega zaporedja gena p43K MCV.

V programu BioEdit smo s ClustalW Multiple Alignment poravnali vsa v raziskavo vključena zaporedja MCV in glede na spremembe na genomskih mestih določali podtip. Vsa zaporedja smo primerjali z referenčnim zaporedjem MCV podtipa I (U60315).

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE GENA ZA HUMANI BETA-GLOBIN

Po osmitvi DNA iz tkivnih vzorcev MCV smo najprej izvedli notranje kontrolno pomnoževanje. Značilen 268 bp dolg predel gena za humani beta-globin nam je uspelo pomnožiti pri vseh 43 vzorcih vključenih v nalogo. Rezultati uspešnega pomnoževanja humane DNA v 4 kliničnih vzorci vidimo na sliki 8 (levo). S talilno krivuljavo smo dokazali značilni talilni vrh pri 89 °C pri vseh 43 vzorcih (slika 8, desno).

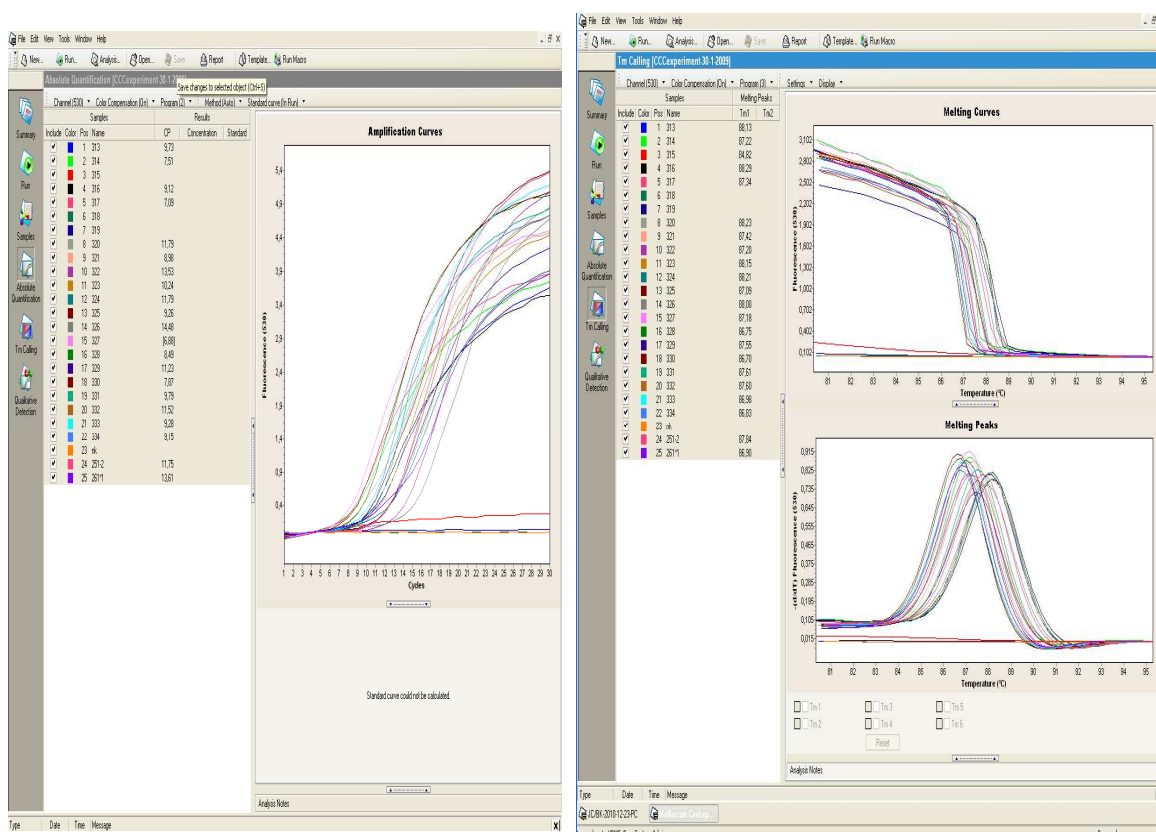


Slika 8: Prisotnost beta globina v tkivnih vzorcih MCV. Levo: primer uspešnega pomnoževanja 268 bp dolgega predela za humani beta-globin. Desno: primer uspešne določitve humanega beta-globina s pomočjo talilne krivulje.

