

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta



**Lidský papilomavirus a jeho význam pro diagnosticko-
léčebnou rozvahu**

DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Hana Jaworek

Olomouc 2019

Doktorand:

Mgr. Hana Jaworek

Doktorský studijní program:

Pediatric

Pracoviště:

Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařská fakulta Univerzity Palackého
v Olomouci a Fakultní nemocnice
Olomouc
Hněvotínská 5
Olomouc

Školitel:

Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškerou použitou literaturu, ze které jsem čerpala. Práce byla realizována pod odborným dohledem školitele, Mgr. Vladimíry Koudelákové, Ph.D., a podporována grantem IGA LF UP 2019_003, Ministerstva školství (LO1304 a LM2015064) a Technologické agentury České republiky (TAČR; TE02000058).

Poděkování

Děkuji mé školitelce Mgr. Vladimíře Koudelákové, Ph.D. za vedení mé práce, poskytnutí cenných rad a připomínek k práci na projektech a publikacích a především za veškerý čas a energii, kterou mi věnovala. Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. bych chtěla poděkovat za statistickou analýzu dat pro naše publikace a tuto disertační práci. Mé poděkování také patří panu docentu MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. vedoucímu Ústavu molekulární a translační medicíny za odborné vedení projektů.

V Olomouci,

Mgr. Hana Jaworek

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Cíle práce | 8 |
| 2. Kapitola – teoretická část | 9 |
| 2.1 Infekce lidskými papilomaviry | 9 |
| 1.2 Struktura viru a HPV indukovaná kancerogeneze | 11 |
| 1.2 Karcinom cervixu | 17 |
| 1.2.1 Klasifikace cervikálních lézí..... | 17 |
| 1.2.2. Očkování proti HPV | 19 |
| 1.2.3. Screening cervikálního karcinomu v ČR..... | 20 |
| 1.2.4. HPV screening..... | 21 |
| HPV detekční testy validované pro primární cervikální screening | 22 |
| 1.2.4 Triážové testy | 26 |
| 1.3. Souhrn kapitoly | 30 |
| 2. Kapitola – experimentální část..... | 31 |
| 2.1. Pilotní studie pro využití samoodběrové soupravy a molekulární HPV diagnostiky pro screening karcinomu děložního čípku | 31 |
| 2.1.1. Úvod | 31 |
| 2.1.2. Pacienti a metody..... | 33 |
| 2.1.3. Výsledky..... | 34 |
| Výsledky HPV testování..... | 34 |
| Hodnocení spokojenosti se samoodběrovou sadou | 37 |
| 2.1.4. Diskuze..... | 37 |
| 2.1.5. Závěr | 40 |
| 2.1.6. Podíl autora dizertační práce na daném tématu..... | 40 |
| 2.2. Srovnání metod detekce HPV DNA cobas® 4800 HPV, PapilloCheck® HPV – Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP v cervikálních a cervikovaginálních stěrech..... | 41 |
| 2.3.1. Úvod | 41 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.3.2. | Materiál a metody | 42 |
| | Klinické vzorky | 42 |
| | Příprava vzorků..... | 42 |
| | Detekce HPV DNA..... | 44 |
| | Statistická analýza | 47 |
| 2.3.3. | Výsledky..... | 47 |
| | Míra HPV positivity..... | 47 |
| | Porovnání HPV positivity u cervikálních a cervikovaginálních stěrů | 52 |
| | Porovnání výsledků metod cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP | 52 |
| | Sensitivita a specifická analyzovaných metod ve srovnání s konsenzuálním výsledkem..... | 55 |
| | Porovnání sensitivity a specifických metod pro cervikální a cervikovaginální stěry..... | 58 |
| | Selhání detekce HPV DNA | 58 |
| 2.3.4. | Diskuse..... | 60 |
| 2.3.5. | Závěr | 62 |
| 2.3.6. | Podíl autora dizertační práce na daném tématu..... | 63 |
| 3. | Souhrn | 64 |
| 4. | Summary | 66 |
| 5. | Seznam zkratk..... | 68 |
| 6. | Seznam literatury | 71 |
| 7. | Seznam publikací autora | 87 |
| 7.1 | Původní a přehledové práce..... | 87 |
| 7.2. | Publikovaná abstrakta | 87 |
| 7.3. | Seznam přednášek a posterů přednesených autorem na veřejných odborných fórech | 87 |

| | |
|-----------------|-----|
| 8. Přílohy..... | 91 |
| Příloha 1..... | 91 |
| Příloha 2..... | 97 |
| Příloha 3..... | 105 |
| Příloha 4..... | 115 |

1. Cíle práce

Tato disertační práce je zaměřena na nové možnosti a trendy v oblasti screeningu cervikálního karcinomu. Prvním z cílů této disertační práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na screening cervikálního karcinomu. V současné době je v České republice cervikální screeningový program založený na cytologickém vyšetření stěru z děložního čípku. V řadě zemí jsou již pro primární screening používány metody detekující přítomnost lidského papilomaviru (HPV), které jsou schopny zachytit přes 99 % pokročilých CIN (cervical intraepithelial neoplasia) a cervikálních nádorů (1). Sensitivita cytologického vyšetření pro detekci pokročilých CIN se naopak pohybuje pouze mezi 50-70 % (2-4). Jedním z cílů této práce bylo vypracování review zaměřeného na přehled a porovnání dostupných HPV detekčních metod se zaměřením na metody vhodné pro primární screening. Toto review bylo publikováno v časopise Česká gynekologie (příloha 1).

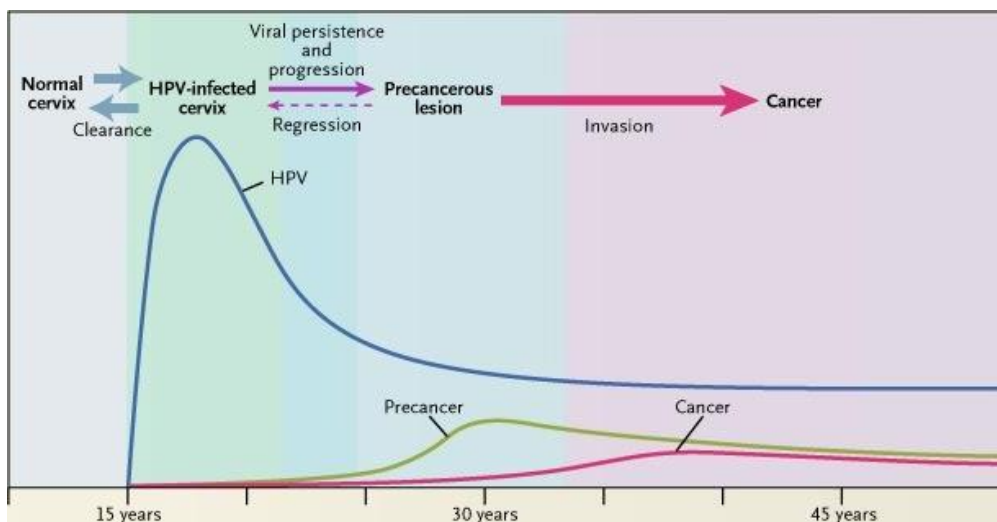
Cervikálního screeningu se v České republice účastní pouze 55 % cílové populace žen (5). Jednou z možností zvýšení účasti českých žen v cervikálním screeningu bylo adresné zvaní těchto žen k návštěvě gynekologa. Projekt adresného zvaní však zvýšil účast na cervikálním screeningovém programu pouze o 8,1 % (6). Řada studií naopak ukázala, že by nabídnutí samoodběrové sady ženám, které se screeningu neúčastní, mohlo být úspěšnější (7). Dalším cílem této práce bylo provedení pilotní studie využití samoodběrové soupravy a molekulární diagnostiky HPV infekce pro screening karcinomu děložního čípku v České Republice. V rámci pilotní studie bylo hodnoceno, jak by byla přijata možnost samoodběru v populaci českých žen. Výsledky studie byly publikovány v časopise Česká gynekologie (příloha 2).

Dalším cílem této práce bylo přímé porovnání detekce HPV16, HPV18 a skupiny dalších 12 hrHPV (vysoce rizikové HPV) genotypů pomocí tří HPV detekčních metod - cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP. Cílem této studie bylo srovnání analytických parametrů metod určených pro primární cervikální screening na souboru cervikálních stěrů odebraných gynekologem a cervikovaginálních stěrů získaných samoodběrem. Výsledky této studie byly publikovány v časopise The Journal of Molecular Diagnostics (příloha 3).

2. Kapitola – teoretická část

2.1 Infekce lidskými papilomaviry

Infekce lidským papilomavirem (HPV) patří mezi nejrozšířenější pohlavně přenosné choroby. HPV infekce je často bezpříznaková, s inkubační dobou 1-8 měsíců. Prevalence HPV infekce se v jednotlivých studiích značně liší v závislosti na geografii, věku zkoumané populace a citlivosti použitých detekčních metod. Vyhodnocení celoživotní prevalence ukazuje, že se během svého života s HPV infekcí setká přibližně 80 % sexuálně aktivních jedinců. Nejčastěji k tomu dochází krátce po začátku sexuálního života. Nejvyšší HPV prevalence je tedy ve věkové skupině do 25 let a je výrazně vyšší u skupiny jedinců se třemi a více sexuálními partnery. Ve většině případů je HPV infekce během 12-18 měsíců eliminována imunitním systémem (clearance virové DNA). Přibližně u 10 % HPV pozitivních jedinců dochází k perzistenci HPV infekce a u méně než 1 % z nich k vývoji cervikálního karcinomu (obrázek 1.) (8-10).



Obrázek 1. Prevalence HPV infekce a postupný vývoj prekancerózy a karcinomu cervixu v závislosti na věku žen (11).

Dle míry onkogenního potenciálu dělíme HPV na high risk (hrHPV) a low risk (lrHPV). HPV genotypy jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce 1. Pro vznik karcinomu cervixu je nezbytná infekce alespoň jedním onkogenním podtypem hrHPV (12). V HPV indukované kancerogenezi je zásadním krokem integrace HPV DNA do lidského genomu, která vede k chromozomální instabilitě, fragmentaci HPV DNA v oblasti E2 genu (v některých případech rovněž E1 nebo L1 genu), nadměrné expresi

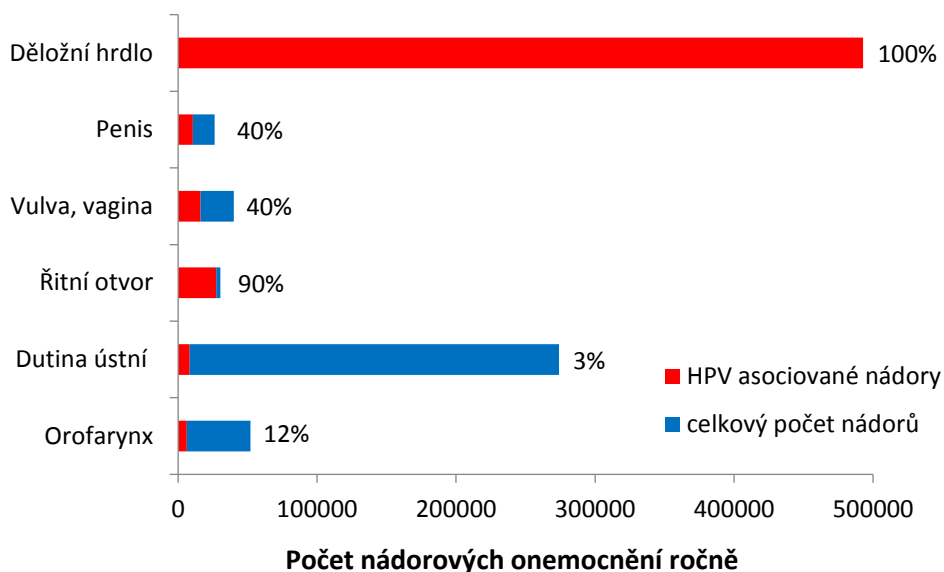
E6 a *E7* onkogenů a progresi onemocnění. K časté integraci dochází zejména u genotypů HPV16 a 18, které jsou zároveň nejvíce onkogenní a zodpovědné za většinu případů karcinomu cervixu (7;13;14).

Tabulka 1. Rozdělení HPV dle míry onkogenního vlivu na vznik karcinomu cervixu (15;16).

| Klasifikace | HPV podtypy |
|-----------------------------|--|
| Onkogenní (high-risk) HPV | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 |
| Pravděpodobně onkogenní HPV | 68 |
| Potenciálně onkogenní HPV | 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97 |
| Neonkogenní (low-risk) HPV | 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89 |

Globálně je infekce hrHPV příčinou přibližně 10 % karcinomů vyskytujících se u žen a více než 5 % všech nádorových onemocnění (17;18). Kromě karcinomu cervixu je infekce hrHPV spojená se vznikem karcinomu vulvy, vagíny, penisu, řitního otvoru, kůže, dutiny ústní, oropharynxu a larynxu (obrázek 2). HPV DNA byla také detekována v nádorech esophagu, plic, tlustého střeva, vaječníků, prsu, prostaty, močového měchýře a nosní dutiny. Vliv hrHPV infekce na vznik těchto typů nádorů však není zcela objasněn (18).

K hypotéze možné asociace HPV infekce se vznikem karcinomu plic vedla morfologická podobnost některých karcinomů plic s HPV asociovanými anogenitálními nádory (19;20). Kromě toho je HPV infekce asociována s respirační papillomatózou, která může vést až ke vzniku nádorů (21). HPV infekce je také prokazatelně asociována se vznikem nádorů orofarynxu, který se nachází poblíž dýchacího traktu (22). Vlivem HPV infekce na vznik karcinomu plic se zabývaly řada studií včetně meta-analýz (23-27). Výsledky těchto studií jsou však značně rozporuplné. HPV prevalence se u karcinomu plic pohybuje v závislosti na geografii mezi 0-78 % (27), s významně vyšší HPV prevalencí v oblasti Severní Ameriky a Asie než v evropských zemích (26). V rámci naší studie, nebyla přítomnost hrHPV (HPV16, 18, 31, 56) u nemalobuněčných karcinomů plic v české populaci detekována (28) (příloha 4).



Obrázek 2. HPV asociovaná nádorová onemocnění (18).

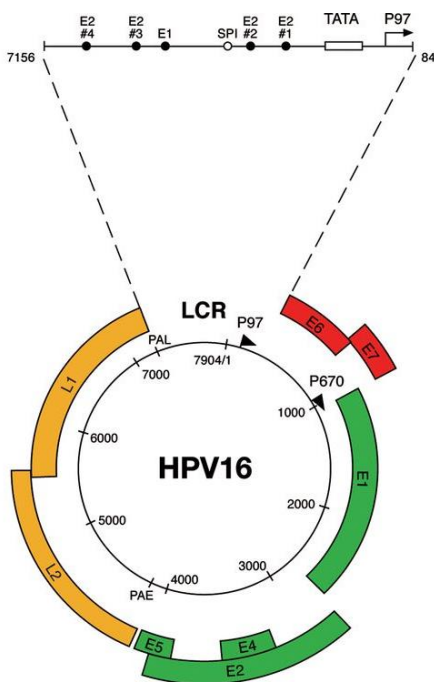
Infekce lidskými papilomaviry (I_rHPV) může také vést ke vzniku benigních lézí kůže nebo sliznic. HPV infekce kůže může způsobovat vznik běžných, plantárních nebo planárních bradavic, anogenitálních bradavic nebo *epidermodysplasia verruciformis*. Infekce sliznic se může projevit orálními bradavicemi, kondylomaty, fokální epiteliální hyperplasií (tzv. Heckova choroba) a papilomy spojivky, larynxu, dutiny nosní a cervixu (29).

Kromě vzniku maligních a benigních lézí může HPV infekce ovlivňovat fertilitu. HPV byl detekován napříč genitálním traktem mužů i žen (30). U mužů byl HPV detekován ve vzorcích ejakulátu, vázaný v ekvatoriální rovině hlavičky spermie. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že spermie transfekované HPV16 E6/E7 plasmidem i spermie vystavené kapsidovému proteinu HPV L1 jsou schopny penetrovat oocyt a přenést tak HPV do oocytu (31). Řada studií popisuje vliv HPV infekce na úspěšnost asistované reprodukce a zvýšení rizika potratu u spontánních těhotenství i těhotenství po asistované reprodukci (32-34). Vliv HPV infekce na fertilitu však nebyl zcela jasně prokázán, proto v současné době není přítomnost HPV infekce vyšetřována u mužů ani žen z párů léčených pro neplodnost ani u dárců gamet (35;36).

1.2 Struktura viru a HPV indukovaná kancerogeneze

Lidské papilomaviry (čeleď *Papillomaviridae*) jsou malé neobalené dsDNA viry s ikosaedrálním kapsidem (37). Kapsid je tvořen pentamery hlavního kapsidového

proteinu L1 a minoritního proteinu L2 (38). HPV genom je tvořen jednou molekulou cirkulární dsDNA o délce 8 kb asociované s proteiny podobnými histonům (obrázek 3) (39). Všechny otevřené čtecí rámce (ORF) kódující HPV proteiny jsou kódovány pouze v jednom vlákně DNA a transkribovány do jednoho vlákna polycystronní mRNA (40;41). HPV genom můžeme funkčně rozdělit do tří oblastí: nekódující dlouhá kontrolní oblast (LCR) a regiony s ORF pro časné HPV proteiny a pozdní HPV proteiny. LCR obsahuje počátek replikace, promotor včetně vazebných míst pro transkripční faktory regulující expresi časných i pozdních HPV genů. Mezi časné HPV geny se řadí *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7*, tedy geny kódující proteiny podílející se na replikaci viru a HPV indukované kancerogenezi. Mezi proteiny, kódované v pozdní oblasti, patří strukturální proteiny L1 a L2, tvořící kapsid viru (40;42).



Obrázek 3. Organizace HPV genomu- genom HPV16 (7904 bp) (43)

Časné geny (*E1-E7*) jsou exprimovány z p97 (časný promotor) nebo p670 (pozdní promotor) v závislosti na stádiu diferenciace epitelálních buněk. Pozdní ORF (*L1* a *L2*) jsou rovněž exprimovány z p670, ale až po změně splicingu a změně polyadenylačního místa z časného (PAE) na pozdní (PAL). Všechny HPV ORF se nachází na jednom řetězci cirkulární dsDNA. Na obrázku je zvětšená oblast LCR obsahující vazebná místa pro E2, E1 proteiny, SPI (transkripční aktivátor) a TATA box promotoru p97.

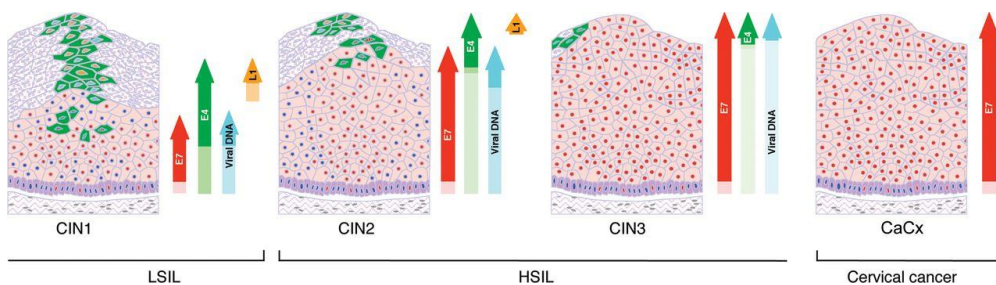
Pro infekci HPV je nezbytná přístupnost buněk bazální vrstvy epitelu a následný transport virové částice do dělících se buněk. Virus je transportován do buněk po rozpoznání kapsidového proteinu L1 heparan sulfát peptidoglykany (např. syndekan-1) nebo kapsidového proteinu L2 α -6 integrinem. Exprese syndekanu-1 je významně zvýšena při hojení ran a α -6 integrin je exprimován na povrchu buněk migrujících k místu poranění epitelu. Poranění epitelu tedy zpřístupňuje HPV bazální buňky epitelu a zároveň zvyšuje schopnost buněk epitelu HPV virion vázat a transportovat do buňky (44;45).

Po vstupu HPV do bazálních buněk epitelu jsou nejprve exprimovány proteiny E1 a E2, nezbytné pro replikaci HPV genomu. Replikace virální DNA řízená E1 a E2 proteiny je na rozdíl od replikace genomu infikované buňky nezávislá na buněčném cyklu hostitelské buňky (46). Replikace virální DNA je regulována na úrovni transkripce. V keratinocytech suprabazální vrstvy epitelu dochází k přepnutí transkripce genů z E2-řízeného časného promotoru na E2-nezávislý pozdní promotor a tím k zvýšení exprese E2 a E1 genů (47). Při nízké hladině E2 je tento protein transkripčním aktivátorem. Vysoká hladina E2 proteinu naopak tlumí expresi E6 a E7 onkoproteinů. E6 a E7 proteiny deregulují buněčný cyklus napadené buňky, udržují ji v S-fázi, nezbytné pro replikaci epizomů HPV DNA a brání normální terminální diferenciaci keratinocyty (43).