## 4.2 POMNOŽEVANJE DNA MCV

### 4.2.1 Pomnoževanje MCV z RT-PCR

Z oligonukleotidnimi začetniki MCVf in MCVr, ki pomnožujejo 150 bp predel gena p43K, smo uspešno dokazali MCV DNA pri 39 (90,7 %) od 43 preiskovanih vzorcev. Primeri pomnoževanja virusnega genoma v 22 kliničnih vzorcih so prikazani na sliki 9.



Slika 9: Primer uspešnega pomnoževanja DNA MCV. 1–22: klinični vzorci; nk: negativna kontrola; 251, 261: pozitivna kontrola.

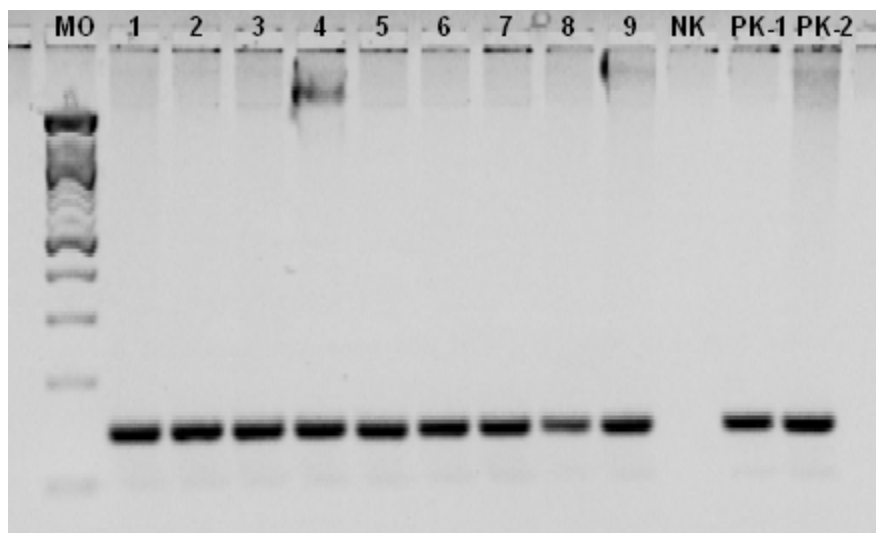
Na osnovi analize talilne krivulje smo dokazali, da pridelki reakcije PCR tvorijo vrh med 87 in 88 °C. Vendar zaradi premajhne razlike v talilni temperaturi med pridelki obeh genotipov nismo uspeli definirati oz. ločiti podtipov MCV. Po končanem RT-PCR smo dobili rezultate prikazane v preglednici 3.

3. **Preglednica:** Prikaz kvalitativnih rezultatov pri dokazovanju MCV DNA z RT-PCR.

Število vzorcev	MCV PCR v realnem času pozitivni	MCV PCR v realnem času negativni
43	39 (90,7 %)	4 (9,3 %)

#### 4.2.2 Pomnoževanje MCV DNA s klasično metodo PCR

S klasično metodo PCR smo uspešno pomnožili DNA MCV v vseh vzorcih ter dobili enake rezultate kot so prikazani v preglednici 3. Primeri uspešnega pomnoževanja genoma v 9 kliničnih vzorcih so prikazani na sliki 10.



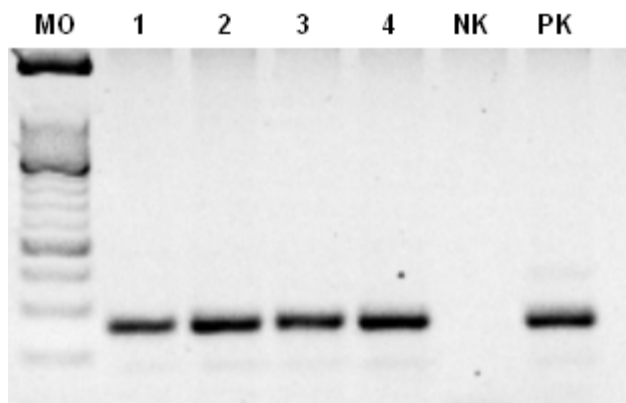
Slika 10: Fotografija elektroforeznega gela 9 nanešenih pridelkov PCR (150 bp), pridobljenih s pomnoževanjem DNA 9 izolatov MCV; 1–9: zaporedne številke pridelkov PCR; NK: negativna kontrola; PK: pozitivna kontrola; MO: molekulski označevalec 100 bp.

### 4.3 POMNOŽEVANJE HPV DNA

#### 4.3.1 Pomnoževanje HPV s klasično metodo PCR

Z uporabo OZ GP5+ in GP6+ smo pri vseh štirih vzorcih, v katerih nismo uspeli dokazati DNA MCV, uspešno pomnožili približno 150 bp dolgo področje genoma HPV. Primeri

pomnoževanja pribl 150 bp dolgega genomskega področja HPV v štirih kliničnih vzorcih so prikazani na sliki 11.



Slika 11: Fotografija elektroforeznega gela 4 nanešenih pridelkov PCR, pridobljenih s pomnoževanjem HPV GP5+/GP6+; 1–4: zaporedne številke pridelkov PCR; NK: negativna kontrola; PK: pozitivna kontrola; MO: molekularni označevalec 100 bp.

#### 4.4 REZULTATI DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA IN GENSKEGA PODTIPA

Nukleotidno zaporedje 150 bp velikega dela gena p43K smo uspešno določili vsem 39 v nalogi opredeljenim izolatom MCV.

Pri filogenetski analizi smo odstranili zaporedje začetnih oligonukleotidov in dobili zaporedja dolga 103 bp. Zaporedja smo primerjali z zapisi v genski banki. V programu BioEdit smo s ClustalW Multiple Alignment poravnali vsa v raziskavo vključena zaporedja MCV in glede na spremembe na genomskih mestih smo določali podtip. Iz dobljenih podatkov smo lahko določili genetske podtipe, ki so prikazani v preglednici 4.

V nalogi smo nato dobljena zaporedja primerjali z referenčnim zaporedjem MCV izolata U60315 (podtip 1) in izolatov M63486 (podtip 1) in M63487 (podtip 2) in na osnovi skladnosti nukleotidnih zaporedij našim izolatom določali podtip.