E6 protein hrHPV genotypů interaguje s tumorsupresorovým proteinem p53 a indukuje jeho ubiquitylaci a následnou degradaci (obrázek 4). Inaktivace p53 narušuje integritu replikované DNA, způsobuje poškození DNA a chromosomální instabilitu. Kromě inaktivace p53 signální dráhy, vedoucí v případě ireversibilního poškození DNA k apoptose, přispívá k imortalizaci infikované buňky také aktivace exprese genu pro telomerasu, zvýšení exprese *c-Myc* a blokace apoptosy vazbou proapoptotických proteinů Bak, FADD (Fas-associated death domain-containing protein) a prokaspasy 8 (48;49).

E7 protein hrHPV genotypů se váže na retinoblastoma protein (pRB) a brání jeho vazbě na transkripční faktory E2F. pRB za fyziologických okolností uvolňuje E2F až po fosforylaci cyklin-dependentními kinasami a umožňuje tak vstup buňky do S-fáze. Overexprese E7 proteinu vede k deregulaci G_1/S kontrolního bodu a následné hyperproliferační infikovaných buněk. E6 a E7 proteiny hrHPV genotypů interagují s p53 a pRB s mnohem nižší afinitou než hrHPV proteiny. Tato interakce neindukuje degradaci cílových proteinů (48;49).

E4 proteinu je užívána jako marker produktivní HPV infekce. Při přechodu v transformující infekci a progresi onemocnění exprese E4 klesá (obrázek 5) (53).



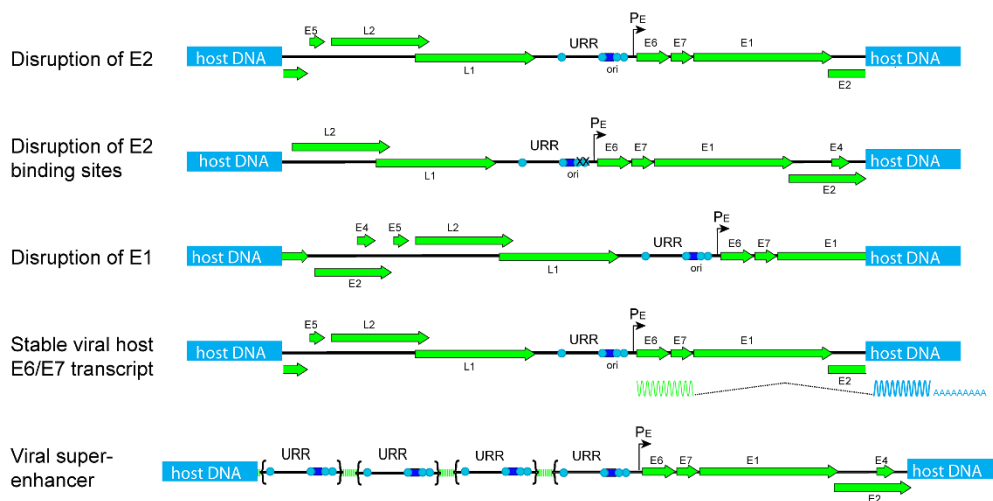
Obrázek 5. Změny exprese HPV genů v závislosti na progresi karcinomu cervixu (43)

Buňky jsou barevně odlišeny na základě rozdílné exprese HPV proteinů. Buňky s modrými jádry jsou neinfikované HPV. Buňky s červeným jádrem jsou děličící buňky, jejichž přítomnost mimo bazální vrstvu epitelu je důsledkem HPV infekce, exprese onkoproteinů E6 a E7. Ve vyšších vrstvách epitelu jsou vyznačeny buňky se zelenou cytoplasmou, v nichž dochází k expresi genů nezbytných pro replikaci virálního genomu (*E1, E2, E4, E5*). Žlutě jsou vyznačeny jádra buněk svrchní části epitelu s amplifikovanou virální DNA, v nichž jsou exprimovány obalové proteiny L2 a L1, nezbytné pro sestavení virionu a následné uvolnění virové částice z odumřelých buněk keratinocytů. Šipky na pravé straně schéma epitelu znázorňují načasování a intenzitu exprese HPV genů. Exprese E6 a E7 proteinů (červeně) za přítomnosti nízké hladiny E1, E2, E4, E5 proteinů umožňuje udržení HPV genomu a intenzivní proliferaci (zeleně). Zvýšení hladiny těchto proteinů vede k amplifikaci HPV genomu. V přítomnosti L2 a L1 proteinů (žlutě) dochází k seskupení infekční částice.

Expresí HPV genů v LSIL/CIN1 lézích se podobá expresi HPV genů během produktivní infekce. U HSIL/ CIN2 a CIN3 dochází k expresi genů nezbytných pro replikaci až v horní části epitelu. Produkce infekčních částic je s progresí léze omezena na čím dál menší část svrchní části epitelu. Na deregulaci exprese E6 a E7 proteinů u pokročilých cervikálních lézí se také podílí integrace HPV do hostitelského genomu. Při integraci dochází ke ztrátě/fragmentaci *E1* a *E2* genů. U cervikálních nádorů není přítomna produktivní infekce a HPV genom je přítomen především v integrované formě.

Při perzistentní HPV infekci velmi často dochází k integraci HPV do lidského genomu. V důsledku integrace dochází ke ztrátě nebo fragmentaci jednoho nebo více genů nezbytných pro syntézu infekční částice HPV a virus ztrácí schopnost regulace exprese virálních onkogenů (obrázek 6). Integrace obvykle vede k fragmentaci nebo ztrátě *E2* a zvýšené expresi a stabilitě transkriptů onkogenů *E6* a *E7* (54;55). Může také dojít k disrupci genu pro *E1* a ztrátě *E1* replikační aktivity, která může indukovat poškození DNA, zástavu růstu a zvýšit genomovou instabilitu v oblasti integrace HPV do genomu (47;56;57). K integraci dochází ve více než 80 % HPV pozitivních cervikálních nádorů (58). U malé části cervikálních nádorů bývá

zachován HPV genom ve formě episomu. V takových případech dochází k narušení funkce E2 proteinu v důsledku metylace E2-vazebného místa v LCR (59).



Obrázek 6: Integrace HPV DNA do lidského genomu (60)

URR- upstream regulatory region (ekvivalentní k LCR- dlouhá kontrolní oblast), P_E- časný promotor

Modely znázorňují různé způsoby integrace HPV do lidského genomu vedoucí ke vzniku nádoru. Světle modrá kolečka vyznačují vazebná místa pro E2 protein v URR a tmavě modré čtverečky značí vazebná místa pro E1 protein v oblasti počátku replikace (ORI).

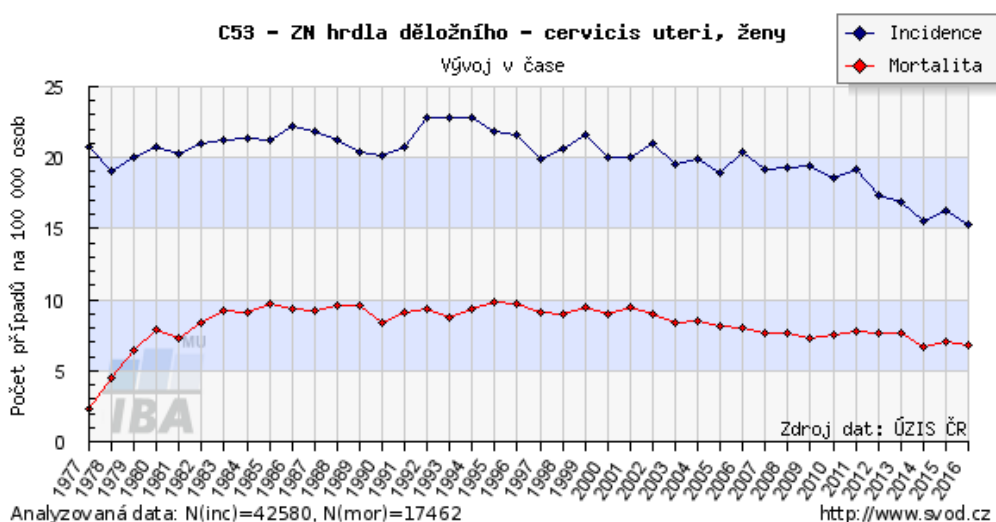
Integrovaná může být jedna kopie HPV genomu nebo více kopií HPV DNA v tandemové repetici. Exprese HPV genů probíhá pouze z poslední kopie HPV genomu na 3' konci. Interní kopie jsou umlčeny v důsledku metylace (14;54;59;61). Integrace HPV genomu může také vést k inzerční mutagenézi, tedy k vlození promotorové sekvence viru do regulační oblasti určitého genu, a tím k aktivaci onkogenů nebo inaktivaci tumorsupresorových genů. K integraci dochází preferenčně v transkripčně aktivních a fragilních oblastech hostitelského genomu (14). Mezi geny často ovlivněné integrací HPV patří geny podílející se na regulaci buněčného cyklu a apoptosy (gen *TP63* - gen z rodiny *TP53*; gen *TPRG1* - regulovaný p63; gen *IL1RAP* s prozánětlivou funkcí a onkogen *Myc*) a regulátory vývoje a kancerogeneze jako *KLF5* a *KLF12*. K integraci pravděpodobně dochází v místech opravy dsDNA zlomů. Tyto oblasti vykazují mikrohomologii mezi lidskou a HPV DNA a obvykle se jedná o dobře přístupné úseky DNA bez nukleosomů (58;62).

HPV integrace může také indukovat epigenetické změny v oblastech virálních i lidských genů a tím měnit jejich expresi. E6 a E7 onkoproteiny indukují

overexpresi DNA metyltransferas, především DNMT1, které katalyzují aberantní metylaci promotoru genů kódujících tumorsupresorové proteiny a miRNA (63).

1.2 Karcinom cervixu

Celosvětově je karcinom cervixu u žen třetím nejčastějším nádorovým onemocněním a čtvrtou nejčastější příčinou jejich úmrtí na nádorová onemocnění. K 85 % případů karcinomu cervixu a s ním spojených úmrtí dochází v rozvojových zemích, kde neexistuje screeningový program, který by umožnil včasnou detekci prekanceróz nebo časných stádií karcinomu (17;18). V České republice je každý rok nově diagnostikováno přes 1000 nových případů karcinomu cervixu a přibližně 400 pacientek s touto diagnózou ročně zemře (obrázek 7). Věkově specifická incidence začíná výrazně růst od 29. roku života, vrcholu dosahuje ve věkové skupině 40-44 let (64). Vztah mezi infekcí hrHPV podtypy a karcinomem cervixu je nezpochybnitelný, až 99,7 % karcinomů cervixu je HPV pozitivních. Nejrozšířenější hrHPV podtypy jsou HPV16 a 18, vyskytující se u přibližně 70 % karcinomů cervixu (7;12).

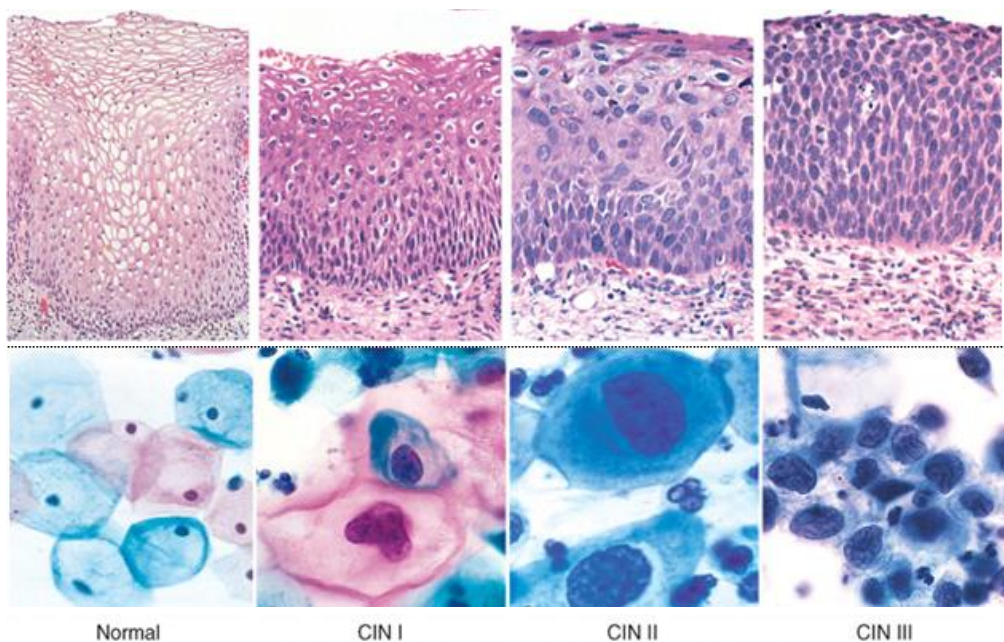


Obrázek 7. Incidence a mortalita cervikálního karcinomu v České republice (www.svod.cz, staženo 11.9.2018).

1.2.1 Klasifikace cervikálních lézí

Vzniku invazivního cervikálního karcinomu předchází perzistentní HPV infekce spolu s přetrvávající prekancerózní lézí. Progrese prekancerózní léze do invazivního karcinomu je proces trvající i déle než deset let (65). Mezi

prekancerózní změny označované jako cervikální intraepiteliální neoplasie (CIN) řadíme dysplasiu cervixu a karcinom *in situ*. CIN jsou charakteristické zvýšenou mitotickou aktivitou buněk, atypickými znaky buněk jako změnou velikosti, tvaru a charakteristických znaků jader a jejich abnormálním uspořádáním buněk. CIN jsou na základě histologického vyšetření děleny do tří kategorií – CIN1, CIN2 a CIN3 (obrázek 8). CIN1 odpovídá lehké dysplasi s dysplastickými buňkami ve spodní třetině epitelu. CIN2 odpovídá středně těžké dysplasi postihující dvě třetiny výšky squamózního epitelu cervixu a CIN3 odpovídá těžké dysplasi nebo karcinomu *in situ*. CIN3 a karcinom *in situ* se vyznačují ztrátou vrstev, aneuploidií jader, atypickými mitosami a nediferencovaným epitelem v celé jeho šíři bez porušení bazální vrstvy epitelu (66-68). Bez jakékoliv léčby se pouze z 20 % CIN1 vyvine léze CIN2, z nichž 30 % progreduje do CIN3. Přibližně ze 40 % CIN3 vzniká cervikální karcinom. Ve zbylých případech dochází ke spontánní regresi léze (obrázek 1)(4).



Obrázek 8. Porovnání řezu cervikálním epitelem různých stupňů cervikální intraepiteliální neoplasie (CIN1-3; barvení hematoxylinem a eosinem) s cytologickým nálezem (barvení dle Papanicolaou) odpovídajícím stupni CIN (68)

S progresí dochází k šíření atypických buněk napříč všemi vrstvami epitelu. Na cytologickém nález je patrný nárůst velikosti jadra buňky na úkor cytoplasmy.

1.2.2. Očkování proti HPV

Díky pomalé progresi onemocnění a možnosti CIN snadno detekovat a efektivně léčit, je cervikální karcinom dobře preventabilní onemocnění (69). Primární prevence cervikálního karcinomu zahrnuje HPV očkování. V současné chvíli jsou dostupné tři profylaktické vakcíny. Vakcína Cervarix (Merck) je cílena proti HPV16 a 18, genotypům asociovaným se 70 % případů cervikálního karcinomu (12;70;71). Kvadrivalentní vakcína Gardasil/Silgard (GlaxoSmithKline) cílená proti HPV6, 11, 16 a 18 navíc chrání ještě proti hrHPV genotypům, způsobujícím 90 % genitálních bradavic u mužů i žen (72). Nonavalentní vakcína Gardasil 9 (Merck) je zaměřena proti HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58 genotypům asociovaným s 90 % cervikálních nádorů (12;73). Všechny tři vakcíny obsahují L1 proteiny cílových HPV typů samovolně seskupených do viru podobných částic (VLPs- virus-like particles). Tyto částice jsou morfologicky a antigenně podobné skutečným virionům (71;74). Aplikace VLPs proto vyvolává produkci vysokého titru anti-HPV IgG neutralizujících protilátek, které brání vstupu HPV do buňky. Díky vysoké podobnosti jednotlivých HPV typů byla u vakcín Silgard a Cervarix kromě cílových HPV typů také pozorována částečně ochrana (tzv. cross-protektce) proti nevakcinárním genotypům HPV 31, 33, 45, 52 a 58 (71;73).

Vakcíny jsou určeny především pro dívky a chlapce starší 10 let, jedince před začátkem jejich sexuálního života. V ČR je od roku 2012 zdravotními pojišťovnami hrazeno očkování ekonomicky nejméně náročnou vakcínou (Cervarix) dívkám mezi 13 a 14 rokem věku. I když jsou vakcíny primárně cíleny na ženy do 25 let, očkování je prokazatelně efektivní i u mladých mužů (16-26 let) a žen středního věku (24 až 45-55 let). Vakcíny plně chrání ženy, které jsou před vakcinací sérologicky i HPV DNA negativní. U žen bez známého HPV statutu, byla efektivita vakcín Cervarix a Silgard pro CIN3 léze asociované s vakcinárními genotypy pouze okolo 45%. Vakcína Silgard také vykazuje 95% efektivitu u HPV negativních žen pro vaginální (VaIN2/3) nebo vulvární intraepiteliální léze 2/3 (VIN2/3), asociované s vakcinárními genotypy. U žen s neznámým HPV statutem klesá efektivita vakcíny pro vznik VaIN2/3 nebo VIN2/3 na 80 %. Obdobně je to u protektce proti genitálním bradavicím, kdy efektivita vakcíny klesá z 96 % na 80 % u žen s neznámým HPV statutem (75-78).

Vakcína Gardasil 9 uvádí 96% efektivitu proti HPV31/33/45/52/58 asociovaným CIN3+ a 100% efektivitu proti VIN2+ a VaIN2+ u HPV negativních žen. Efektivita vakcíny klesá na 5,2 % u žen, kterým byla na začátku studie detekována skvamózní intraepiteliální léze, byly séropozitivní na vakcinární genotypy nebo pozitivní na přítomnost alespoň jednoho ze 14 hrHPV. Efektivita Gardasilu 9 proti HPV6/11/16/18 asociovaným lézím byla porovnatelná jako u vakcíny Silgard (73).

Žádná z vakcín není účinná při léčbě HPV infekce nebo HPV asociovaných onemocnění. Efektivní terapeutické vakcíny, cílené především na E6 a E7 HPV proteiny, prozatím nejsou dostupné (79).

I když můžeme očkováním značně snížit riziko vzniku HPV asociovaných nádorových onemocnění, nelze jím v žádném případě nahradit preventivní gynekologická vyšetření, která mohou odhalit řadu dalších gynekologických alterací. Navíc, i přes vysokou účinnost vakcín, vakcíny nechrání proti celému spektru hrHPV genotypů (76).

1.2.3. Screening cervikálního karcinomu v ČR

V České republice je screening karcinomu děložního hrdla upravován Věstníkem Ministerstva zdravotnictví č. 07/2007. Dle doporučení ministerstva zdravotnictví by mělo být cytologické screeningové vyšetření prováděno dospělým ženám při pravidelné gynekologické prohlídce jednou ročně. Pro screeningové vyšetření se používá cervikální cytologie (Pap test nebo jeho modifikace), kdy jsou exfoliované cervikální buňky z odběrového kartáčku naneseny na sklo, obarveny a hodnoceny pod mikroskopem (obrázek 8). Pro hodnocení nálezů cervikální cytologie je v současné době platný systém Bethesda 2001 (80). Zdokonalením Pap testu je Liquid-based cytology (LBC), kdy jsou buňky stěru solubilizovány ve vhodném médiu a následně naneseny na mikroskopické sklo. LBC zvyšuje senzitivitu vyšetření díky odstranění rušivého vlivu krve či hlenu při klasickém Pap testu, test je navíc lépe hodnotitelný díky rovnoměrnému rozmístění buněk v jedné vrstvě a je použitelný k dalšímu testování, např. k HPV DNA diagnostice (81).

Problémem cervikální cytologie je vysoká míra falešné negativity, pro CIN3 a karcinomu cervixu je udávána falešná negativita 15-35 % (82). Kromě neuspokojivé sensitivity cytologie pro detekci pokročilých CIN (50-70 %) je problémem také limitovaná reproducibilita testu. I přes nedostatky screeningu založeného na cytologickém vyšetření, se díky němu povedlo snížit mortalitu a incidenci cervikálního karcinomu o 50-80 % (2-4). V posledních letech je patrné ustálení poklesu incidence cervikálního karcinomu, což vypovídá o dosažení maximálního dopadu screeningových programů založených na cytologickém vyšetření. Pro další pokles incidence cervikálního karcinomu budou nezbytné změny v rámci primárního screeningu (83-85). Pro zjištění přítomnosti HPV infekce a s ní asociovaných lézí jsou mnohem efektivnější metody založené na detekci HPV, které jsou schopné zachytit přes 99 % pokročilých CIN a nádorů (1).