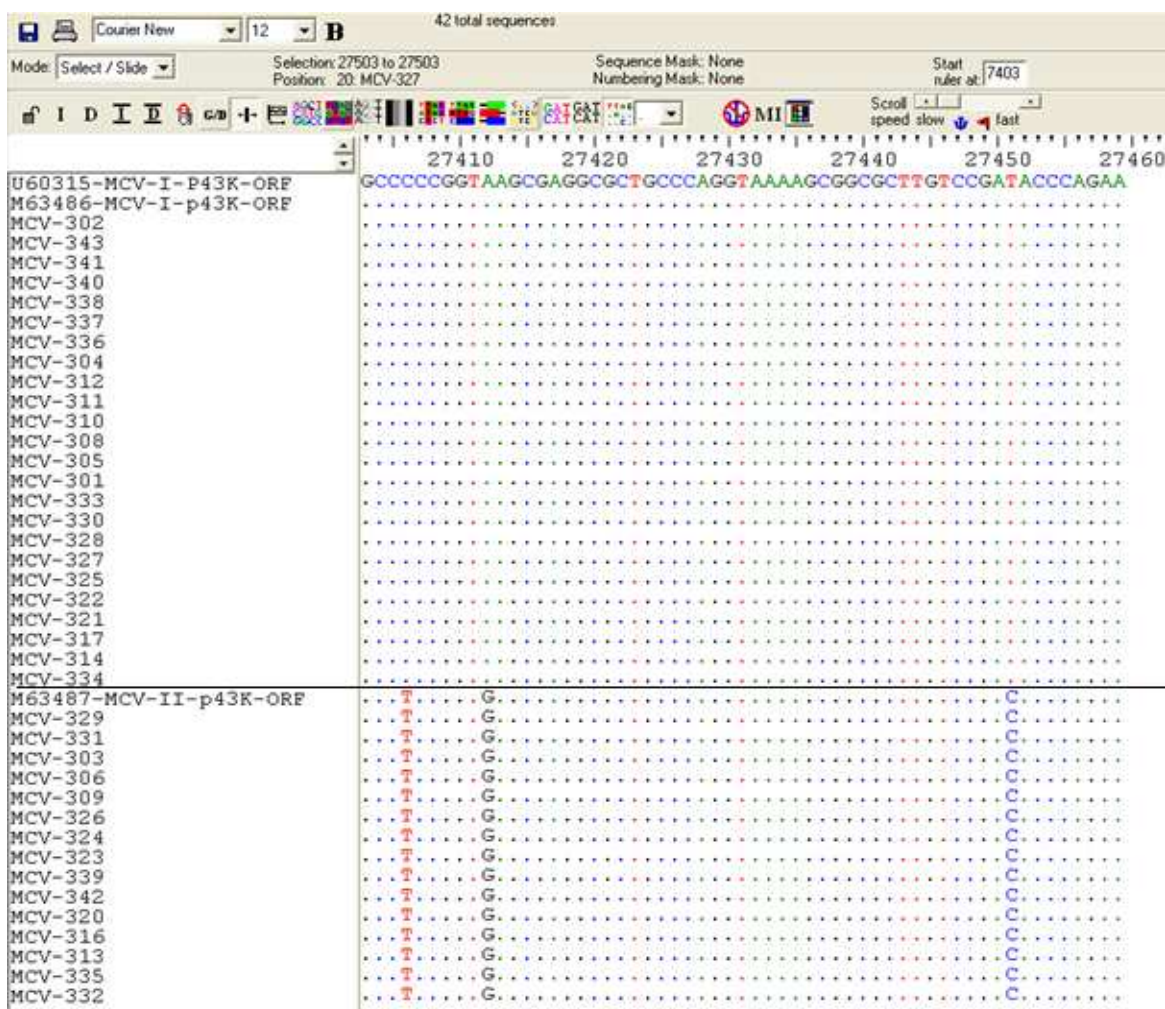
Kot je razvidno iz slike 12, smo 24 izolatov MCV določili podtip 1, 15 izolatov pa podtip 2.

Vsi izolati, ki so pripadali podtipu 2, so se od referenčnega izolata U60315 (tip 1) razlikovali na 3 mestih (slika 12). Spremembe smo zaznali na poziciji 27406, kjer je pri podtipu 1 na tem mestu C pri podtipu 2 pa T, na poziciji 27412 smo pri podtipu 1 določili

A, pri podtipu 2 pa G, tretjo spremembo smo določili na poziciji 27451, kjer je pri podtipu 1 T, pri podtipu 2 je C.

4. **Preglednica:** Prikaz dobljenih genetskih podtipov pri 39 izolatih MCV.

Število vzorcev	Podtip 1	Podtip 2
39	24 (55,8 %)	15 (34,9 %)



Slika 12: Določitev nukleotidnega zaporedja ter razlike med podtipom 1 in 2.

## 5 RAZPRAVA

*Molluscum contagiosum* virus povzroča bolezen z benignimi tumorji na koži, bradavičaste izpuščaje in je specifična človeška okužba. Ni dokazov o prenosu med človekom in živalmi. Okužbe so pogostejše dokazane pri imunsko oslabljenih bolnikih. Okužbe povzročajo različni genotipi virusa MCV. Ob kliničnem pregledu je kožne spremembe mogoče zamenjati s kondilomi.