1.2.4. HPV screening

Přínos HPV diagnostiky jako primární screeningové metody byl prokázán řadou studií (86-90). Tyto studie ukázaly, že screening založený na HPV detekci zachytí perzistentní CIN3+ léze dříve než cytologie a tím zvyšuje pravděpodobnost jejich léčby ještě před progresí do invazivního cervikálního karcinomu. Screening založený na detekci HPV by mohl mít až o 70 % vyšší protektivní schopnost oproti screeningu založenému na cytologickém vyšetření. HPV negativní status má navíc velmi vysokou negativní prediktivní hodnotu (NPV), 5 let po HPV negativním testu byla zaznamenána výrazně nižší incidence cervikálního karcinomu než 3 roky po negativním cytologickém nález. V případě primárního HPV screeningu je doporučován 5-letý screeningový interval. Detekce HPV v kratších intervalech nebo u žen mladších 30 let by vedla ke snížení specifity vyšetření. Vzhledem k vysokému výskytu HPV infekce a následné clearance viru u mladších žen by měly být pomocí HPV DNA diagnostiky vyšetřovány pouze ženy nad 30 let. Prodloužení screeningového intervalu na 5 let by navíc vedlo ke snížení nadbytečných kolposkopií s biopsií a ke snížení finančních nákladů (86-92). HPV diagnostika je rovněž vhodnější pro follow-up pacientek po konzervativní léčbě cervikálních lézí. Reziduální nebo rekurentní CIN2+ detekuje HPV diagnostika dříve, s vyšší sensitivitou a porovnatelnou specificitou jako cytologie (93).

V současné době jsou v České republice v rámci screeningu cervikálního karcinomu k HPV DNA diagnostice zasílány pouze případy s abnormální cytologií s neznámým významem (atypical squamous cells of undetermined significance; ASC-US), vyskytující se přibližně u 4 % případů (94).

Zavedení celoplošného screeningu výrazně snížilo incidenci i mortalitu cervikálního karcinomu. Česká republika bohužel stále patří mezi státy s nedostatečně funkčním screeningovým programem, kdy se screeningu účastní přibližně polovina cílové populace (95). Řešením pro ženy, které z nějakého důvodu nenavštěvují gynekologa, by mohlo být použití samoodběrové sady. V několika studiích byla prokázána vysoká shoda hrHPV detekce mezi vzorky získanými samoodběrem a cervikálním stěrem provedeným gynekologem (95;96).

Diagnostické HPV DNA testy se liší v řadě parametrů (tabulka 2), např. genotypech detekovaných hrHPV, možnosti částečné či plné genotypizace. Většina metod detekujících HPV DNA je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR), která využívá primery detekující různé části HPV genomu, jako MY09/MY11, GP5+/6+, SPF10 (detekce HPV genu *L1*), CP primery (detekce HPV genu *E1*) (97;98) nebo pU primery (detekce HPV genů *E6* a *E7*) (99). Pomocí klasické PCR reakce se specifickými HPV primery je možné detekovat pouze přítomnost HPV DNA, nikoli odlišit jednotlivé podtypy. Pro genotypizaci jsou nejčastěji použity metody založené

na značení primerů (biotin) a následné ELISA reakci (enzyme-linked immunosorbent assay), real-time PCR se značenými próbami, popř. hybridizaci PCR produktů se specifickými oligonukleotidovými próbami fixovanými na stripu (line blot) nebo čipu (microarray) (81).

Řada metod umožňuje detekci přítomnosti hrHPV podtypů, některé z nich umožňují jejich úplnou genotypizaci. Z klinického hlediska je nejdůležitější detekce hrHPV a genotypizace nejvíce onkogenních podtypů HPV16 a 18 (12). Některé firmy (Roche, Seegene a další) proto uvedly na trh systémy určené k částečné genotypizaci HPV. Jedná se většinou o automatizované metody založené na real-time PCR s próbami specifickými pro HPV16 a 18 a proubou nebo setem stejně značených proub pro ostatní typy HPV. Tyto metody se zdají být pro klinickou praxi velmi výhodné, poskytují informaci o přítomnosti širokého spektra hrHPV, blíže specifikují přítomnost HPV16 a 18, jsou automatizované, tedy do značné míry eliminují chyby způsobené lidským faktorem a umožňují rychlou analýzu vysokého počtu vzorků v krátkém čase. Některé systémy jsou také spojené s automatickou izolací DNA ze vzorku (např. cobas® 4800 HPV Test, Roche). Téměř všechny HPV DNA testy jsou kompatibilní s odběrovými médii PreservCyt a SurePath (81).

Problémem řady HPV DNA testů může být jejich cílení na HPV gen *E1* nebo *L1*. Při integraci viru do lidského genomu v některých případech dochází k fragmentaci HPV DNA v oblasti *E1* nebo *L1* genu. V těchto případech mohou takové DNA testy poskytnout falešně negativní výsledek a minout tak nejzávažnější případy (7;13;14;60).

HPV detekční testy validované pro primární cervikální screening

V současné době je komerčně dostupných více než 200 HPV detekčních metod (100), z nichž je dle Meijerova protokolu pouze několik vhodných pro primární cervikální screening. Meijerův protokol ustanovuje, že HPV detekční metody, vhodné pro primární screening cervikálního karcinomu, by měly detekovat CIN2+ léze s relativní sensitivitou $\geq 0,90$ a specificitou $\geq 0,98$ vůči standardnímu porovnávacímu testu. Za standardní porovnávací testy, plně klinicky a epidemiologicky validované, jsou považovány Hybrid Capture 2 (HC2) a GP5+/6+ PCR enzyme immunoassay (EIA). Testy určené pro primární screening by měly být validovány na souboru alespoň 60 CIN2+ a více než 800 \leq CIN1 cervikálních stěrech žen ve věku od 30 do 60 let (101). Testy by také měly mít prověřenou intra- a inter- laboratorní reprodukcibilitu (lower confidence bound $\geq 87\%$) (102). Na validaci nových HPV detekčních systémů pro primární screening se významně podílí iniciativa VALGENT (VALidation of HPV GENotyping Tests) (103).

Tabulka 2 shrnuje charakteristiky HPV detekčních metod plně nebo částečně validovaných dle Meijerova protokolu a jejich klinickou sensitivitu a specificitu pro CIN2+ (102;103). Pro metodu qPCR E6/E7 doposud nebyla publikována studie prokazující její interlaboratorní reproducibilitu a pro metody LMNX Genotyping Kit HPV GP chybí evidence o její intra- i inter- laboratorní reproducibilitě (102).

Cervikální screening založený na HPV detekci je zaveden v Austrálii, Anglii, Itálii, Holandsku a na Novém Zélandu. V řadě dalších zemí je také plánována změna screeningové metody z cytologie na detekci HPV nebo probíhají pilotní studie na porovnání těchto dvou typů cervikálního screeningu. Současné evropské guidelines doporučují screening založený na HPV detekci pro ženy ve věku 30-35 let až do 60-69 let s 5-ti letým intervalem HPV testů. WHO (World Health Organization) také doporučuje použití HPV screeningu pro ženy starší 30 let každých 3-5 let. Pokud není HPV screening dostupný, doporučuje WHO cytologické vyšetření až po aplikaci kyseliny octové. Toto doporučení platí především pro země, kde HPV screening není z ekonomických důvodů dostupný. Ve většině zemí s primárním HPV screeningem je v rámci triáže HPV pozitivních žen používáno cytologické vyšetření. V Německu, kde v současné době probíhá pilotní projekt, je v rámci triáže HPV pozitivních žen zvažována cytologie, HPV genotypizace nebo detekce p16/Ki-76 (104).

Tabulka 2. HPV detekční metody validované pro primární cervikální screening dle Meijerova protokolu

| HPV test (výrobce) | Princip testu | Detekovaný HPV gen, interní kontrola kvality | Detekované HPV podtypy | Bližší specifikace/genotypizace | Klinická sensitivita pro CIN2+ | Klinická specifická pro CIN2+ |
|---|--|--|---|---|--------------------------------|-------------------------------|
| Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (HC2, Qiagen) (101) | RNA próba, detekce vazby (DNA/RNA hybridů) chemiluminiscencí | Celý HPV genom, bez interní kontroly | 13 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68) | ne | 98,7 % | 94,1 % |
| GP 5+/6+ PCR-EIA (Diassay) (101) | PCR s biotinylovanými GP5+/6+ primery, EIA | L1, bez interní kontroly | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | ne | 98,7 % | 96 % |
| APTIMA HPV assay (Hologic Gene-Probe)(105) | Zachycení cílové mRNA, amplifikace RNA a vazba na próby, detekce chemiluminiscencí | E6/E7, neinfekční DNA a RNA | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | ne | 95,5 % | 94,5 % |
| Abbott RealTime High Risk HPV test (Abbott) (106-108) | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | L1, β-globin | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | HPV16, 18 a dalších 12 hrHPV HPV16, 18, 31, 45, 51, 52, 33/58, | 95,6-100 % | 92-93,3 % |
| BD Oncolarity HPV test (BD Diagnostics)(109) | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | E6/E7, β-globin | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | 56/59/66, 35/39/68 | 97 % | 90 % |
| Cervista HPV HR Test (Hologic) | PCR s próbou s technologií Invader, fluorimetrická detekce | L1/E6/E7, HIST2H2BE | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | ne | 89-98,4 % | 91,2-85,2 % |
| cobas 4800 HPV test (Roche) (110;111) | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | L1, β-globin | 14 hrHPV (16, 18, 26, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | HPV16, 18 a dalších 12 hrHPV | 90-98,3 % | 86,2-94,6 % |

| | | | | | | |
|---|--|------------------------|---|---------------------------|--------|--------|
| Linear ArrayHPV genotyping test (Roche) (112) | PCR s biotinylovanými PGM09/PGMY1 a PC04/GH20 primery, RHA | L1, β -globin | 37 HPV (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56,58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89 a IS39) | všechny podtypy | 97,6 % | 91,7 % |
| qPCR (E6/E7) (113) | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | E6/E7, β -globin | 15 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) + 2 lrHPV (6, 11) | všechny podtypy HPV16, 18 | 93,5 % | 95,6 % |
| HPV-Risk Assay (Self-Screen BV) (114) | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | E7, β -globin | 15 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68) | a dalších 13 hrHPV | 97,1 % | 94,3 % |
| PapilloCheck (Greiner Bio-One) (115) | PCR, fluorescenční značení a hybridizace na microarray | E1 (350 bp), ADAT1 | 18 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) + 6 lrHPV (6, 11, 40, 42, 43, 44) | všechny podtypy | 95,8 % | 96,7 % |
| LMNX Genotyping Kit HPV GP (Diassay)(116) | PCR s biotinylovanými GP5+/6+ primery, RHA | L1, CH14 | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56,58, 59, 66, 68) | všechny podtypy | 96,1 % | 92,6 % |
| Anyplex™ II HPV HR Detection (Seegene) (117) | Multiplex real-time PCR, detekce pomocí TOCE technologie | L1, β -globin | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56,58, 59, 66, 68) | všechny podtypy | 98,3 % | 93,6 % |

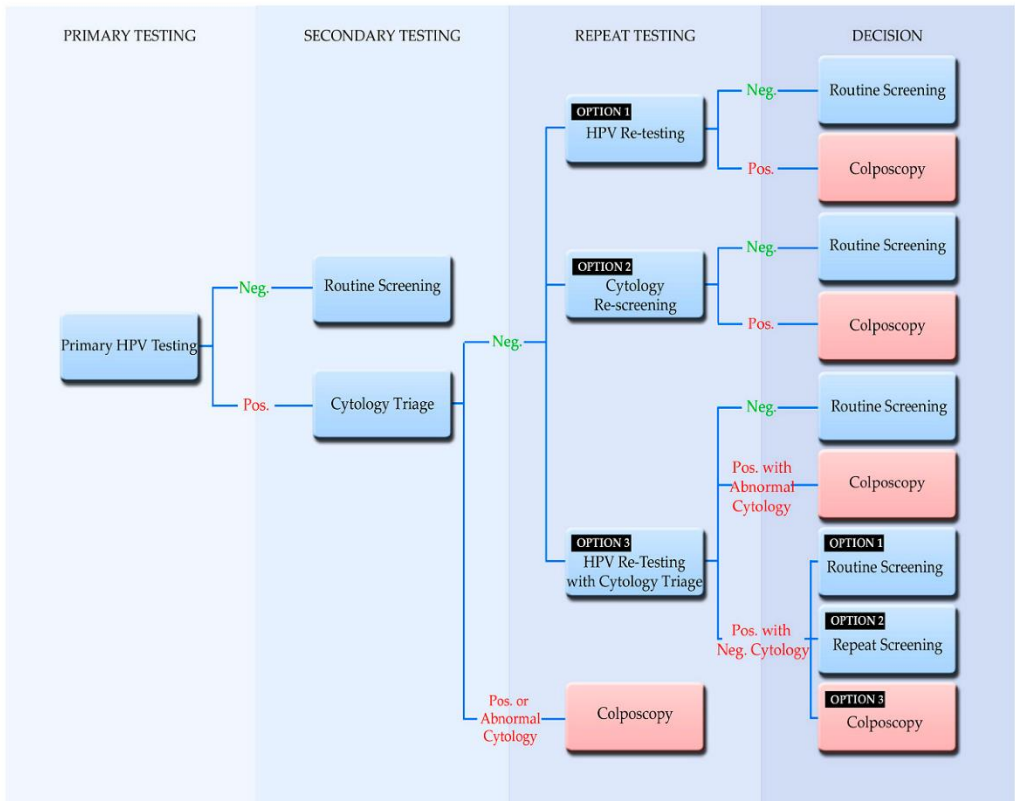
ADAT1- adenosine deaminasa, EIA- Enzyme Immunoassay, HIST2H2BE- histone H2B type 2-E, CH14- chromosom 14, PCR- polymerasová řetězová reakce, TOCE- tagging oligonucleotide cleavage and extension, RHA- reverzní hybridizační assay

1.2.4 Triážové testy

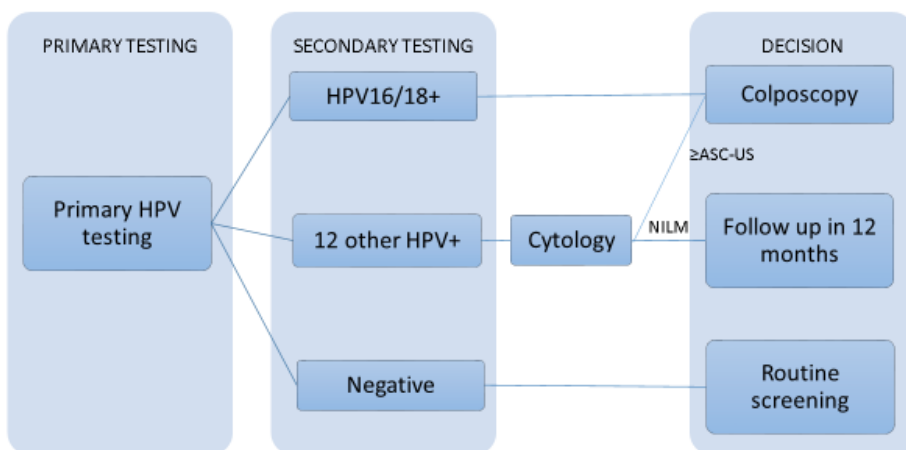
V rámci HPV screeningu jsou nezbytné triážové testy pro management HPV pozitivních žen. V případě používání kotestování (použití cytologie spolu s HPV testem) je nutná triáž pro HPV pozitivní ženy s normální cytologií. Ideální jsou triážové testy, které využívají primární screeningový vzorek a není tak třeba pacientku zvat k odběru nového vzorku (104). I když doposud nebyla nalezena optimální triážová strategie, měly by užívané triážové testy splňovat NPV 98 % pro CIN3+, tedy riziko vzniku CIN3+ u negativní pacientky v následujících 2 až 3 letech nižší než 2 %. Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) triážové strategie významně ovlivňuje počet pacientek odeslaných ke kolposkopickému vyšetření. V Holandsku jsou ke kolposkopickému vyšetření odesílány pacientky s krátkodobým rizikem CIN3+ vyšším než 20 %. V USA je hranicí pro indikaci kolposkopie 10% riziko CIN3+. Tyto parametry splňují triážové strategie založené na opakované cytologii, cytologii a HPV16/18 genotypizaci nebo opakovaná HPV detekce (118-120). Současné HPV screeningové programy využívají k triáži především cytologické vyšetření. V Holandsku je cytologické vyšetření doporučeno všem HPV pozitivním ženám, v USA pouze ženám HPV pozitivním, které jsou negativní na HPV16 a 18 (121). Obrázky 8 a 9 znázorňují schémata doporučených triážových strategií pro Evropu (94) a USA (121).

Kromě triáže zahrnující cytologické vyšetření a HPV16/18 detekci byly evaluovány strategie zahrnující analýzu HPV E7 mRNA, p16/Ki-57 duální barvení a detekci epigenetických změn v lidském nebo HPV genomu (92;122). V současné chvíli jsou komerčně dostupné kity: CINtec[®] PLUS test (Roche), QiaSure (Qiagen) a GynTec Assay (Oncngnostics).

CINtec[®] PLUS test je založený na imunohistochemické detekci p16/Ki-67. Protein p16^{INK4a} je inhibitor cyklindependetní kinas, jehož exprese je deregulovaná v důsledku nadměrné exprese E7 proteinu (obrázek 4). Ki-67 je markerem proliferace. Simultánní detekce exprese p16 a Ki-67 je známkou deregulace buněčného cyklu spojené s transformující HPV infekcí a vznikem cervikálního karcinomu. V porovnání s cytologií vykazuje duální barvení p16/Ki-67 v triáži HPV pozitivních žen významně vyšší sensitivitu (51,9 % vs. 74,9 %) a srovnatelnou specifitu (75,0 % vs. 74,1 %) pro CIN3+. Duální barvení je také citlivější (86,8 %) pro detekci CIN3+ než cytologie (78,2 %), pokud je triážový test používán pro HPV pozitivní ženy, které jsou negativní na HPV16 a 18. PPV pro CIN3+ dosahuje 18,5 % a NPV 97,4 % při použití testu k triáži všech HPV pozitivních žen. Při triáži HPV pozitivních žen, negativních na HPV16 a 18, je PPV pro CIN3+ 13,8 % a NPV 98,2 % (123).

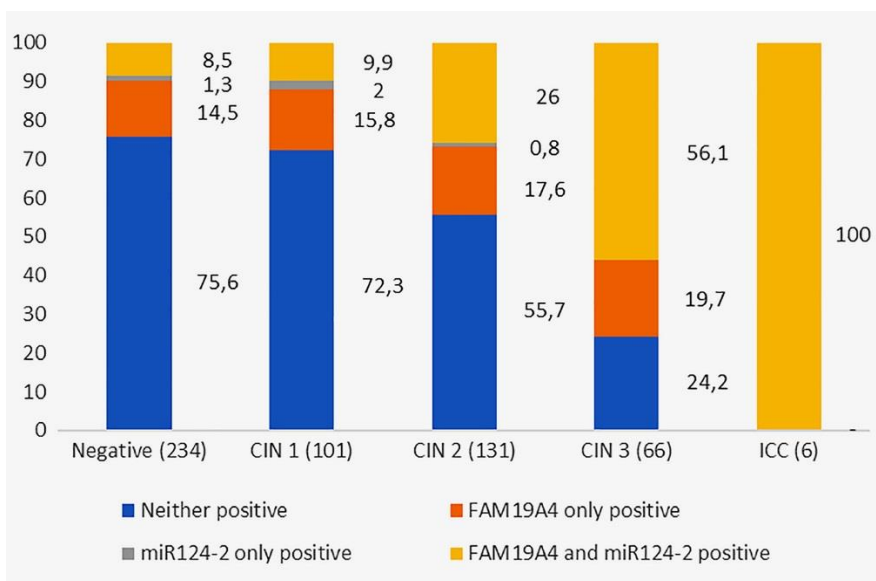


Obrázek 8 Algoritmy triážových stratégií doporučených pro cervikální screening v rámci Evropy (124) dle European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (94)



Obrázek 9 Doporučený triážový algoritmus pro USA (121) (upraveno)

Další triážové testy využívají detekce hypermetylace DNA, ke které dochází během kancerogeneze. Testy detekující hypermetylaci DNA jsou založeny na multiplex real-time metylačně-specifické PCR (qMSP). QIAure Methylation Test (Qiagen) detekuje hypermetylaci promotorů genů *FAM19A4* a *miR124-2*. Tento test vykazuje 77,8 % sensitivitu a 69,3 % specifitu pro CIN3+ (obrázek 10). PPV testu je 36,4 % a NPV dosahuje 98,3 % (obrázek 10). Nejlepších výsledků dosahovala *FAM19A4/ miR124-2* analýza v kombinaci s HPV16/18 detekcí. Kombinace těchto testů dosahovala 93,1% sensitivity, 49,4% specifity, 22,1% PPV a 97,9% NPV pro CIN3+ (125). *FAM19A4/ miR124-2* metylačně negativní pacientky mají pouze 1,7% riziko vzniku cervikálního karcinomu v následujících 14 letech v porovnání s 2,4% rizikem po negativním cytologickém nález (122). Tento test byl validován také pro vyšetření cervikovaginálních stěrů a laváží získaných samoodběrem (126).