Pri uporabi metodologije smo se v naši raziskavi oprli na članek, ki je bil objavljen leta 2007, kjer so pri 703 ženskah odvzeli brise patoloških sprememb na genitalnem predelu (14). Naša raziskava se je razlikovala v tem, da smo v raziskavo vključili tkivne vzorce moških in žensk s spremembami na genitalnem predelu. V raziskavi smo uporabili oligonukleotidne začetnike navedene v omenjenem članku.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati omenjene študije. Tudi mi smo dokazali različne podtipe virusa MCV in sicer v 55,8 % podtip 1 ter pri 34,9 % podtip 2. Medtem ko so raziskovalci pri Trami (14) dokazali 73,5 % podtipa 1 ter 26,5 % podtipa 2. Avtorji so za ločevanje genotipov na preiskovanem odseku genoma dokazali spremembe le v enem nukleotidu, kar jim je zadostovalo za opredelitev podtipa virusa MCV. V naši raziskavi smo v pomnoženem odseku genoma MCV dokazali še dve dodatni mesti, ki sta tudi potrjevali razlike med MCV podtipom 1 in MCV podtipom 2. Menimo, da smo zaradi tega še bolj zanesljivo potrdili razlike med obema podtipoma virusa.

V naši diplomski nalogi smo od 43 prejetih vzorcev potrdili prisotnost MCV v vzorcih oz. pri 39 (90,7 %) preiskovancih. Od tega smo pri 24 (55,8 %) preiskovancih določili podtip 1 in pri 15 (34,9 %) preiskovancih podtip 2. Pri 4 (9,3 %) preiskovancih nismo določili prisotnost MCV. Preostalih podtipov MCV pri naših preiskovancih nismo določili. Iz tega podatka lahko primerjamo tudi prevalenco MCV podtipa 1 in 2 med našimi vzorci in vzorci, ki so jih uporabili Trama in sodelavci (2007).

Med vsemi vzorci, ki smo jih prejeli, smo imeli 76,7 % vzorcev, ki so pripadale osebam moškega spola in 23,3 % vzorcev osebam ženskega spola. Od vseh pozitivnih vzorcev na



genotip 1 smo jih 91,7 % dokazali pri moških in 8,3 % pri ženskah. Med pozitivnimi na genotip 2 je bilo 53,3 % moških in 46,7 % žensk. Če primerjamo rezultate glede na spol, ugotovimo, da je pri ženskah dokazanih 20,0 % genotipa 1 ter 70,0 % genotipa 2, 10 % vzorcev pa je bilo negativnih. Pri moških smo genotip 1 dokazali v 66,7 % in genotip 2 v 24,2 %, preostanek 9,1 % so bili negativni vzorci.

Vzorci, pri katerih nismo določili DNA MCV, smo zaradi podobnega kliničnega izgleda kožnih sprememb pri okužbi s papilomavirusi testirali na prisotnost DNA humanih papilomavirusov. Naša odločitev se je izkazala za pravilno, saj smo v 4 DNA MCV negativnih vzorcih dokazali virus HPV. To verjetno pomeni, da lahko v določenih sicer redkih primerih okužbo z MCV zamenjamo za kondilome.

Pri odkrivanju DNA MCV, bi lahko uporabljali za potrjevanje diagnoze tudi histološke vzorce, ki zaradi značilne histološke slike potrdijo, ali gre za okužbo z virusom MCV ali kakšno drugo virusno okužbo. 26 vzorcev, ki so bili vključeni v našo raziskavo, so poslali tudi na patohistološko analizo. Rezultati poslanih vzorcev so se ujemali z našimi.

Zasledili smo tudi, da so se pri nekaterih študijah, kjer so določali DNA MCV opredelili le na populacijo otrok in ugotovili, da je največja prisotnost DNA MCV na koži otrok v starosti od 0 do 60 mesecev (33).