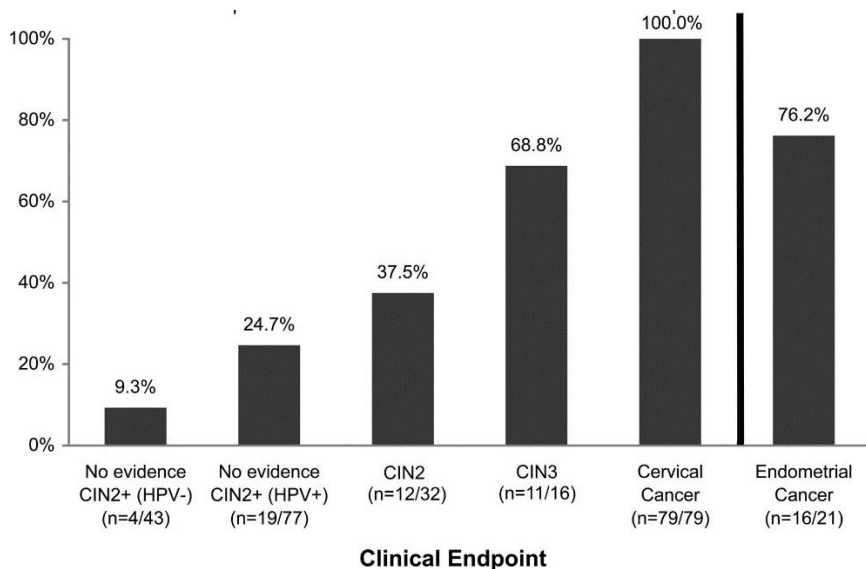


CIN1- cervikální intraepiteliální neoplasie 1. stupně, CIN2- cervikální intraepiteliální neoplasie 2. stupně, CIN3- cervikální intraepiteliální neoplasie 3. stupně, ICC- invazivní cervikální karcinom

Obrázek 10 Pozitivita (%) metylace promotorů genů *FAM19A4* a *miR124-2* v různých stádiích cervikální intraepiteliální neoplasie (125).

Test PreCurSor M-kit (Diassay) detekoval metylaci promotorů genů *CADM1* (buněčná adhezivní molekula 1), *MAL* (protein asociovaný s maturací T-lymfocytů) a *miR124-2* (*microRNA-124-2*). Tento test detekoval 100 % cervikálních nádorů a 76 % endometriálních karcinomů (obrázek 11) a byl validován pro vyšetření

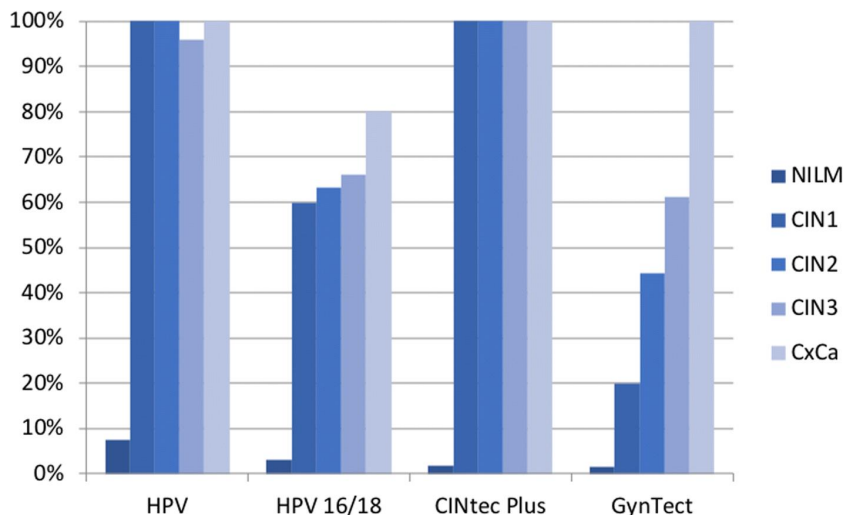
cervikovaginálních laváží získaných samoodběrem (127;128). PreCurSor M-kit se již nevyrábí.



CIN2- cervikální intraepiteliální neoplasie 2. stupně, CIN3- cervikální intraepiteliální neoplasie 3. stupně

Obrázek 11 Pozitivita metylace promotrů genů *CADM1/MAL/miR124-2* v různých stádiích cervikální intraepiteliální neoplasie a nádorů endometria (127)

GynTec Assay (Oncagnostics) detekuje hypermetylacii v oblastech genů *ASTN1* (astroaktin 1), *DLX1* (distal-less homeobox 1), *ITGA4* (podjednotka integrinu alfa 4), *RXFP3* (Relaxin/insulin like family peptide receptor 3), *SOX17* (SRY-box 1), a *ZNF671* (Zinc finger protein 671). Tento test vykazuje 96,4% senzitivitu a 82,6% specifitu pro CIN3+ (obrázek 12). PPV testu pro CIN3+ je 57,6 % a NPV dosahuje 98,9 % (129).



Obrázek 12 Porovnání pozitivitu testů v různých stádiích cervikální intraepiteliální neoplasie (129)

1.3. Souhrn kapitoly

Lidský papilomavirus (HPV) je příčinou řady nádorových onemocnění, především karcinomu cervixu. Současný screening karcinomu cervixu v České republice je založen na cytologickém vyšetření, které je v případech s abnormálním výsledkem nejistého významu doplněno HPV DNA diagnostikou. HPV detekující metody jsou nejčastěji založeny na PCR reakci s následnou genotypizací (úplnou či částečnou). Přestože má HPV DNA diagnostika vyšší sensitivitu v porovnání s cytologií, není v současné době v České republice zařazena do primárního screeningu cervikálního karcinomu. Zařazení HPV DNA testů do primárního screeningu karcinomu cervixu by významně zvýšilo jeho sensitivitu a napomohlo by tak ke snížení morbidity i mortality tohoto onemocnění v české populaci.

2. Kapitola – experimentální část

2.1. Pilotní studie pro využití samoodběrové soupravy a molekulární HPV diagnostiky pro screening karcinomu děložního čípku

2.1.1. Úvod

V současné době je celosvětově karcinom děložního čípku s 528.000 nově diagnostikovanými případy ročně 7. nejčastější nádorové onemocnění a 4. nejčastější nádorové onemocnění u žen. Každý rok na toto onemocnění zemře 266.000 žen, což odpovídá 7,5 % ze všech úmrtí žen na nádorová onemocnění. V České republice byl karcinom cervixu v roce 2011 nově diagnostikován 1023 ženám a 399 žen na toto onemocnění zemřelo. Onemocnění postihuje především ženy v produktivním věku, přibližně 50 % incidence a 30 % mortality tvoří skupina žen mladších 50 let (90;130;131).

Zavedení cytologického screeningového programu, využívajícího tzv. Pap (Papanicolaou) testu, popř. liquid-based cytology (LBC), vedlo v řadě zemí k dramatickému snížení incidence a mortality karcinomu děložního čípku (3;4). V České republice došlo během posledních 10 let k poklesu incidence karcinomu děložního hrdla o 14 % a poklesu úmrtnosti dokonce o 27 % (132). Pomocí screeningu založeného na cytologickém vyšetření se podařilo především snížit incidenci spinocelulárního karcinomu cervixu, který představuje až 85 % všech cervikálních karcinomů. Incidenci adenokarcinomu, vzhledem k jeho lokalizaci, screening významně neovlivnil (133;134). Pravidelným preventivním cytologickým vyšetřením (každých 12 měsíců) lze docílit negativní prediktivní hodnoty 99,3 % a pozitivní prediktivní hodnoty 37,5 % (119).

Zásadním problémem screeningového programu zůstává nízké pokrytí cílové populace žen (v ČR 55 % žen ve věku 25 – 59 let). Ženy, které preventivní vyšetření nepodstupují (45 %), se podílejí 50 procenty na diagnostikovaném karcinomu děložního hrdla (5;135). Přestože cytologický screening dosahuje specifity 96,3 %, jeho nevýhodou je nízká senzitivita (53,0 %) a značná subjektivita interpretace, vyžadující striktní kontrolu kvality cytologických laboratoří (132).

Pro vznik přednádorových i nádorových změn na děložním čípku je nezbytná infekce vysoce rizikovým genotypem HPV (hrHPV, jedná se o subtypy/genotypy HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 66) (7;136). HPV16 a HPV18 jsou genotypy s největším onkogenním potenciálem, způsobující až 70 % spinocelulárního karcinomu cervixu a více než 90 % adenokarcinomů cervixu

(137;138). Nespornou výhodou hrHPV diagnostiky je také nízké riziko (< 2%) rozvoje CIN3+ pro hrHPV negativní ženy v následujících 5 let (93).

Ačkoliv řada studií prokázala vyšší senzitivitu (přibližně o 30 %) a nepatrně nižší specifitu (přibližně o 4 %) hrHPV diagnostiky pro detekci CIN2+ než cytologie a tím lepší ochranu proti cervikálnímu karcinomu, zůstává morfologické vyšetření cervikální cytologie nejpoužívanější metodou cervikálního screeningu (3;88;93;132;139).

Pro dosažení optimální ochrany žen před vznikem karcinomu děložního čípku je nezbytné se zaměřit na nejvíce rizikovou skupinu žen, a to ženy, které se screeningového programu neúčastní. Jednou možností je adresné zvaní těchto žen k návštěvě gynekologa s následným hodnocením cytologie. Projekt adresného zvaní byl v České republice zavedený začátkem roku 2014. I přes mediální kampaň však zvýšil projekt adresného zvaní účast na cervikálním screeningovém programu pouze o 8,1 %. Navýšení je nižší než v jiných evropských zemích, kde se účast zvýšila průměrně o 15,2 % (v jednotlivých studiích 4,5 - 26,2 %) (6;140). Řada studií naopak ukázala, že tyto ženy preferují možnost samoodběru. Nabídnutí samoodběrové sady ženám, které nechtějí navštívit gynekologa za účelem screeningu, vedlo k vyššímu procentu vyšetřených žen. Až 39,1 % žen, které nenavštěvovaly screeningový program, odeslalo vzorek odebraný samoodběrem na hrHPV testování, zatímco opětovné adresné zvaní přesvědčilo v jednotlivých studiích jen 9,1 – 35,5 % žen (7). Navíc 89 % žen, jejichž samoodběr byl hrHPV pozitivní, následně navštívilo svého gynekologa a podstoupilo cytologické vyšetření, případně nový HPV test (141;142). Z publikovaných studií tedy vyplývá, že by zaslání samoodběrové sady ženám, nenavštěvujícím screening, mohlo výrazně zvýšit záchyt přednádorových a nádorových změn i v České republice a přinejmenším skupinu hrHPV pozitivních žen pak přivést do gynekologických ambulancí. O plošném zasílání samoodběrových sad se v ČR zatím neuvažuje, cíleně je nabízí Nadace pro výzkum rakoviny Česká republika (<https://www.vyzkumrakoviny.cz/>). Možnost HPV vyšetření vzorku získaného samoodběrem je nabízena ženám nenavštěvujícím cervikální screening v Holandsku a Austrálii (104).

Cílem této pilotní studie bylo ověřit potenciál samoodběru v kombinaci s molekulárním vyšetřením na HPV pro zvýšení účasti českých žen ve screeningovém programu karcinomu děložního hrdla. Výsledky tohoto projektu byly publikovány v časopise Česká gynekologie (143).

2.1.2. Pacienti a metody

Ženám ve věku 19-75 let, které projeví zájem znát svůj HPV status a objednaly si HPV test prostřednictvím internetových stránek <http://www.vecverejna-cz.eu/> (v současnosti <https://www.vyzkumrakoviny.cz/>), byly rozeslány poštou samoodběrové sady Evalyn® Brush (Rovers Medical Devices B.V., Oss, Holandsko), které byly po odběru doručeny poštou na Ústav molekulární a translační medicíny LF UP k další analýze. Pilotní skupině 60 žen byl společně se samoodběrovou sadou zaslán dotazník zaměřený na jejich zkušenost a spokojenost s tímto typem odběru. U analyzované skupiny žen nejsou známy sociologické údaje ani informace o zdravotním stavu. Všechny ženy zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii. Výzkumný projekt byl schválen etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc.

Odebrané vzorky byly skladovány nasucho až do doručení do laboratoře, kde byly fixovány v cobas® PCR Cell Collection médiu (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Všechny vzorky byly analyzovány na přítomnost HPV16/18 a dalších 12 hrHPV systémem cobas® 4800 HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Detekce HPV DNA pomocí cobas 4800 HPV Test (dále jen "cobas® 4800") je založena na real-time PCR na přístroji cobas z 480, které předchází automatizovaná izolace DNA na přístroji cobas x 480 (144). Genotypizace HPV byla provedena systémem PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Německo), který detekuje 18 hrHPV a 6 nízkorizikových HPV (IrrHPV, tabulka 3). PapilloCheck® HPV-Screening systém (dále jen "PapilloCheck®") je založen na amplifikaci cílové sekvence virové DNA PCR reakcí s následným fluorescenčním značením a hybridizací na microarray. Zpracování a vyhodnocení microarray probíhá automaticky za pomoci CheckScanner™ a CheckReport™ Software (145). Rozdělení HPV genotypů na hrHPV a IrrHPV bylo zachováno dle klasifikace výrobců použitých detekčních metod. V případě neshody výsledků systému cobas® 4800 a PapilloCheck® jsme k potvrzení HPV statusu použili LMNX genotyping kit HPV GP (Diassay, Rijswijk, Holandsko; dále jen "LMNX"). Principem testu je amplifikace cílové sekvence virové DNA pomocí biotinylovaných GP5+/6+ primerů a následná hybridizace na sondy specifické pro jednotlivé genotypy, které jsou nanesené na částicích značených odlišnými fluorofory (RHA – Reverse Hybridisation Assay). Zpracování a vyhodnocení vzorků je plně automatizováno na přístroji společnosti Luminex (116). Ke všem testům jsme použili DNA připravenou automatem cobas x 480. Výsledky byly následně statisticky zpracovány pomocí software R a Microsoft Excel.

Tabulka 3. Srovnání základních charakteristik použitých detekčních metod. HrHPV podtypy detekované všemi 3 detekčními metodami jsou označeny tučným písmem (143)

| | cobas® 4800 HPV | PapilloCheck® HPV-Screening | LMNX Genotyping Kit HPV GP |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Výrobce | Roche | Greiner Bio-One | Diassay |
| Certifikace | CE-IVD | CE-IVD | CE-IVD |
| Princip testu | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | PCR, fluorescenční značení a hybridizace na microarray | PCR s biotinylovanými GP5+/6+ primery, RHA |
| Detekovaný HPV gen | <i>L1</i> (200 bp) | <i>E2</i> (350 bp) | <i>L1</i> (150 bp) |
| Interní kontrola kvality DNA | β-globin | <i>ADAT1</i> | CH14 |
| Detekované HPV genotypy | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | 18 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) + 6 lrHPV (6, 11, 40, 42, 43, 44/55) | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) |

ADAT1- adenosine deaminasa; CE-IVD- Conformité Européenne, In Vitro Diagnostics; CH14- chromosom 14; hrHPV- vysoce rizikové lidské papilomaviry; lrHPV- níže rizikové lidské papilomaviry; PCR- polymerázová řetězová reakce; RHA- reverzní hybridizační assay.

2.1.3. Výsledky

Výsledky HPV testování

Na začátku studie bylo poštou rozesláno 215 samoodběrových sad Evalyn Brush, z nichž bylo k analýze doručeno 174 (81 %) samoodběrem získaných cervikovaginálních stěrů. U všech vyšetřovaných vzorků poskytl samoodběr dostatečné množství buněk potřebných pro vyšetření systémem cobas (amplifikace vnitřní kontroly), žádné vyšetření nebylo nutné z technických důvodů opakovat. Systémem PapilloCheck® HPV-Screening nebylo možné vyšetřit 2 % (3 ze 174) vzorků (opakované selhání amplifikace vnitřní kontroly). Tyto vzorky byly stejně jako vzorky,

u nichž se výsledky testu systémem cobas® 4800 a PapilloCheck® neshodovaly ve výsledku (7%; 12 ze 174), následně vyšetřeny pomocí LMNX genotyping kit HPV GP (tabulka 4.).

Tabulka 4. Výsledky HPV analýzy vzorků, u nichž se výsledky testu systémem cobas® 4800 a PapilloCheck® neshodovaly nebo analýza PapilloCheck® selhala (143).

| číslo vzorku | cobas® 4800 HPV | PapilloCheck® HPV-Screening | LMNX Genotyping Kit HPV GP | Konsensuální HPV výsledky |
|--------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1 | Negativní | HPV56, 53, 42 | Negativní | HPV56, 53, 42 |
| 2 | HPV16 | HPV42 | Negativní | HPV16, 42 |
| 3 | HPV16 | HPV42 | Negativní | HPV16, 42 |
| 4 | HPV16+ další HPV | HPV68 | Negativní | HPV16, 68 |
| 5 | HPV16+ další HPV | Negativní | HPV39 | HPV16, 39 |
| 6 | HPV16+ další HPV | HPV39, 66, 6 | HPV39, 66 | HPV16, 39, 66, 6 |
| 7 | Další HPV | Negativní | HPV45 | HPV45 |
| 8 | Další HPV | HPV40 | HPV58 | HPV58, 40 |
| 9 | Další HPV | HPV40 | Negativní | Další HPV+HPV40 |
| 10 | Další HPV | HPV53 | HPV53, 58 | HPV53, 58 |
| 11 | Další HPV | HPV44/55 | HPV45 | HPV45, 44/55 |
| 12 | Další HPV | Negativní | HPV56 | HPV56 |
| 13 | Negativní | Test selhal | Negativní | Negativní |
| 14 | Negativní | Test selhal | Negativní | Negativní |
| 15 | Další HPV | Test selhal | HPV58 | HPV58 |

Další HPV+ zahrnuje HPV31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68. Přítomnost HPV53, 70, 73, 82 a IrHPV (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44/55) byla vyhodnocena pouze na základě analýzy systémem PapilloCheck®.

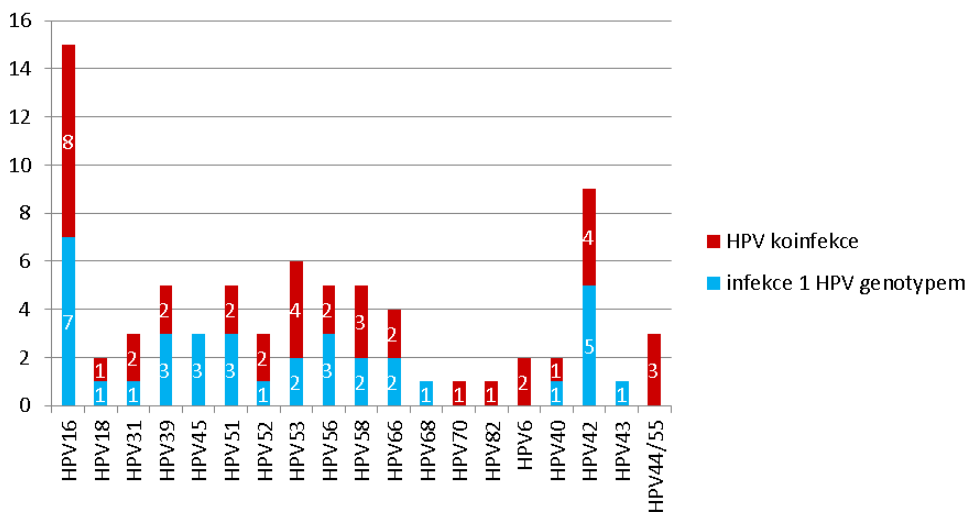
Z analyzovaných 174 cervikovaginálních stěrů bylo 125 (72 %) HPV negativních, u 4 vzorků (2 %) byla detekována přítomnost pouze IrHPV infekce a 45 vzorků (26 %) bylo hrHPV pozitivních. Nejčastěji detekovaným genotypem byl HPV16 (15 ze 45; 33 %). Přítomnost dalších genotypů je zobrazena na obrázku 13. Ve 13 případech byla detekována současná infekce několika hrHPV, v šesti z nich byla nalezena současně infekce IrHPV (tabulka 5). HrHPV pozitivních ženy byly v mediánu o 4 roky mladší než hrHPV negativní (medián 34 vs. 38, $P = 0,011$). S rostoucím věkem počet hrHPV pozitivních žen nesignifikantně klesal ($P = 0,013$).