## 6 SKLEP

- Z uporabo metode PCR v realnem času smo ugotavljali prisotnost DNA virusov MCV pri 43 vzorcih, poslanih v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aida na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.
- Pozitiven rezultat smo ugotovili pri 90,7 % pregledanih vzorcev bolnikov s sumom na okužbo z virusom *Molluscum Contagiosum* v Sloveniji.
- Pomnoženim pridelkom reakcije PCR smo z metodo sekveniranja določili nukleotidno zaporedje. V preiskovanih vzorcih smo ugotovili dva genotipa virusa MCV, in sicer genotip 1 in 2. V večini vzorcev je prevladoval virus MCV genotipa 1.
- V vseh vzorcih, kjer nismo dokazali DNA virusa MCV smo dokazali prisotnost DNA papilomavirusov.
- Menimo, da bi lahko metodi uvedli v redno rutinsko diagnostiko, z nadaljnjo optimizacijo reakcije in z dodatkom ustrezne interne kontrole.

## PRILOGA

Priloga: Seznam 43 vzorcev, ki smo jih testirali ter jim določali nukleotidno zaporedja

Spol	Št. vz.	Mesto odvzema	Real Time PCR	Genetski podtip
m	301	sp. del trebuha	+	tip 1
m	302	sp. del trebuha	+	tip 1
ž	303	pubis	+	tip 2
m	304	stegno	+	tip 1
m	305	penis	+	tip 1
m	306	penis	+	tip 2
ž	307	trebuh	–	–
m	308	trebuh	+	tip 1
m	309	penis	+	tip 2
m	310	pubis	+	tip 1
m	311	pubis	+	tip 1
m	312	penis	+	tip 1
m	313	pubis	+	tip 2
m	314	pubis	+	tip 1
m	315	penis	–	–
ž	316	pubis	+	tip 2
m	317	pubis	+	tip 1
m	318	penis	–	–
m	319	penis	–	–
ž	320	pubis	+	tip 2
m	321	pubis	+	tip 1
m	322	pubis	+	tip 1
m	323	pubis	+	tip 2
m	324	pubis	+	tip 2

m	325	pubis	+	tip 1
m	326	penis	+	tip 2
m	327	pubis	+	tip 1
m	328	stegno	+	tip 1
ž	329	stegno	+	tip 2
m	330	penis	+	tip 1
m	331	pubis	+	tip 2
ž	332	pubis	+	tip 2
ž	333	pubis	+	tip 1
ž	334	pubis	+	tip 1
ž	335	pubis	+	tip 2
m	336	pubis	+	tip 1
m	337	pubis	+	tip 1
m	338	pubis	+	tip 1
m	339	pubis	+	tip 2
m	340	pubis	+	tip 1
m	341	zg. okončina	+	tip 1
ž	342	pubis	+	tip 2
m	343	pubis	+	tip 1

## VIRI

1. Birsthistle K. and Carrington D.: *Molluscum Contagiosum Virus*. *Jurnal of Infection* 1997, 34, 21–28.
2. Brock, *Biology of Microorganisms*, Eight Edition, Phippe, Prentice Hall International, 1997; 293–294.
3. Diven D. G.: An overview of poxviruses. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44:1–14.
4. Smith K. J. and Skelton H.: *Molluscum Contagiosum: Recent Advances in Pathogenic Mechanisms, and New Therapies*, *Am J Clin Dermatol* 2002; 3 (8): 535–545.
5. Bugert J. J: *Molluscum Contagiosum Virus*, Elsevier 2008; 319–324.
6. Lefkowitz E. J., Wang C., Upton C. *Poxviruses: past, present and future*, *Virus Research* 2006; 117, 105–118.
7. Mark R., Buller L. and Palumbo G. J.: *Poxvirus Pathogenesis*, *Microbiological Reviews*. 1991; 80–122.
8. <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/intro-vir.html> (25. 9. 2010).
9. Specter S., Hodinka R. L., Young A. S., Wiedbrauk D. L.: *Clinical Virology Manual*, 4th Edition, ASM Press, 2009; 523–540.
10. *QI Aamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 11/2007; 33–36.
11. Mackay I. M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection* 2004; 10: 190–212.

12. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> ,(2. 10. 2010)
13. Husar K., Skerlev M.: Molluscum Contagiosum from Infancy to Maturity. *Clinics in Dermatology*, 2002; 20: 170–172.
14. Trama J. P., Adelson M. E., Mordechai E.: Identification and genotyping of molluscum contagiosum virus from genital swab samples by real—time PCR and Prosequencing. *Journal of Clinical Virology* 2007; 40: 325–329.
15. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M.: Splošna medicinska virologija. *Medicinski razgledi*, Ljubljana, 1998; 16.
16. Voet D., Voet J. G.: *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 1995, 882–896.
17. Sanger F., Nicklen S.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, Concluson A:R: 1977; 74: 5463–5467.
18. Poljak M., Avšič - Županc T., Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji, *Medicinski razgledi*, Ljubljana, 1994; 33: 379–400.
19. Herzog - Velikonja B., Gruden K., Pašič L.: *Praktikum molekularne biologije*, Ljubljana, Študentska založba 2001; 59–65.
20. Wittwer C. T., Fillmore G. C., Garling D. J.: Minimizing the required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical Biochemistry*, 1990; 189: 328–331.
21. Meisenberg G., Simmons W. H.: *Principles of medical biochemistry*, Mosby, St. Louis, 1998; 192–193.

22. <http://www.shinegene.org.cn/service/serv001.html>, (12. 12. 2010).
23. [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/174.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/174.html), (13. 12. 2010)
24. Greer C. E., Wheeler C. M., Manos M. M.: Sample preparation and PCR amplification from paraffinembedded tissues. *Genome Research* 1994; 3: S113-S122.
25. Burk R. D.: Papillomavirus nomenclature. In: Abstracts of the 26th International Papillomavirus Conference & Clinical and Public Workshops. Montreal, 2010. International Papilomavirus Society 2010; P-688.
26. Bernard H.U., Burk R. D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E. M.: Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 104: 70–79.
27. Bernard H. U., Celleja - Macias I. E., Dunn S. T.: Genome variation of human papillomavirus types. Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer* 2006; 118: 1071–1076.
28. De Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., Zur Hausen H.: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
29. Poljak M., Kocjan B. J., Seme K., Fujs K., Potočnik M., Luzar B., Gale N.: Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija* 2005; 9: 60–72.
30. Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V.: On behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncology*, 2009; 10; 321–322.

31. Watanabe T., Tamaki K.: Detection of molluscum contagiosum virus gene transcripts by in situ hybridization. *Journal of Dermatological Science* 2009; 54: 209–212.
32. Senkevich T. G., Koonin E. V., Bugert J. J., Darai G., Moss B.: The genome of molluscum contagiosum virus: analysis and comparison with other poxviruses. *Virology* 1997; 233: 19–42.
33. Dohil M. A., Lin P., Lee J., Lucky A. W., Paller A. S., Eichenfield L. F.: The epidemiology of molluscum contagiosum in children. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: 47–54.
34. Espy M. J., Uhl J.R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D. C., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill III F. R., Smith T. F.: Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews* 2006; 19: 165–256.
35. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research* 2002; 30: 1292–1305.
36. Bustin S. A., Mueller R.: Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical science* 2005; 109: 365–379.
37. Lukhtanov E. A., Lokhov S. G., Gorn V. V., Podyminogin M. A., Mahoney W.: Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic acids research* 2007; 35: e30.
38. Maver P. J., Poljak M., Seme K., Kocjan B. J.: Detection and typing of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 6, HPV 11, HPV 42, HPV 43 and HPV 44 by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Journal of Virological Methods* 2010; 169: 215–218.