Tabulka 5. Detekované HPV koinfekce u 20 ze 49 HPV pozitivních vzorků (143).

| Koinfekce více hrHPV genotypy (číslo vzorku) | Detekované genotypy | Koinfekce více hrHPV a lrHPV (číslo vzorku) | Detekované genotypy | Koinfekce hrHPV a lrHPV (číslo vzorku) | Detekované genotypy |
|---|---------------------|--|---------------------|---|---------------------|
| 1, 2 | HPV16, 39 | 8, 9 | HPV16, 42 | 15 | HPV16, 18, 53, 42 |
| 3 | HPV16, 31, 51 | 10 | HPV45, 44/55 | 16 | HPV16, 39, 66, 6 |
| 4 | HPV16, 56 | 11 | HPV52, 6 | 17 | HPV31, 51, 42 |
| 5 | HPV18, 68 | 12 | HPV58, 40 | 18 | HPV39, 66, 44/55 |
| 6 | HPV52, 53 | 13 | HPV58, 44/55 | 19 | HPV56, 53, 42 |
| 7 | HPV53, 58 | 14 | další HPV, HPV40 | 20 | HPV82, 70, 42 |

hrHPV genotypy HPV16, 18, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 jsou v tabulce vyznačeny tučným písmem
lrHPV genotypy HPV6, 11, 40, 42, 43, 44/55

Obrázek 13. Zastoupení jednotlivých HPV genotypů u 49 HPV pozitivních vzorků (modře- počet případů infekce 1 HPV genotypem, červeně- počet případů HPV koinfekce) (143)

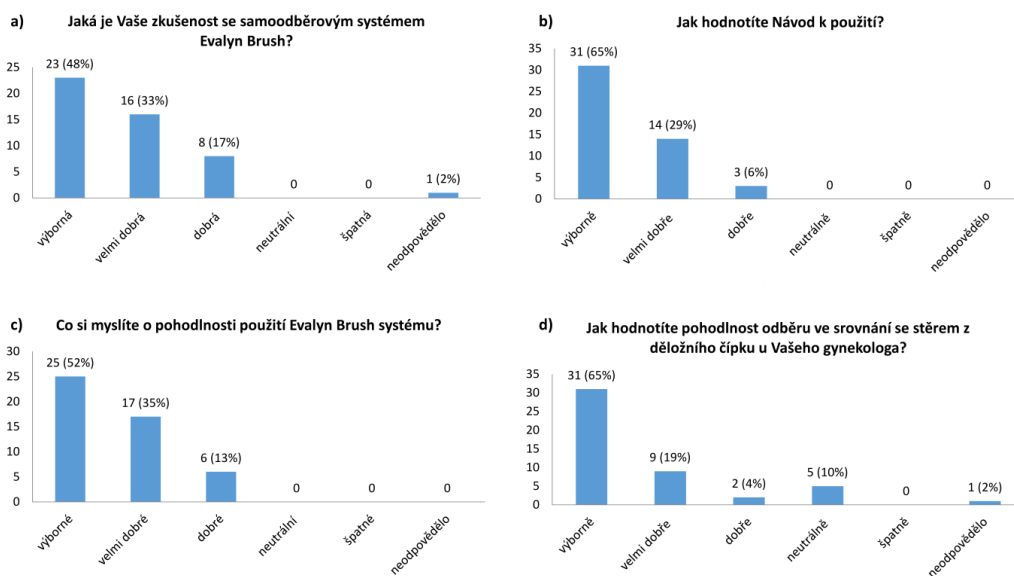


hrHPV genotypy HPV16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82
lrHPV genotypy HPV6, 11, 40, 42, 43, 44/55

Hodnocení spokojenosti se samoodběrovou sadou

Z 60 odeslaných dotazníků bylo zasláno zpět 48 (80 %) vyplněných formulářů. Výsledky dotazníkového šetření jsou znázorněny na obrázku 14. Svou zkušenost se samoodběrovou sadou ohodnotilo jako dobrou až výbornou 47 ze 48 (98 %) dotázaných žen. Návod k použití byl považován za dobrý až vynikající všemi ženami (100 %). Všechny ženy také ohodnotily pohodlnost použití samoodběrové sady jako dobrou až vynikající. Většina žen (42 ze 48; 88 %) dává přednost samoodběru před odběrem vzorku lékařem, pouze 10 % (5 ze 48) hodnotí samoodběr a odběr lékařem stejně.

Obrázek 14. Výsledky dotazníkového šetření (143).



a) Hodnocení zkušenosti žen se samoodběrovou sadou **b)** Hodnocení návodu k použití **c)** Hodnocení pohodlnosti použití samoodběrové sady **d)** Hodnocení pohodlnosti samoodběru ve srovnání s odběrem vzorku u gynekologa

2.1.4. Diskuze

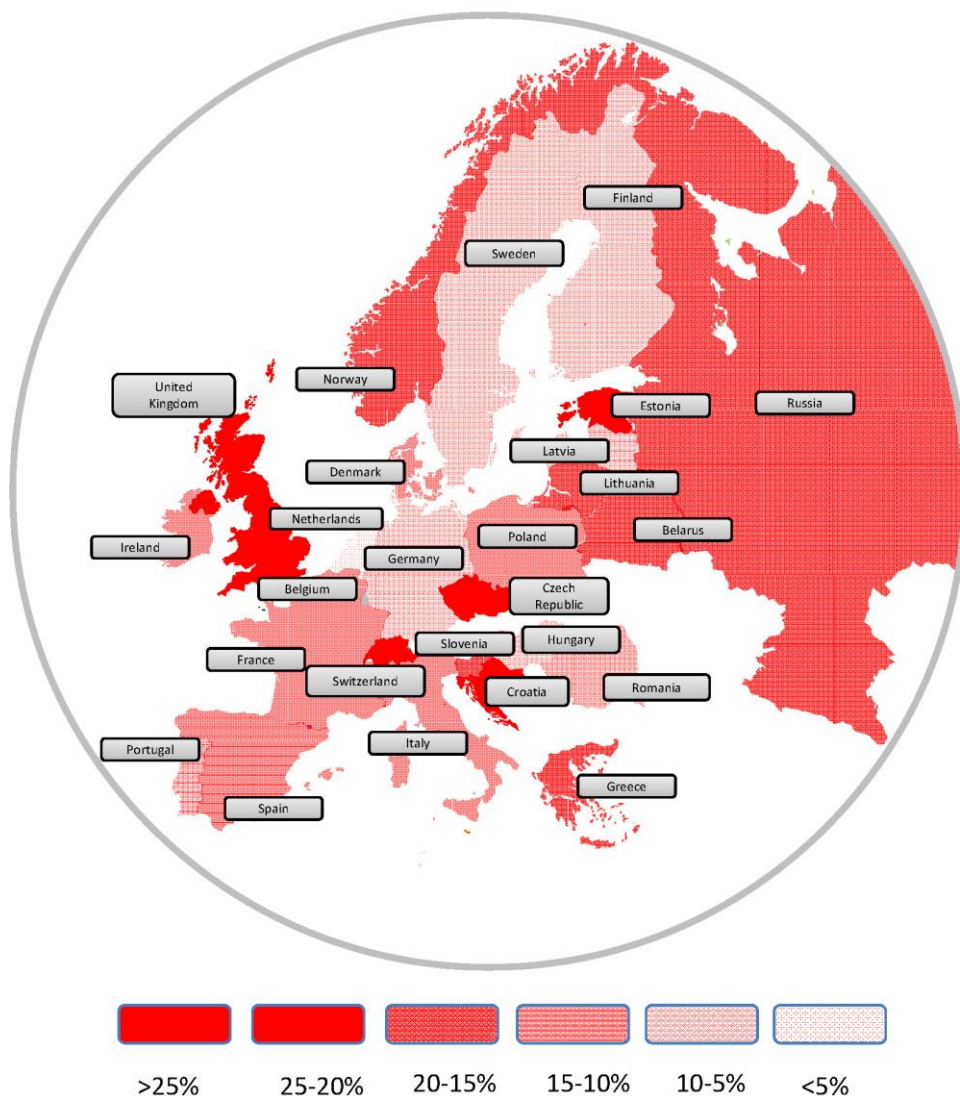
Získání validního výsledku při testu systémem cobas® 4800 u všech 174 analyzovaných vzorků potvrzuje, že množství a kvalita odebraného materiálu samoodběrovou sadou jsou pro hrHPV vyšetření dostatečné.

Ve studované skupině vzorků jsme detekovali hrHPV DNA u 24 % vzorků, což je více než dvakrát vyšší hodnota než uvádějí nejrozsáhlejší studie žen (n = 27.792 a n = 26.145), které nenavštěvují cervikální screening (10 % a 8 %) (141;142). Naopak podobně vysoké zastoupení (27,4 %) hrHPV pozitivních žen bylo pozorováno

ve studiích zaměřených na ženy se zvýšeným rizikem hrHPV infekce (ženy s cervikální dysplasií, HIV pozitivní ženy a pacientky kolposkopických klinik) (146). Náš vysoký záchyt hrHPV může být způsoben nereprezentativností výběru. Větší zájem zjistit svůj HPV status pomocí samoodběru mohou mít ženy, které již trpí HPV asociovaným onemocněním nebo z jiných důvodů spadají do skupiny se zvýšeným rizikem HPV infekce.

Nicméně, celkově vysoké procento HPV pozitivních vzorků je v souladu s českou studií Tachezy *et al.*, 2013 (147) a ukazuje na mimořádně vysokou prevalenci hrHPV v populaci českých žen ve srovnání s jinými evropskými zeměmi (Obrázek 15).

Obrázek 15. Prevalence výskytu HPV v Evropě - vážený průměr 121 studií publikovaných v letech 1996 -2014, kumulativně sesbíraných ve studii Bruni *et al.*, 2015 (143;148).



Možnost samoodběru cervikovaginálního stěru pro HPV test byla ženami velmi dobře přijata. Ženy ocenily především pohodlnost a jednoduchost použití sady. Většina dotázaných žen upřednostnila samoodběr před odběrem vzorku lékařem. Pouze 2 dotazované ženy (2 ze 48; 4%) by po vyzkoušení samoodběru upřednostnily odběr cervikálního stěru gynekologem. Výsledky naší analýzy skupiny českých žen jsou v rozporu se studií van Baars *et al.* z roku 2012 (96). Nizozemské ženy nejčastěji

upřednostňovaly odběr vzorku lékařem, protože se jim zdá spolehlivější a nemusí mít obavy z nesprávně provedeného odběru. Pozorovaný rozdíl lze vysvětlit například podstatně menším počtem jedinců v našem souboru, potenciálně i různým přístupem lékařů k pacientce nebo selekcí aktivnější skupiny žen v našem souboru. Získané výsledky se nicméně shodují s daty ze stejné studie, která také sledovala spokojenost žen se samoodběrem pomocí Evalyn® Brush (96).

U vzorků odebraných lékařem a samoodběrem je podle literatury dosahována vysoká míra shody v detekci hrHPV (pro Evalyn® Brush 86,6 %) (96;146). Naše studie svým designem neumožňuje shodu mezi samoodběrem a odběrem provedeným gynekologem zhodnotit, nicméně můžeme potvrdit excelentní vyšetřitelnost všech odebraných vzorků, což svědčí o spolehlivosti provedeného samoodběru.

Přes pozitivní výsledky naší pilotní studie nemůžeme své nálezy generalizovat a kvantifikovat potenciální přínos samoodběru ke screeningu karcinomu cervixu v našich podmínkách. Abychom byli schopni odhadnout, jaký efekt by měla možnost samoodběru, bylo by nezbytné cíleně zaslat samoodběrovou sadu skupině žen, které se screeningu neúčastní, případně nereagovaly ani na adresné vyzvání k preventivnímu vyšetření. Provedení takové studie a případná implementace samoodběru do screeningového algoritmu v České republice může být jednou z efektivních cest jak snížit výskyt tohoto onemocnění v populaci.

2.1.5. Závěr

Samoodběr cervikovaginálního stěru umožňuje získat validní výsledky HPV genotypizace. Samoodběrový kit Evalyn® Brush byl českými ženami dobře přijat (návratnost testu k analýze činila 81 %; ženy byly s odběrem spokojeny). Kombinace samoodběru s hrHPV diagnostikou pro ženy, které se zatím screeningu neúčastní, by mohla vést ke zvýšení pokrytí cílové populace a záchytu časných stádií cervikálního karcinomu.

2.1.6. Podíl autora dizertační práce na daném tématu

Uvedená studie je publikována v časopise Česká Gynekologie pod názvem „Pilotní studie pro využití samoodběrové soupravy a molekulární diagnostiky HPV infekce pro skrínink karcinomu děložního čípku“ (143) (příloha 2). Autorka se podílela na designu, koordinaci studie a provedla samostatně všechna HPV vyšetření. Zpracovala výsledky a následně rukopis studie.

2.2. Srovnání metod detekce HPV DNA cobas® 4800 HPV, PapilloCheck® HPV – Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP v cervikálních a cervikovaginálních stěrech

2.3.1. Úvod

Perzistentní hrHPV infekce je příčinou cervikálních nádorů a CIN2+ lézí (149;150). V rámci prevence vzniku invazivního cervikálního karcinomu a mortality cervikálního karcinomu je prokazatelně efektivnější cervikální screening založený na detekci HPV než screening založený na cytologickém vyšetření (93). Několik evropských randomizovaných studií prokázalo nižší kumulativní incidenci cervikálního karcinomu u žen 5 let po HPV negativním testu než 3 roky po negativním cytologickém vyšetření (86;87;89;90).

Validované HPV testy a HPV testy certifikované Conformité Européenne, *In Vitro* Diagnostics (CE-IVD) obvykle detekují 14 hrHPV genotypů (102). Tyto genotypy byly Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (the International Agency for Research on Cancer; IARC) klasifikovány jako kancerogenní (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 59), pravděpodobně kancerogenní (HPV68) a potenciálně kancerogenní (HPV66) (150).

Velká část komerčně dostupných kitů detekuje klastř hrHPV genotypů nebo umožňuje parciální genotypizaci. Pouze několik testů umožňuje kompletní genotypizaci detekovaných HPV genotypů (102). Výhodou parciální genotypizace je specifická detekce genotypů HPV16 a HPV18, které představují vyšší riziko pro vznik cervikálního karcinomu než infekce dalšími hrHPV genotypy (12;151). Genotypizace dalších hrHPV (vyjma HPV16 a HPV18) je výhodná pro identifikaci perzistentní infekce určitým hrHPV genotypem, pro follow-up HPV pozitivních žen a detekci residuálních nebo rekurentních pokročilých cervikálních lézí (152;153).

V rámci tohoto projektu jsme porovnávali tři CE-IVD certifikované metody: cobas®4800 HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo; dále jen "cobas®4800"), PapilloCheck® HPV- Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Německo; dále pouze "PapilloCheck®") a LMNX Genotyping Kit HPV GP (Diassay, Rijswijk, Holandsko; dále pouze "LMNX"). Cobas® 4800 (110;111) and PapilloCheck® (115) jsou plně validované dle Meijerova protokolu, který ustanovuje podmínky, které by měly splňovat HPV detekční metody vhodné pro primární screening cervikálního karcinomu (viz HPV detekční testy validované pro primární cervikální screening; str. 22) (101). Metoda LMNX je pouze částečně validována dle Meijerova protokolu. LMNX splňuje kritéria pro klinickou přesnost na základě porovnání

se standardními porovnávacími testy, ale doposud nebyla publikována studie prokazující jeho dostatečnou reprodučibilitu (116).

Jako jedna z perspektivních možností pro zvýšení účasti žen ve screeningovém programu se jeví nabídnutí samoodběrových sad ženám, které se screeningu neúčastní (142;154). Právě proto jsme se rozhodli v rámci studie otestovat diagnostické systémy také na vzorcích získaných samoodběrem, i když jsme k těmto vzorkům neměli párový vzorek odebraný gynekologem.

Cílem této studie bylo porovnání detekce HPV16, 18 a skupiny dalších 12 hrHPV genotypů pomocí cobasu® 4800, PapilloChecku® a LMNX. Výsledky této studie byly publikovány v časopise Journal of Molecular Diagnostics (155).

2.3.2. Materiál a metody

Klinické vzorky

Do této studie bylo zařazeno 1.374 vzorků odebraných českým ženám ve věku 17-72 let (medián 33,7 let), bez ohledu na jejich histologický a histopatologický status. 1.198 cervikálních stěrů bylo odebráno gynekology v kolposkopických ambulancích (302 vzorků) nebo na IVF klinikách (896 vzorků). Každý vzorek byl po odebrání ponořen do cobas® PCR Cell Collection Media (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Všechny vzorky byly skladovány a transportovány při pokojové teplotě.

Za použití samoodběrové sady Evalyn Brush (Rovers Medical Devices B.V., Oss, Holandsko) bylo odebráno 176 cervikovaginálních stěrů. Samoodběry byly získány díky preventivnímu programu proti karcinomu děložního čípku, který byl organizovaný nadací Rakovina věc veřejná – nadace pro výzkum rakoviny (www.vecverejna.cz, v současnosti Nadace pro výzkum rakoviny Česká republika; <https://www.vyzkumrakoviny.cz/>). Po odebrání vzorku byla samoodběrová sada uzavřena víčkem, vrácena do původního obalu a odeslána poštou k HPV vyšetření. Každý Evalyn brush byl po zaslání do laboratoře ponořen do cobas® PCR Cell Collection Media. Všechny vzorky byly skladovány a transportovány při pokojové teplotě. Medián doby mezi odebráním vzorku a jeho doručením do laboratoře byly 3 dny. Cervikální a cervikovaginální stěry nebyly sbírány paralelně od shodné skupiny žen.

Příprava vzorků

Všechny vzorky byly odebrány do stabilizačního média cobas® PCR Cell Collection Media doporučeného pro cobas® 4800 HPV Test. Pro PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP je výrobcem doporučeno použít stabilizační médium PreservCyt transport medium (Hologic Inc., Marlborough, USA).

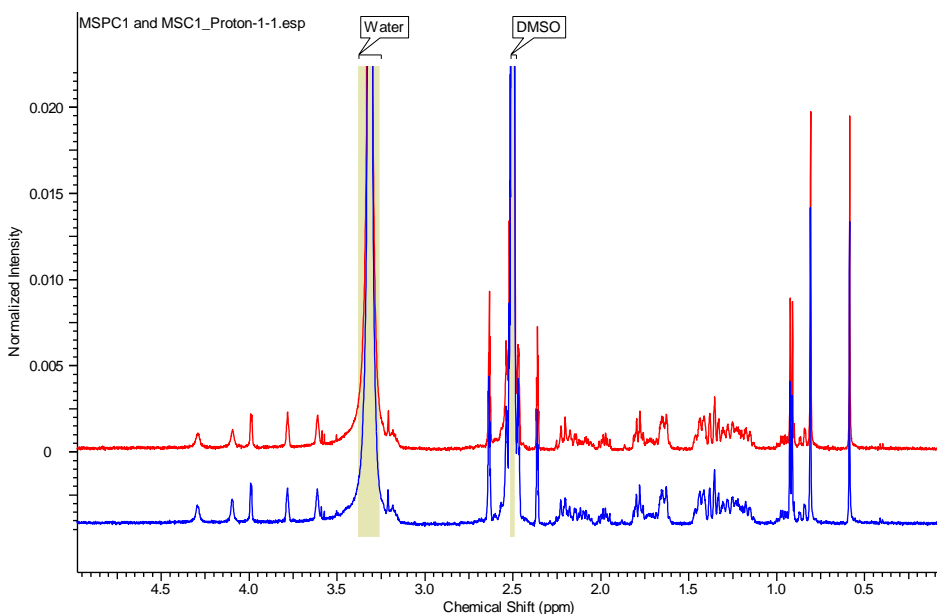
Protože výrobci těchto dvou médií neuvádí jejich složení, provedli jsme podrobnou chemickou analýzu. Obě média jsou z 55,4 % nebo 57,5 % tvořena pufovaným roztokem metanolu bez významných rozdílů v dalším složení, jak potvrdila elementární analýza a nukleární magnetická rezonance (Tabulka 7 a Obrázek 16).

Tabulka 7. Výsledky analýzy obsahu organických rozpouštědel a elementárních složek médií cobas® PCR Cell Collection media and PreservCyt transport media (155)

| Analyt [jednotka] | PreservCyt | cobas® PCR Cell Collection media |
|-------------------|------------|----------------------------------|
| methanol* | 57.5% | 54.4% |
| Mg [mg/l]† | < 1.0 | 1.485 |
| Cu [ug/l]† | < 1.0 | < 1.0 |
| Zn [ug/l]† | 324.3 | 324.25 |
| Na [mmol/l]‡ | 10.25 | 10.5 |
| K [mmol/l]‡ | 0.173 | 0.163 |
| Cl [mmol/l]‡ | 6.75 | 6.5 |
| PI [mmol/l]§. | < 1.0 | < 1.0 |

Analyty byly měřené pomocí Ramanovy spektroskopie*, plamenové atomové absorpční spektroskopie†, iontově selektivní elektrody‡ a atomové absorpční spektroskopie§.

Uvedené hodnoty jsou průměrné hodnoty čtyř opakovaných měření.



Obrázek 16. Porovnání složení cobas® PCR Cell Collection Media (modrá) a PreservCyt transport medium (červená) pomocí ¹H nukleární magnetické rezonance (155).

Pro všechny tři HPV DNA detekční metody byla použita DNA izolovaná pomocí cobas x 480. Pro PapilloCheck® je výrobcem doporučena izolace DNA pomocí oCheck DNA extraction kit (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Německo) a pro LMNX je doporučeno použít DNA izolovanou pomocí QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Hilden, Německo). Použití DNA izolované pomocí cobas x 480 bylo pro metody PapilloCheck® a LMNX validováno dle normy ISO 18189. K validaci jsme použili soubor 193 cervikálních stěrů odebraných v průběhu roku 2012. V rámci validace systému PapilloCheck® byly porovnány výsledky 49 HPV pozitivních a 50 HPV negativních vzorků izolovaných paralelně pomocí cobas x480 a oCheck DNA extraction kit. Pro validaci systému LMNX bylo použito 46 HPV pozitivních a 48 HPV negativních vzorků izolovaných paralelně cobas x480 a pomocí DNA Micro kitu (tabulka 8).

Tabulka 8. Validační studie: Porovnání výsledků HPV detekčních metod PapilloCheck® a LMNX při použití metody izolace DNA doporučené výrobcem a DNA izolované pomocí cobas x 480 (155)

| HPV detekční metoda | PapilloCheck® | | LMNX | | |
|---------------------|--------------------|---------------------------|----------------------|-------------|------|
| | Metoda izolace DNA | oCheck DNA extraction kit | QIAamp DNA Micro kit | cobas x 480 | |
| True positive | | 48 | 49 | 40 | 46 |
| False positive | | 2 | 0 | 0 | 0 |
| True negative | | 48 | 50 | 48 | 48 |
| False negative | | 1 | 0 | 6 | 0 |
| Total | | 99 | 99 | 94 | 94 |
| Sensitivita | | 0,98 | 1,00 | 0,87 | 1,00 |
| Specifická | | 0,96 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Přesnost | | 0,97 | 1,00 | 0,936 | 1,00 |

Byla analyzována pouze pozitivita na HPV16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 genotypy.

Detekce HPV DNA

Celý soubor vzorků byl testován na přítomnost HPV DNA pomocí cobas® 4800 HPV Test za dodržení postupu doporučeného výrobcem kitu (tabulka 9). Všechny vzorky byly také testovány kitem PapilloCheck® HPV-Screening, kromě metody izolace DNA (viz výše) byly dodrženy postupy doporučené výrobcem. LMNX Genotyping Kit HPV GP byl z důvodu vysokého počtu případů, u nichž se nepodařilo získat validní výsledek, použit pouze k testování 337 vzorků. Kromě metody izolace

DNA byly dodrženy postupy doporučené výrobcem kitu LMNX Genotyping Kit HPV GP. DNA izolovaná pomocí cobas x 480 měla nižší koncentraci a kvalitu (hodnocenou pomocí poměru 260/280) než DNA izolovaná pomocí DNA Micro kit nebo oCheck DNA extraction kit, což vedlo k selhání detekce HPV metodou PapilloCheck® a LMNX. Analýza vzorku DNA připraveného metodou izolace doporučenou výrobcem vedla ke snížení failure rate z 0,44 % na 0 % u metody PapilloCheck® a z 11,1 % na 1,59 % u metody LMNX. Z důvodu vysoké míry chybovosti byl LMNX dále používán pouze k potvrzení výsledku u 42 vzorků, u nichž se výsledky metody cobas® 4800 a PapilloCheck® neshodovaly.

Tabulka 9. Srovnání základních charakteristik použitých HPV DNA testů (155)

| | cobas® 4800 HPV Test | PapilloCheck® HPV-Screening | LMNX Genotyping Kit HPV GP |
|--|--|---|--|
| Výrobce | Roche | Greiner Bio-One | Diassay |
| Princip testu | multiplex real-time PCR, fluorimetrická detekce | PCR, fluorescenční značení, hybridizace na čip | PCR s biotinylovanými GP5+/6+ primery, RHA |
| Analyzované geny (velikost PCR produktu) | <i>L1</i> (200 bp) | <i>E1</i> (350 bp) | <i>L1</i> (150 bp) |
| Interní kontrola | <i>β-globin</i> | <i>ADAT1</i> | Fragment lidské DNA lokalizovaný na chromosomu 14 |
| Detekované genotypy | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | 18 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) + 6 lrHPV (6, 11, 40, 42, 43, 44/55) | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) |
| Forma výsledku | Parciální genotypizace (HPV16, HPV18, další HPV) | Úplná genotypizace | Úplná genotypizace |
| Limit detekce* (HPV16;HPV18) | 300-600 kopií/ml [†] ; 600 kopií/ml [†] | 50 kopií/reakce; 300 kopií/reakce | 10-100 kopií/reakce; 10-100 kopií/reakce |
| Množství vkládané DNA | 25 µl | 5 µl | 10 µl |
| Automatizace (včetně izolace DNA) | ano | ne | ne |
| Časová náročnost testu/časová náročnost na práci technika | 4 h/0,5 h | 4,25 h/1 h | 4 h/1,25 h |
| Cena za vzorek | 7 euro | 11 euro | 29 euro |
| Potřebné speciální vybavení | Cobas x 480 (automatický izolátor DNA); Cobas z 480 (real-time PCR analyzátor) | PCR cycler; CheckScanner; CheckReport™ software | PCR cycler, Luminex 100/200 |

Tučně vyznačené genotypy detekují všechny tři analyzované metody.

*Limit detekce uvedený výrobcem daného kitu.

[†]na ml původního vzorku

ADAT1-adenosine deaminasa 1; lrHPV-nízce rizikové HPV; hrHPV- vysoce rizikové HPV; PCR-polymerasová řetězová reakce, RHA reversní hybridizace

Každá z detekčních metod detekuje odlišné spektrum HPV genotypů, proto bylo analyzováno pouze 14 HPV genotypů (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) detekovaných všemi třemi metodami. Pouze dva vzorky z celkového počtu 1.374 vzorků byly vyloučeny z analýzy. Jeden vzorek nebylo možné vyhodnotit z důvodu neshodného výsledku analyzovaných metod. Další vzorek poskytl nevalidní výsledek všemi porovnávanými metodami. Příčinou byl pravděpodobně nesprávný odběr vzorku. Celkově bylo do studie zařazeno 1.372 cervikálních a cervikovaginálních stěrů. Konsensuální výsledek pro daný vzorek byl vyhodnocen na základě shody výsledku alespoň dvou porovnávaných HPV detekčních metod.

Analýza všech vzorků, u nichž se nepodařilo získat validní výsledek metodou PapilloCheck® (6 vzorků) nebo LMNX (42 vzorků), byla po izolaci DNA pomocí výrobcem doporučeného kitu zopakována. Tímto způsobem byl ověřen vliv metody izolace DNA na robustnost daného HPV testu. Koncentrace DNA byla změřena pomocí fluorimetru Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Statistická analýza

Data byla analyzována pomocí statistického softwaru R, verze 3.2.1; R Core Team, *R Foundation for Statistical Computing* [<http://www.r-project.org>]. Sensitivita, specificita a Cohenův koeficient kappa s 95% komfidenčním intervalem (CI) byly vypočítány pro každou metodu a porovnány s konsensuálním HPV výsledkem za použití funkcí z epibasix R package, ver. 1.3. Pro stanovení symetrie pozitivních výsledků byl použit McNemarův test. Konsensuální HPV výsledek (shoda výsledků alespoň dvou metod) byl ustanoven zlatým standardem pro výpočet sensitivity, specificity a přesnosti. Sensitivita, specificita, Cohenův koeficient kappa a konkordance výsledků metody LMNX byly vypočítány pouze pro 337 vzorků paralelně analyzovaných metodami cobas® 4800 a PapilloCheck®. Konkordance výsledků byla počítána pouze za předpokladu, že výsledky obou metod byly validní. Ve validační studii byl zlatým standardem pro sensitivity, specificitu a přesnost ustanoven výsledek metody cobas® 4800 (tabulka 10).

2.3.3. Výsledky

Míra HPV positivity

K identifikaci HPV DNA v cervikálních a cervikovaginálních stěrech jsme použili tři metody detekující HPV: cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP. Celkově bylo do studie zařazeno 1.196 z 1.198 cervikálních stěrů a všech 176 cervikovaginálních stěrů. U jednoho vzorku

cervikálního stěru neposkytla ani jedna ze tří metod validní výsledek z důvodu nízké koncentrace DNA ve vzorku. V dalším případě cervikálního stěru nebylo možné ustanovit konsenzuální výsledek, pravděpodobně z důvodu přítomnosti krve ve vzorku (tabulka 10).

HPV DNA byla detekována u 291 z 1.372 (21,2 %; obrázek 17, tabulka 10) žen zařazených do studie. Pouze HPV16 pozitivita byla detekována u 63 z 291 vzorků (21,6 %) a koinfekce HPV16 s dalšími HPV genotypy byla detekována u 26 vzorků (8,93 %). Jen u jednoho vzorku (0,34 %) byly nalezena koinfekce HPV16 a HPV18 stejně jako koinfekce HPV16, HPV18 a dalších HPV genotypů. Pouze HPV18 pozitivita byla detekována u 8 z 291 vzorků (2,75 %), zatímco koinfekce HPV18 s dalšími HPV genotypy byla nalezena u 2 vzorků (0,69 %). Přítomnost alespoň jednoho genotypu z dalších 12 HPV byla detekována u většiny HPV pozitivních případů (190 z 291; 65,3 %).

Tabulka 10. Souhrn výsledků částečné genotypizace za použití detekčních metod cobas® 4800, PapilloCheck® a LMNX. Všechny tři metody byly použity k paralelnímu testování 337 cervikálních/cervikovaginálních stěrů (155).

Metodami cobas® 4800 a PapilloCheck® bylo paralelně testováno 995 cervikálních/cervikovaginálních stěrů a u 42 vzorků cervikálních/cervikovaginálních stěrů, u nichž se výsledek těchto dvou metod neshodoval, byla pro potvrzení výsledku použita metoda LMNX.

| Počet vzorků | Cobas® 4800 HPV | PapilloCheck® HPV-Screening | LMNX Genotyping Kit HPV GP | Konsensuální HPV výsledky |
|---|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Cobas® 4800, PapilloCheck® a LMNX testovány paralelně | | | | |
| 243 | Negativní | Negativní | Negativní | Negativní |
| 6 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní |
| 3 | Negativní | Negativní | HPV16 | Negativní |
| 2 | Negativní | Negativní | HPV18 | Negativní |
| 7 | Negativní | Negativní | Další HPV | Negativní |
| 3 | Negativní | Další HPV | Negativní | Negativní |
| 2 | HPV16 | Negativní | Negativní | Negativní |
| 4 | Další HPV | Negativní | Negativní | Negativní |
| 12 | HPV16 | HPV16 | HPV16 | HPV16 |
| 1 | HPV16 | HPV16 | Negativní | HPV16 |
| 1 | HPV16, 18 | HPV16, 18 | HPV16 | HPV16, 18 |
| 5 | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV |
| 1 | HPV16, 18, další HPV | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV |
| 1 | HPV18 | Negativní | HPV18 | HPV18 |
| 28 | Další HPV | Další HPV | Další HPV | Další HPV |
| 4 | Další HPV | Další HPV | Negativní | Další HPV |
| 7 | Další HPV | Negativní | Další HPV | Další HPV |
| 1 | Negativní | Další HPV | Další HPV | Další HPV |
| 1 | Negativní | Další HPV | HPV18, další HPV | Další HPV |
| 1 | HPV16, další HPV | Další HPV | Další HPV | Další HPV |
| 1 | HPV16, další HPV | Negative | Další HPV | Další HPV |
| 1 | HPV18, další HPV | Další HPV | Negativní | Další HPV |
| 1 | HPV18, další HPV | Negativní | Další HPV | Další HPV |
| 1 | Test selhal | Test selhal | Test selhal | Test selhal |
| Cobas® 4800 a PapilloCheck® testovány paralelně se shodným výsledkem. | | | | |
| 799 | Negativní | Negativní | Netestováno | Negativní |

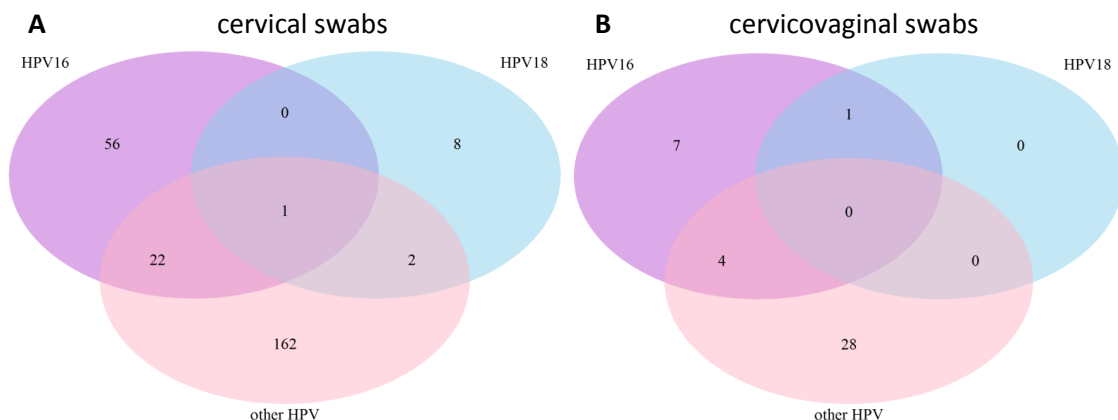
| | | | | |
|-----|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|
| 46 | HPV16 | HPV16 | Netestováno | HPV16 |
| 18 | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV | Netestováno | HPV16, další HPV |
| 1 | HPV16, 18, další HPV | HPV16, 18, další HPV | Netestováno | HPV16, 18, další HPV |
| 5 | HPV18 | HPV18 | Netestováno | HPV18 |
| 1 | HPV18, další HPV | HPV18, další HPV | Netestováno | HPV18, další HPV |
| 125 | Další HPV | Další HPV | Netestováno | Další HPV |

Cobas® 4800 a PapilloCheck® testovány paralelně s neshodným výsledkem

| | | | | |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 9 | Negativní | Další HPV | Negativní | Negativní |
| 3 | Další HPV | Negativní | Negativní | Negativní |
| 1 | Negativní | HPV16 | HPV16 | HPV16 |
| 2 | HPV16 | Negativní | HPV16 | HPV16 |
| 1 | HPV16 | HPV16, další HPV | HPV16 | HPV16 |
| 2 | HPV16, další HPV | Negativní | HPV16, další HPV | HPV16, další HPV |
| 2 | HPV18 | Negativní | HPV18 | HPV18 |
| 1 | HPV18 | Další HPV | HPV18, další HPV | HPV18, další HPV |
| 2 | Negativní | Další HPV | Další HPV | Další HPV |
| 3 | HPV16, další HPV | Další HPV | Další HPV | Další HPV |
| 1 | HPV18, další HPV | Další HPV | Další HPV | Další HPV |
| 14 | Další HPV | Negativní | Další HPV | Další HPV |
| 1 | Další HPV | Negativní | Test selhal | Neprůkazný |

Další HPV genotypy zahrnují HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

Konsenzuální výsledek každého vzorku byl ustanoven na základě shody alespoň dvou detekčních metod. Byla vyhodnocena pouze přítomnost hrHPV genotypů detekovaných všemi třemi analyzovanými HPV DNA detekčními metodami (HPV16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68).



Obrázek 17. Vennovy diagramy znázorňující distribuci vzorků pozitivních na HPV16, HPV18 a další HPV genotypy (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) u vzorků cervikálních (A) a cervikovaginálních stěrů (B) (155)

Tabulka 11. Souhrn HPV positivity u cervikálních a cervikovaginálních stěrů (155)

| | Všechny vzorky | % | Cervikální stěry | % | Cervikovaginální stěry | % |
|---------------------------------------|----------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| Celkový počet | 1372 | | 1196 | | 176 | |
| HPV negativní | 1081 | 78,8* | 945 | 79,0* | 136 | 77,3* |
| HPV pozitivní | 291 | 21,2* | 251 | 21,0* | 40 | 22,7* |
| HPV16 | 63 | 21,6 [†] | 56 | 22,3 [†] | 7 | 17,5 [†] |
| HPV16 & 18 | 1 | 0,34 [†] | 0 | 0 | 1 | 2,50 [†] |
| HPV16 & 18 & další HPV | 1 | 0,34 [†] | 1 | 0,40 [†] | 0 | 0 |
| HPV16 & další HPV | 26 | 8,93 [†] | 22 | 8,76 [†] | 4 | 10,0 [†] |
| HPV18 | 8 | 2,75 [†] | 8 | 3,19 [†] | 0 | 0 |
| HPV18 & další HPV | 2 | 0,69 [†] | 2 | 0,80 [†] | 0 | 0 |
| Další HPV | 190 | 65,3 [†] | 162 | 64,5 [†] | 28 | 70,0 [†] |

*Procenta z celkového počtu vzorků.

[†] Procenta z počtu HPV pozitivních vzorků.

Další HPV zahrnuje genotypy HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

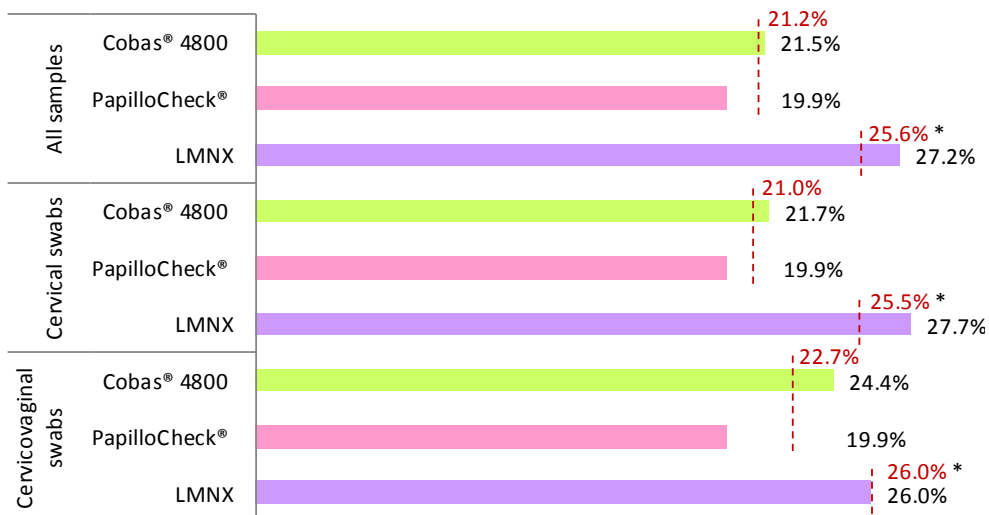
Informace o věku byla dostupná u 94,5 % (1297 z 1372) žen zahrnutých do studie. Mladších 25 let bylo 10,6 % (137 z 1.297) z těchto žen a pouze 1,3 % (17 z 1.297) žen bylo starších 60 let. Medián věku všech žen byl 32,7 let. Většina žen (88,1 %) spadala do cílové skupiny cervikálního screeningu (25-60 let) (5). HPV pozitivní ženy byly mladší než HPV negativní ženy (median 30,6 vs. 33,2 let; $P < 0,001$). Významně nižší věk HPV pozitivních žen byl pozorován u skupiny žen, které použily samoodběrovou sadu (medián 34,3 vs. 38,0 let; $P = 0,012$) stejně jako u skupiny žen, u kterých byl odběr proveden gynekolog (medián 30,1 vs. 32,7 let; $P < 0,001$).

Porovnání HPV positivity u cervikálních a cervikovaginálních stěrů

Přítomnost HPV DNA byla detekována u 21 % (251 z 1.196) cervikálních stěrů odebraných gynekologem a u 22,7 % (40 ze 176) cervikovaginálních stěrů získaných samoodběrem. Distribuce HPV pozitivních výsledků v jednotlivých HPV pozitivních podskupinách byla u cervikálních a cervikovaginálních stěrů porovnatelná (obrázek 8, tabulka 11).

Porovnání výsledků metod cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP

Metodou cobas® 4800 jsme detekovali HPV pozitivitu u 295 z 1.372 vzorků (21,5 %) a pomocí PapilloCheck® u 273 z 1372 vzorků (19,9%; obrázek 9). LMNX poskytl validní výsledek u 330 z 337 analyzovaných vzorků, z nichž bylo 72 HPV pozitivních (72 z 330; 21,8 %).



Obrázek 9. Porovnání proporce HPV pozitivních výsledků analyzovaných metod s konsenzuálním výsledkem (155)

Červená přerušovaná čára vyznačuje míru HPV positivity v dané skupině na základě konsenzuálního výsledku. Metodami cobas® 4800 a PapilloCheck® bylo analyzováno 1.372 cervikálních (n = 1.196) a cervikovaginálních (n = 176) stěrů. Hodnoty označené hvězdičkou (*) vyznačují míru HPV positivity v dané skupině na základě konsenzuálního výsledku pro 371 cervikálních (n = 275) a cervikovaginálních (n = 96) stěrů analyzovaných cobas® 4800, PapilloCheck® a LMNX. Konsenzuální výsledek každého vzorku byl ustanoven na základě shody alespoň dvou detekčních metod.

Do analýzy byly zahrnuty pouze vzorky s validním výsledkem, u nichž bylo možné ustanovit konsenzuální výsledek.

Bez ohledu na genotyp se analyzované metody shodovaly ve výsledku u 291 z 330 vzorků (88,2 %). Výsledek částečné genotypizace se shodoval u 288 vzorků (87,3 %). Výsledky metod cobas® 4800 a PapilloCheck® se shodovaly v 95,9 % (1.316 z 1.372) vzorků a výsledky genotypizace se shodovaly u 95,3 % (1.307 z 1.372) vzorků. Metody cobas® 4800 a LMNX se shodovaly v 92,1 % (304 z 330) výsledků a v 90,6 % (299 z 330) detekovaly stejný genotyp HPV. Nejmenší shody dosahovaly výsledky metod PapilloCheck® a LMNX, které se shodovaly pouze v 90,6 % výsledků (299 z 330) a v 90,0 % se shodovaly ve výsledku genotypizace (tabulka 9, tabulka 12).

Tabulka 12. Vzájemné porovnání výsledků analyzovaných metod (155).

| | Cobas® 4800 | | PapilloCheck® | | LMNX | | Konsensuální HPV výsledek | |
|----------------------------------|--------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|----------------------------------|------|
| | HPV+ | HPV- | HPV+ | HPV- | HPV+ | HPV- | HPV+ | HPV- |
| Cobas® 4800 | HPV+ | | 0,876 (0,844-0,907)* | | 0,767 (0,681-0,852)* | | 0,970 (0,954-0,985)* | |
| | HPV- | | 0,005 [†] | | 0,860 [†] | | 0,423 [†] | |
| PapilloCheck® | HPV+ | 256 | 17 | | 0,705 (0,609-0,802)* | | 0,906 (0,878-0,934)* | |
| | HPV- | 39 | 1060 | | 0,031 [†] | | 0,009 [†] | |
| LMNX | HPV+ | 58 | 14 | 50 | 22 | | 0,835 (0,762-0,909)* | |
| | HPV- | 12 | 246 | 9 | 249 | | 0,239 [†] | |
| Konsensuální HPV výsledek | HPV+ | 286 | 5 | 261 | 30 | 60 | 6 | |
| | HPV- | 9 | 1072 | 12 | 1069 | 12 | 252 | |

Do analýzy byly zahrnuty pouze vzorky s validním výsledkem.

Průměrnice řádku a sloupce pro dané metody odpovídá kontingenční tabulce 2x2 pro tyto dvě metody. V pravém horním rohu tabulky jsou uvedeny κ (95% CI) s konfidenčním intervalem (*) a *P*-value získaná pomocí McNemar testu (†).

Sensitivita a specifická analyzovaných metod ve srovnání s konsenzuálním výsledkem

Z testovaných metod dosahovala nejvyšší senzitivity (0,983) a specifický (0,992) metoda cobas® 4800. LMNX měl nižší senzitivitu (0,909), ale porovnatelnou specifický (0,955). PapilloCheck® dosahoval podobné specifický (0,989) jako cobas® 4800, ale nižší senzitivity (0,897; tabulka 13). Metoda PapilloCheck® častěji vyhodnotila vzorek jako falešně negativní v porovnání s metodami cobas® 4800 a LMNX (2,33 % vs. 0,44 % a 2,12 %). Falešně pozitivní výsledky vydával nejčastěji test LMNX (3,94 % vs. 1,31 % pro cobas® 4800 a 0,95 % pro PapilloCheck; tabulka 10).

Všechny tři testy vykazovaly porovnatelnou specifický pro detekci HPV16 (0,995-1,0), HPV18 (0,991-1,0) a dalších 12 hrHPV (0,975-0,994).

Tabulka 13. Sensitivita, specificita a Cohenův koeficient kappa pro jednotlivé metody vypočítaný vzhledem ke konsenzuálnímu výsledku (shoda výsledku alespoň dvou metod) (155)

| | Method | All samples | | | | | Cervical swabs | | | | | Cervicovaginal swabs | | | | |
|-----------|---------------------|-------------|-------|-------|-------------------------|----------|----------------|-------|-------|-------------------------|----------|----------------------|-------|-------|------------------------|----------|
| | | N | SE | SP | κ (95% CI) | P-value* | N | SE | SP | κ (95% CI) | P-value* | N | SE | SP | κ (95% CI) | P-value* |
| hrHPV | Cobas 4800 | 1372 | 0,983 | 0,992 | 0,970 (0,954-0,985) | 0,423 | 1196 | 0,98 | 0,994 | 0,972 (0,956-0,989) | 1,000 | 176 | 1,000 | 0,978 | 0,953 (0,900-1,006) | 0,248 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0,897 | 0,989 | 0,906 (0,878-0,934) | 0,009 | 1196 | 0,904 | 0,988 | 0,91 (0,881-0,939) | 0,043 | 176 | 0,85 | 0,993 | 0,882 (0,796-0,967) | 0,131 |
| | LMNX | 330 | 0,909 | 0,955 | 0,835 (0,762-0,909) | 0,239 | 238 | 0,886 | 0,943 | 0,788 (0,689-0,887) | 0,211 | 92 | 0,955 | 0,986 | 0,940 (0,858-1,022) | 1,000 |
| HPV16 | Cobas 4800 | 1372 | 0,989 | 0,995 | 0,954 (0,923-0,986) | 0,077 | 1196 | 0,987 | 0,997 | 0,973 (0,947-0,999) | 0,617 | 176 | 1,000 | 0,976 | 0,845 (0,697-0,993) | 0,134 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0,956 | 1,000 | 0,976 (0,952-0,999) | 0,134 | 1196 | 0,949 | 1,000 | 0,972 (0,945-0,999) | 0,134 | 176 | 1,000 | 1,000 | 1,000 (-1,100) | NA |
| | LMNX | 330 | 0,950 | 0,990 | 0,898 (0,800-0,997) | 0,617 | 238 | 0,923 | 0,991 | 0,882 (0,751-1,014) | 1,000 | 92 | 1,000 | 0,988 | 0,927 (0,786-1,069) | 1,000 |
| HPV18 | Cobas 4800 | 1372 | 1,000 | 0,997 | 0,856 (0,716-0,995) | 0,134 | 1196 | 1,000 | 0,997 | 0,879 (0,743-1,015) | 0,248 | 176 | 1,000 | 0,994 | 0,664 (0,046-1,283) | 1,000 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0,667 | 1,000 | 0,799 (0,606-0,992) | 0,134 | 1196 | 0,636 | 1,000 | 0,776 (0,563-0,990) | 0,134 | 176 | 1,000 | 1,000 | 1,000 (-1,100) | NA |
| | LMNX | 330 | 0,500 | 0,991 | 0,328 (-0,161-0,817) | 0,617 | 238 | 1,000 | 0,987 | 0,396 (-0,147-0,939) | 0,248 | 92 | 0 | 1,000 | 0 (-0,203-0,203) | 1,000 |
| Další HPV | Cobas 4800 | 1372 | 0,977 | 0,994 | 0,968 (0,949-0,986) | 0,773 | 1196 | 0,973 | 0,994 | 0,965 (0,945-0,986) | 1,000 | 176 | 1,000 | 0,993 | 0,981 (0,944-1,018) | 1,000 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|-------|-------|------------------------|-------|------|-------|-------|------------------------|-------|-----|-------|-------|------------------------|-------|
| PapilloCheck | 1372 | 0,886 | 0,989 | 0,894 (0,861-0,927) | 0,074 | 1196 | 0,898 | 0,988 | 0,900 (0,866-0,935) | 0,281 | 176 | 0,813 | 0,993 | 0,858 (0,755-0,960) | 0,131 |
| LMNX | 330 | 0,902 | 0,975 | 0,863 (0,787-0,939) | 0,773 | 238 | 0,882 | 0,966 | 0,818 (0,714-0,922) | 0,546 | 92 | 0,941 | 1,000 | 0,963 (0,891-1,035) | 1,000 |

Další HPV zahrnuje genotypy HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

*P-value vypočítaná pomocí McNemarova testu.

SE-sensitivita, SP- specificita, κ – Cohenův koeficient kappa, NA- nelze

Porovnání sensitivity a specificity metod pro cervikální a cervikovaginální stěry

Z analyzovaných metod měla pro detekci hrHPV v cervikálních stěrech nejvyšší sensitivity (0,980) i specificitu (0,994) metoda cobas® 4800. Také při analýze cervikovaginálních stěrů měla metoda cobas® 4800 nejvyšší sensitivity (1,0), ale nejvyšší specificity (0,993) dosahovalo vyšetření pomocí kitu PapilloCheck® (tabulka 13).

Sensitivity a specificita metody cobas® 4800 pro detekci HPV16 (cervikální vs. cervikovaginální stěry; SE = 0,987 vs. 1,0; SP = 0,997 vs. 0,976), HPV18 (SE = 1,0 vs. 1,0; SP = 0,997 vs. 0,994) a dalších 12 hrHPV genotypů (SE = 0,973 vs. 1,0; SP = 0,994 vs. 0,993) byla u vzorků cervikálních a cervikovaginálních stěrů porovnatelná. Specificita metody PapilloCheck® pro detekci HPV16 (SE = 1,0 vs. 1,0), HPV18 (SE = 1,0 vs. 1,0) a dalších 12 hrHPV genotypů (0,988 vs. 0,993) byla u vzorků cervikálních a cervikovaginálních stěrů také porovnatelná, ale při detekci HPV16 a HPV18 vykazovala nižší sensitivity při vyšetření vzorků cervikálních stěrů (0,949 vs. 1,0; 0,636 vs. 1,0). Při detekci dalších 12 hrHPV genotypů byla metoda PapilloCheck® více sensitivní u cervikálních stěrů v porovnání se stěry cervikovaginálními (0,898 vs. 0,813).

LMNX vykazoval obdobnou specificitu pro HPV16 (0,991 vs. 0,988) a HPV18 (0,987 vs. 1,0) při vyšetření cervikálních a cervikovaginálních stěrů. Sensitivity detekce HPV16 metodou LMNX byla u cervikálních stěrů nižší než u cervikovaginálních stěrů (0,923 vs. 1,0). Pro HPV18 vykazovala metoda LMNX absolutní sensitivity při detekci HPV18 v cervikálních stěrech a nulovou sensitivity při detekci HPV18 v cervikovaginálních stěrech. Tento rozporuplný výsledek byl způsoben falešně negativním výsledkem metody LMNX pro jediný HPV18 pozitivní cervikovaginální stěr. Při detekci dalších 12 hrHPV genotypů vykazovala metoda LMNX srovnatelnou sensitivity (0,95 vs. 0,926), ale nižší specificitu (1,0 vs. 0,968) u cervikovaginálních než u cervikálních stěrů (tabulka 13).

Selhání detekce HPV DNA

U 50 z 1.374 vzorků (3,64 %) opakovaně selhala alespoň jedna z testovaných HPV DNA detekčních metod. Selhání detekce by mohlo být způsobeno nižší koncentrací a čistotou DNA izolované automaticky cobas x 480 než měla DNA získaná pomocí QIAamp DNA Micro kitu nebo oCheck DNA extraction kitu. Z tohoto důvodu byla ze všech vzorků, u nichž se nepodařilo získat validní výsledek, izolována DNA pomocí výrobcem doporučeného kitu a analýza zopakována. Z důvodu špatné kvality vzorku byly dva vzorky z analýzy vyloučeny (viz 2.3.2. Materiál a metody).

Analýza všech vzorků, u nichž se nepodařilo získat validní výsledek metodou PapilloCheck® (6 vzorků) nebo LMNX (42 vzorků), byla po izolaci DNA pomocí výrobcem doporučeného kitu zopakována.

U šesti vzorků (6 z 1.374; 0,44 %) byla po opětovné izolaci DNA opakována analýza metodou PapilloCheck®, jeden vzorek byl následně vyhodnocen jako pozitivní na další hrHPV a zbylých 5 vzorků bylo HPV negativních. Detekci metodou LMNX bylo nutné zopakovat u 42 vzorků (42 z 377; 11,1 %), z nichž byl jeden vzorek následně vyhodnocen jako HPV16 pozitivní, 4 vzorky pozitivní na další hrHPV a 31 vzorků bylo HPV negativních. U 6 vzorků se i přes opakování izolace DNA a následné analýzy nepodařilo získat validní výsledek metodou LMNX (tabulka 14). Medián koncentrace DNA u těchto vzorků [0,222 µg/ml (0,0608 µg/ml -0,504 µg/ml)] byl významně nižší než medián koncentrace 40 náhodně vybraných vzorků [11,61 µg/ml (6,42 µg/ml -125 µg/ml)] s validním výsledkem metody LMNX (P < 0,001).

Metodou cobas® 4800 a Papillocheck® bylo možné vyhodnotit všechny vzorky zahrnutého do analýzy. I přes opakování analýzy po izolaci DNA dle doporučení výrobce nebylo možné vyhodnotit výsledky u 6 z 377 vzorků (1,59 %; P < 0,001) analyzovaných metodou LMNX (tabulka 14).

Tabulka 14. Souhrn charakteristiky 6 vzorků, které nebylo možné analyzovat metodou LMNX (155)

| Číslo vzorku | Cobas 4800 | PapilloCheck | LMNX | Konsensuální HPV výsledek | Koncentrace DNA* | Typ stěru |
|--------------|------------|--------------|-------------|---------------------------|------------------|------------------|
| 1 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní | 0,418 µg/ml | Cervikovaginální |
| 2 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní | 0,254 µg/ml | Cervikální |
| 3 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní | 0,0736 µg/ml | Cervikální |
| 4 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní | 0,0608 µg/ml | Cervikální |
| 5 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní | 0,190 µg/ml | Cervikální |
| 6 | Negativní | Negativní | Test selhal | Negativní | 0,504 µg/ml | Cervikovaginální |

*DNA izolovaná pomocí QIAamp DNA Micro kit.

2.3.4. Diskuse

Tato studie porovnává analytické charakteristiky tří HPV DNA detekčních metod: cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP. Metody cobas® 4800 a PapilloCheck® byly testovány na souboru 176 cervikovaginálních stěrů získaných pomocí samoodběrové sady a 1.198 cervikálních stěrů odebraných gynekologem. Metoda LMNX byla testována pouze na 94 cervikovaginálních stěrech a 243 cervikálních stěrech.

Z testovaných kitů vykazoval cobas® 4800 nejvyšší sensitivitu a specifitu v detekci 14 hrHPV celkově a u cervikálních stěrů. Při analýze cervikovaginálních stěrů měl cobas® 4800 nejvyšší sensitivitu, ale PapilloCheck® měl nejvyšší specifitu. Získaná senzitivita a specifita metody LMNX může být ovlivněna tím, že touto metodou bylo analyzováno menší množství vzorků než metodami cobas® 4800 a PapilloCheck®. Hodnoty senzitivity a specifity metod cobas® 4800 a PapilloCheck® byly vypočítány na základě výsledků testování 1.372 cervikálních a cervikovaginálních stěrů včetně 42 vzorků, u kterých bylo z důvodu neshodného výsledku metod cobas® 4800 a PapilloCheck® nutné doplnit vyšetření metodou LMNX. Metody cobas® 4800 a PapilloCheck® se shodovaly s konsenzuálním výsledkem u více než 97 % vzorků. Metoda LMNX se s konsenzuálním výsledkem shodovala v 94,5 % případů (Tabulka 12). Klinická senzitivita a specifita testovaných metod byla potvrzena řadou studií (110;111;115;116).

Ve srovnání s vysokým počtem studií zaměřených na klinickou validaci metod cobas® 4800, PapilloCheck® a LMNX bylo doposud publikováno jen několik studií zaměřených na analytickou senzitivitu a specifitu těchto metod (145;156-159). Doposud byly publikovány pouze dvě studie (157;159) porovnávající analytickou senzitivitu metody cobas® 4800 a konsenzuálního výsledku (skutečně pozitivní/negativní výsledek). V současné době nebyla zveřejněna žádná studie porovnávající analytickou senzitivitu metody PapilloCheck® nebo LMNX s konsenzuálním výsledkem.

Ve studii Lindeman *et al.* (159) byla porovnána analytická senzitivita a specifita metod cobas® 4800 a HC2 na skupině 1.360 vzorků. Výsledky obou metod se shodovaly u 86,6 % vzorků. Sto čtyřicet ze 170 (82,4 %) neshodných vzorků bylo následně vyšetřeno pomocí metody Linear Array HPV Genotyping test (159). Park *et al.* (157) publikoval doposud jedinou studii (n = 356) porovnávající analytickou senzitivitu metod cobas® 4800, RealTime HR HPV assay a HC2 s konsenzuálním výsledkem. Vzorky s neshodným výsledkem byly následně analyzovány pomocí sekvenování a GeneFinder HPV liquid beads microarray. Ve srovnání se studií Park *et al.* jsme zaznamenali vyšší senzitivitu metody cobas® 4800 pro detekci skupiny 14 hrHPV genotypů (0,98 vs. 0,917) a pro HPV16

(0,987 vs. 0,885). Sensitivita pro HPV18 (1 vs. 1) a specificita pro skupinu 14 hrHPV genotypů (0,994 vs. 0,97), HPV16 (0,997 vs. 0,991) a HPV18 (0,997 vs. 0,994) byly v obou studiích porovnatelné.

Metody PapilloCheck® a LMNX byly porovnány ve studii VALGENT, kde byly jejich výsledky porovnány navzájem, ale ne vůči konsenzuálnímu výsledku. Konkordance metod PapilloCheck® a LMNX byla 0,947 ($\kappa = 0,875$) pro skupinu všech 14 hrHPV genotypů, 0,99 ($\kappa = 0,936$) pro HPV16 a 0,99 ($\kappa = 0,801$) pro HPV18 (158). V naší studii byla konkordance metod PapilloCheck® a LMNX pouze 0,906 ($\kappa = 0,705$) pro skupinu 14 hrHPV genotypů, 0,991 ($\kappa = 0,898$) pro HPV 16 a 0,988 ($\kappa = -0,005$) pro HPV18. Řada falešně pozitivních/negativních výsledků byla pravděpodobně způsobena rozdílnou analytickou sensitivitou metod (limitem detekce). Nejvyšší limit detekce téměř všech testovaných genotypů je deklarován výrobcem kitu PapilloCheck®, u nějž jsme pozorovali nejvyšší počet falešně negativních výsledků. Naopak nejnižší limit detekce uvádí výrobce kitu LMNX, metody u které jsme pozorovali nejvyšší počet falešně pozitivních výsledků.

Přesnost výsledku HPV detekce a genotypizace všech laboratoří používajících cobas® 4800 a LMNX byla ověřena v rámci mezinárodní studie odbornosti organizované HPV laboratoří Laboratory Network's (LabNet) (160).

Hlavní nevýhodou metody LMNX byla vysoká frekvence selhání testu (42 z 377, 11,1 %, $P < 0,001$) pokud byla pro test použita DNA izolovaná cobas x 480. Pro všechny metody jsme použili stejnou metodu izolace DNA z důvodu dostupnosti omezeného množství vzorku, a abychom snížili náklady a časovou náročnost studie (157). Kvalita DNA izolovaná pomocí automatu cobas x 480 byla téměř ve všech případech postačující pro amplifikaci interní kontroly kitu cobas® 4800 a PapilloCheck®. DNA izolovaná tímto způsobem měla nižší koncentraci a čistotu než DNA připravená pomocí QIAamp DNA Micro kitu, což pravděpodobně v několika případech přispělo k selhání testu PapilloCheck® nebo LMNX. Po použití metody izolace DNA dle doporučení výrobce kitu klesl počet selhání testu PapilloCheck® z 0,44 % na 0 % a testu LMNX z 11,1 % na 1,59 %. I přes použití doporučené izolační metody DNA měly vzorky, u kterých test LMNX selhal, významně nižší koncentraci DNA (0,222 $\mu\text{g/ml}$ oproti 11,61 $\mu\text{g/ml}$ u vzorků s validním výsledkem LMNX testu), což potvrzuje vyšší nároky metody LMNX na koncentraci vstupní DNA ve srovnání s kity PapilloCheck® a cobas® 4800. Nicméně, používání dvou metod izolace DNA pro detekci HPV a genotypizaci by bylo pro rutinní diagnostiku velmi nepraktické.

Přítomnost hrHPV DNA byla detekována u 21,2 % vzorků, s nejvyšší prevalencí u žen ve věku 26-30 let. Obdobnou hrHPV prevalencí v populaci českých žen uvádí také studie Tachezy *et al.* (147). Tato studie využívající HPV DNA detekční

metodu na bázi PCR uvádí 22,3% HPV pozitivitu s nejvyšší HPV prevalencí u žen ve věku 21-25 let.

Celosvětově se HPV prevalence u žen s normálním cytologickým nálezem pohybuje mezi 10,4 % a 12 % v závislosti na kontinentu a regionu (8;161;162). V Evropě se HPV prevalence pohybuje mezi 8,1-14,2 % (8;161;162) s nejvyšší HPV prevalencí 21,4 % ve východní Evropě (8;161). Naše výsledky potvrzují vysokou HPV prevalenci v populaci českých žen, která je porovnatelná s HPV prevalencí v zemích východní Evropy. Nejčastěji detekovanými HPV genotypy jsou u nás stejně jako celosvětově HPV16 a HPV18. Globálně je HPV16 detekován u 20,4-24 % HPV pozitivních žen (8;161;162), pro českou populaci se uvádí 24,2-55 % (147;163). HPV18 tvoří 7,4-9,8 % HPV pozitivních případů celosvětově (8;161;162) a 7,7-10,3 % HPV pozitivních případů v České republice (147;163). V naší studii byl genotyp HPV16 s 31,3 % pozitivitou také nejčastěji detekovaným HPV genotypem. HPV18 byl naopak detekován pouze u 4,12 % případů.

I když v rámci této studie nebyly testovány paralelně odebírané vzorky cervikálních a cervikovaginálních stěrů, HPV pozitivita se u skupiny vzorků odebraných gynekologem a samoodběrem lišila pouze o 1,7 %. U skupin jednotlivých HPV genotypů byla distribuce HPV positivity pro cervikální a cervikovaginální stěry také velmi podobná.

Tyto výsledky odpovídají výstupům řady meta-analýz (146;154;164). Petignat *et al.* uvádí porovnatelnou průměrnou hrHPV pozitivitu vzorků odebraných gynekologem a nebo pomocí samoodběru (24,1 % vs. 24,8 %) s odchylkou 0,3 % až 22,2 % (medián 4,9 %)(146). Pozorované rozdíly sensitivity a specifity vyšetření mohly být způsobeny použitím odlišných typů samoodběrových sad. Nejvyšší relativní sensitivity a specifity vyšetření bylo dosaženo při samoodběru pomocí kartáčku nebo laváže s následnou HPV detekcí na bázi PCR (164). V naší studii byla analytická sensitivity HPV detekčních metod pro vzorky získané samoodběrem a odebraných gynekologem také porovnatelná. Pouze u metody PapilloCheck® jsme zaznamenali o 5,4 % vyšší sensitivity při vyšetření cervikálních stěrů než cervikovaginálních stěrů ($P = 0,441$). Marginální rozdíly v senzitivitě (1,7-5,4 %) a specifitě (0,5-4,0 %) testovaných metod při vyšetření cervikálních a cervikovaginálních vzorků mohou být způsobeny rozdílným počtem vzorků v těchto dvou skupinách.

2.3.5. Závěr

Tato studie prokazuje vysokou míru shody mezi všemi testovanými metodami. Nejvyšší konkordance výsledků byla u metod cobas® 4800 HPV Test

a PapilloCheck® HPV-Screening assay. Nejnižší konkordance byla pozorována u metod PapilloCheck® HPV-Screening assay a LMNX Genotyping Kit HPV GP. Analytické parametry všech testovaných metod byly porovnatelné. Nejvyšší analytické sensitivity a specificity dosahovala metoda cobas® 4800 HPV Test. Při použití metody LMNX Genotyping Kit HPV GP byla pozorováno nejčastější selhání testu a nejvyšší nároky na koncentraci vstupní DNA, což může být limitující pro jeho použití v rutinní diagnostice.

2.3.6. Podíl autora dizertační práce na daném tématu

Uvedená studie je publikována v časopise The Journal of Molecular Diagnostics pod názvem „Head-to-Head Analytical Comparison of Cobas 4800 HPV, PapilloCheck HPV Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical and Cervicovaginal Swabs“ (155) (příloha 3). Autorka se podílela na designu, koordinaci studie a provedla samostatně všechna HPV vyšetření. Zpracovala výsledky a následně rukopis studie.

3. Souhrn

Screening cervikálního karcinomu pomocí HPV diagnostiky doplněné triážovými testy pravděpodobně nahradí screening založený na cytologickém vyšetření ve všech rozvinutých zemích světa. Zásadní výhodou HPV screeningu je vysoká negativní prediktivní hodnota vyšetření po dobu 5 let, což umožňuje prodloužit screeningový interval. HPV testy však nejsou schopny rozlišit přechodnou a transformující HPV infekci, proto je nezbytné je doplnit triážovými testy. Na základě výsledku triážového testu jsou ze skupiny HPV pozitivních žen ke kolposkopii s biopsií odeslány pouze ženy s vysokým rizikem vzniku pokročilých přednádorových lézí nebo cervikálního karcinomu. HPV detekci je na rozdíl od cytologického vyšetření možné použít k vyšetření vzorků získaných samoodběrem. Možnost samoodběru pro ženy, které se cervikálního screeningu neúčastní, se v řadě studií ukázala natolik slibnou, že ji některé země implementovaly do screeningového programu. V současné době je v České republice cervikální screening stále založen na cytologickém vyšetření, doplnění HPV testem pouze v případech s abnormální cytologií s neznámým významem (ASC-US).

Prvním projektem této práce byla pilotní studie zaměřená na využití samoodběrových souprav a HPV diagnostiky pro cervikální screening v České republice. Z rozeslaných 215 samoodběrových sad bylo k analýze doručeno 174 (81%) cervikovaginálních stěrů. Všechny vzorky byly odebrány správně a bylo možné je vyšetřit cobas 4800 HPV testem. PapilloCheck® HPV-Screening systémem bylo možné za zisku validního výsledku vyšetřit 98 % vzorků. Přítomnost hrHPV byla detekována u 24 % vzorků a přítomnost pouze lrHPV byla nalezena v dalších 4 % případů. Ženy dotázané na svou zkušenost se samoodběrovou sadou ji hodnotily jako dobrou až výbornou. Návod k použití Evalyn® Brush byl považován za dobrý až vynikající všemi ženami. Většina žen z tohoto souboru (88 %) by dala přednost samoodběru před odběrem vzorku lékařem. Vzhledem k tomu, že byla možnost samoodběru českými ženami velmi dobře přijata, mohlo by zavedení samoodběru jako způsobu účasti na cervikálním screeningu, vést k významnému zvýšení návštěvnosti tohoto programu.

Další projekt této disertační práce byl zaměřen na přímé porovnání detekce HPV16, HPV18 a skupiny dalších 12 hrHPV genotypů pomocí metod cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening a LMNX Genotyping Kit HPV GP. HPV DNA byla detekována ve 21,2 % vzorků, z toho u 21 % (251 z 1.196) cervikálních stěrů a 22,7 % (40 ze 176) cervikovaginálních stěrů. Celkově, nevyšší sensitivity (0,983) a specificity (0,992) pro detekci hrHPV dosahoval cobas® 4800 HPV Test. PapilloCheck® HPV-Screening and LMNX Genotyping Kit HPV GP dosahovaly

porovnatelné specifcity jako cobas® 4800 HPV Test (0,989 vs. 0,955), ale nižší sensitivity (0,897 vs. 0,909). Cobas® 4800 HPV Test dosahoval také nejvyšší sensitivity (0,980) a specifcity (0,994) pro detekci hrHPV u cervikálních stěrů odebraných gynekologem. Při vyšetření cervikovaginálních stěrů, získaných pomocí samoodběrové sady, byla nejvyšší sensitivita pozorována rovněž u cobas® 4800 HPV Test (1,00), nejvyšší specifcity (0,993) však dosahovala metoda PapilloCheck® HPV-Screening. Všechny testované metody vykazovaly vysokou sensitivitu i specifcitu při analýze cervikálních stěrů odebraných gynekology i cervikovaginálních stěrů získaných pomocí samoodběrové sady.

4. Summary

HPV testing with triage of HPV positive women will probably replace cytology-based primary cervical cancer screening in all developed countries. The main advantage of HPV screening is a high negative predictive value of HPV test for the next 5 years which allows extension of the screening period. Nevertheless, HPV tests are not able to distinguish transient and transforming HPV infection. That is why another test is needed to triage HPV positive women. Triage test should distinguish women at high risk of high-grade cervical neoplasia and refer them to colposcopy with biopsy. In contrast with cytology, testing of self-samples using HPV tests have comparable sensitivity and specificity to testing clinician acquired samples. The possibility of self-sampling is a promising option for screening non-attenders. Several countries already implemented self-sampling to their cervical cancer screening program. Current cervical cancer screening in the Czech Republic is cytology-based, using HPV test only in cases with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US).

The first project of this thesis was pilot study to get initial experience with alternative sampling (self-sampling) for HPV testing as the means of cervical cancer screening program in the Czech Republic. One hundred seventy-four of 215 (81%) distributed self-sampling devices have been delivered to analysis. All cervicovaginal swabs were sampled correctly and it was possible to analyze them by cobas 4800 HPV test. Similarly, 98% samples were analyzable by PapilloCheck® HPV-Screening. High risk HPV infection was present in 24% of samples, and low risk HPV infection was detected only in 4% of samples. Majority (98%) of women rated their experience with self-sampling device as good to excellent. User manual of self-sampling device was considered good to excellent by all women (100%). As expected, most of the women (88%) preferred self-sampling to physician sampling. Cervicovaginal self-sampling was accepted by Czech women very well. The self-sampling as an opportunity to participate in cervical cancer screening could increase the attendance of the screening program.

The second project of the thesis was focused on a head-to-head comparison of HPV16, HPV18 and pool of other 12 high risk HPVs detection using cobas® 4800 HPV Test, PapilloCheck® HPV-Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP. HPV DNA was detected in 21.2% of all samples, 21% of cervical swabs (251 of 1,196) and 22.7% of cervicovaginal swabs (40 of 176). The cobas 4800 HPV Test was the most sensitive (0.983) and specific (0.992) for hrHPV detection overall. The PapilloCheck HPV-Screening and LMNX Genotyping Kit HPV GP had comparable specificity with that of the cobas (0.989 and 0.955, respectively), but lesser sensitivity (0.897 and 0.909,

respectively). In physician-obtained cervical swabs, the cobas showed the highest sensitivity and specificity (0.980 and 0.994, respectively) for hrHPV detection, whereas in cervicovaginal swabs, the cobas had the highest sensitivity (1.00), but the PapilloCheck had the highest specificity (0.993). In conclusion, all of the detection methods evaluated were highly sensitive and specific for hrHPV detection from both clinician-collected cervical swabs and self-sampled cervicovaginal swabs.

5. Seznam zkratek

| | |
|----------------------------|--|
| <i>ADAT1</i> | gen pro adenosin deaminasu 1 |
| ASC-US | atypical squamous cells of undetermined significance ; abnormální cytologický nález neznámého významu |
| <i>ASTN1</i> | gen pro astrotactin 1 |
| Bak | Bcl-2 homologous antagonist/killer; proapoptotický protein |
| bp | base pairs, počet nukleotidových párů (jednotka délky nukleových kyselin) |
| <i>CADM1</i> | gen pro Cell Adhesion Molecule 1 |
| CE-IVD | Conformité Européenne, In Vitro Diagnostics |
| CI | Confidence interval, konfidenční interval |
| CIN | Cervical intraepithelial lesion, cervikální intraepiteliální neoplasie |
| CIN1 | lehká dysplazie cervikálního epitelu |
| CIN2 | střední dysplazie cervikálního epitelu |
| CIN3 | těžká dysplazie cervikálního epitelu |
| CIS | Carcinoma <i>in situ</i> , karcinom <i>in situ</i> |
| <i>c-Myc</i> | gen pro transkripční faktor c-Myc; protoonkogen |
| CP | primery používané k detekci HPV genu <i>E1</i> |
| <i>DLX1</i> | gen pro transkripční faktor Distal-Less Homeobox 1 |
| DNA | deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina |
| DNMT | DNA metyltransferasa |
| DNMT1 | udržovací DNA metyltransferasa |
| dsDNA | double strand DNA, dvouvláknová DNA |
| E1 | časný protein HPV; nezbytný pro replikaci HPV genomu |
| E2 | časný protein HPV; reguluje replikaci a transkripci viru |
| E2F | transkripční faktor interagující s pRB; reguluje G1/S checkpoint buněčného cyklu buňky |
| E4 | E1 ^{E4} bicistronní transkript HPV; uplatňuje se při uvolnění virionu z buňky |
| E5 | časný HPV protein; snižuje úroveň degradace EGFR |
| E6 | časný HPV onkoprotein; indukuje degradaci p53 |
| E7 | časný HPV onkoprotein; indukuje degradaci pRB |
| EGFR | epidermal growth factor receptor; tyrosinkinasový receptor; aktivuje MAP kinasovou signální dráhu |
| EIA | enzyme immunoassay, enzymová imunoanalýza |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay, heterogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza |
| GP5+/6+, <i>FAM19A4</i> | primery používané k detekci HPV genu <i>L1</i> gen pro protein Family With Sequence Similarity 19 Member A4 |

| | |
|-----------------|---|
| FADD | Fas-associated protein with death domain |
| HC2 | Hybrid Capture 2 |
| HPV | human papillomavirus; lidský papilomavirus |
| hrHPV | high-risk HPV; kancerogenní lidský papilomavirus |
| HSIL | high-grade squamous intraepithelial lesion; pokročilá léze skvamózního epitelu cervixu, cytologická klasifikace |
| CH14 | chromosom 14 |
| IARC | the International Agency for Research on Cancer ; Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny |
| IgG | Imunoglobulin G |
| <i>IL1RAP</i> | gen <i>IL1RAP</i> s prozánětlivou funkcí |
| KLF5 | regulátor vývoje a kancerogeneze |
| <i>ITGA4</i> | gen pro Integrin Subunit Alpha 4 |
| KLF12 | regulátor vývoje a kancerogeneze |
| L1 | pozdní HPV protein 1; majoritní kapsidový protein |
| L2 | pozdní HPV protein 2; minoritní kapsidový protein |
| LabNet | akronym pro Laboratory Network's |
| LCR | long control region; dlouhá kontrolní oblast, alternativa k URR |
| LBC | liquid-based cytology |
| lrHPV | low-risk HPV; lidský papilomavirus způsobující bradavice a benigní léze |
| LSIL | low-grade squamous intraepithelial lesion, nízký stupeň léze skvamózního epitelu cervixu, cytologická klasifikace |
| <i>MAL</i> | gen kódující protein z rodiny MAL proteolipidů |
| <i>miR124-2</i> | gen pro microRNA 124-2 |
| mRNA | mediátorová RNA |
| miRNA | microRNA |
| MY09/MY11 | primery používané k detekci HPV genu <i>L1</i> |
| NPV | negative predictive value, negativní prediktivní hodnota |
| p16INK4A | CDKN2A; inhibitor cyclin-dependentní kinasy 2A; inhibuje CDK4/6 |
| p53 | transkripční faktor, tumorsupresorový protein, reguluje G1/S kontrolní bod buněčného cyklu |
| p97 | časný promotor HPV |
| p670 | pozdní promotor HPV |
| Pap | v textu Pap test, cytologické vyšetření založené na barvení dle Papanicolau |
| PCR | polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce |
| PAE | polyadenylation site-early, časně polyadenylační místo HPV genomu |
| PAL | polyadenylation site-late, pozdní polyadenylační místo HPV genomu |
| PPV | positive predictive value, pozitivní prediktivní hodnota |

| | |
|---------------|--|
| pRB | retinoblastoma protein; E2F vazebný pocket protein; tumorsupresor |
| pU | primery používané k detekci HPV genu <i>L1</i> |
| ORF | open reading frame, otevřený čtecí rámec |
| ORI | origin of replication; počátek replikace |
| <i>RXFP3</i> | gen pro Relaxin Family Peptide Receptor 3 |
| RHA | reverse hybridisation assay, metoda založená na reverzní hybridizaci |
| SE | sensitivita |
| <i>SOX17</i> | gen pro transkripční faktor SRY-Box 17 |
| SP | specifická |
| SPI | transkripční aktivátor, váže se do LCR HPV genomu |
| SPF10 | primery používané k detekci HPV genu <i>E6</i> a <i>E7</i> |
| <i>TP63</i> | gen pro jeden z proteinů p53 proteinové rodiny |
| TPRG1 | regulátor proteinu kódovaného genem <i>TP63</i> |
| UTR | untranslated region, mRNA sekvence za nebo před kódující sekvencí genu |
| URR | upstream regulatory region, ekvivalent k LCR |
| VaIN2/3 | vaginální intraepiteliální neoplasie 2/3 |
| VALGENT | akronym pro VALidation of HPV GENotyping Tests |
| VIN2/3 | vulvární intraepiteliální neoplasie 2/3 |
| VLPs | virus-like particles, viru podobné částice |
| WHO | World Health Organization |
| <i>ZNF671</i> | gen pro taksripční koregulátor Zinc Finger Protein 671 |

6. Seznam literatury

- (1) Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Thinkhamrop J, Yuenyao P, et al. Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007;8(2):279-82.
- (2) Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3-63-S3/70.
- (3) Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *European Journal of Cancer.* 2009;45(15):2640-8.
- (4) Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *The Lancet.* 2004;364(9430):249-56.
- (5) Duskova J, Bekova A, Dvorak V, Majek O, Dusek L. Results of the Czech National Cervical Cancer screening programme. *Klin Onkol.* 2014;27 Suppl 2:79-86.
- (6) Majek O, Dvorak V, Dusek L, Muzik J, Snajdrova L, Gregor J. Cervarix.cz - Program cervikálního screeningu v České republice . *Int.J.Lab Hematol.* 6-5-2015.
- (7) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
- (8) de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-9.
- (9) Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis.* 2006;194(8):1044-57.
- (10) Fernandes JV, Araújo JMG, Fernandes TAAM. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access Journal of Clinical Trials.* 2013;5:1-12.
- (11) Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2101-4.

- (12) de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048-56.
- (13) Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(11):1171-7.
- (14) Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008;68(1):307-13.
- (15) Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100(Pt B):1-441.
- (16) Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):291-319.
- (17) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
- (18) Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030-44.
- (19) Syrjanen KJ. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case. *Respiration.* 1979;38(5):299-304.
- (20) Rubel L, Reynolds RE. Cytologic description of squamous cell papilloma of the respiratory tract. *Acta Cytol.* 1979;23(3):227-31.
- (21) Katsenos S, Becker HD. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review. *Case Rep Oncol.* 2011;4(1):162-71.
- (22) Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(5):269-82.
- (23) Syrjanen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3235-50.
- (24) Xiong WM, Xu QP, Li X, Xiao RD, Cai L, He F. The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(56):96419-32.

- (25) Zhai K, Ding J, Shi HZ. HPV and lung cancer risk: a meta-analysis. *J Clin Virol*. 2015;63:84-90.
- (26) Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis*. 2014;35(6):1267-75.
- (27) Srinivasan M, Taioli E, Ragin CC. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers--a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2009;30(10):1722-8.
- (28) Jaworek H, Koudelakova V, Slavkovsky R, Drabek J, Hajduch M. The absence of high-risk human papillomavirus in Czech non-small cell lung cancer cases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2019;
- (29) Cardoso JC, Calonje E. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011;20(3):145-54.
- (30) Alison S, Murall CL, Bravo IG. Why Human Papillomavirus Acute Infections Matter. *Viruses*. 2017;9(10)
- (31) Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One*. 2011;6(3):e15036.
- (32) Dana A, Buchanan KM, Goss MA, Seminack MM, Shields KE, Korn S, et al. Pregnancy outcomes from the pregnancy registry of a human papillomavirus type 6/11/16/18 vaccine. *Obstet Gynecol*. 2009;114(6):1170-8.
- (33) Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1845-8.
- (34) Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, Rosenwaks Z, Ledger WJ, Witkin SS. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil Steril*. 2006;86(3):765-7.
- (35) Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126936.
- (36) Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, Ferrari E, Patrelli TS, Gangemi M, et al. Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: update on

- molecular mechanism and clinical impact--systematic review. *Biomed Res Int.* 2014;2014:230263.
- (37) Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S1-S6.
 - (38) Lowe J, Panda D, Rose S, Jensen T, Hughes WA, Tso FY, et al. Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. *Viol J.* 2008;5:150.
 - (39) Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol.* 1975;15(5):1239-47.
 - (40) Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 1996;224(1):281-91.
 - (41) Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011;6(1):45-57.
 - (42) Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.
 - (43) Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(5):525-41.
 - (44) Hindmarsh PL, Laimins LA. Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Viol J.* 2007;4:19.
 - (45) Letian T, Tianyu Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Viol J.* 2010;7:2.
 - (46) Abbate EA, Berger JM, Botchan MR. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.* 2004;18(16):1981-96.
 - (47) Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology.* 2009;384(2):360-8.
 - (48) Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009;19(2):97-113.

- (49) Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 2009;34(1):113-23.
- (50) Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van DB, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol.* 2006;59(10):1017-28.
- (51) Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol.* 2002;76(1):220-31.
- (52) McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, et al. E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 16):2810-22.
- (53) Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003;77(19):10186-201.
- (54) Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(5):1654-8.
- (55) Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002;67(4):574-82.
- (56) Fradet-Turcotte A, Bergeron-Labrecque F, Moody CA, Lehoux M, Laimins LA, Archambault J. Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J Virol.* 2011;85(17):8996-9012.
- (57) Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, Ustav E, Ustav M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000397.
- (58) Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature.* 2017;543(7645):378-84.
- (59) Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal

- and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer*. 2013;132(9):2087-94.
- (60) McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog*. 2017;13(4):e1006211.
- (61) Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD, et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol*. 2004;78(20):11172-86.
- (62) Bodelon C, Untereiner ME, Machiela MJ, Vinokurova S, Wentzensen N. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. *Int J Cancer*. 2016;139(9):2001-11.
- (63) Sen P, Ganguly P, Ganguly N. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncol Lett*. 2018;15(1):11-22.
- (64) Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005]. <http://www.svod.cz> . 3-3-2013.
- (65) Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F24-F33.
- (66) Maniar K, Wei J. *Glob. libr. women's med.* http://www.glowm.com/?p=glowm.cml/section_view&articleid=230
- (67) Roztočil A, Báca V, Bartoš P, Cvrček PČP, Doucková P, Dvořák D, et al. *Moderní gynekologie*. Praha, ČR: GRADA publishing; 2011.
- (68) Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robins Basic Pathology*. 8th ed. Edinburg: Saunders Elsevier; 2007.
- (69) Vink MA, Bogaards JA, van Kemenade FJ, de Melker HE, Meijer CJ, Berkhof J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *Am J Epidemiol*. 2013;178(7):1161-9.
- (70) Forman D, de MC, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F12-F23.

- (71) Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human papillomavirus vaccines--immune responses. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F83-F87.
- (72) Garland SM, Steben M, Sings HL, James M, Lu S, Railkar R, et al. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. *J Infect Dis*. 2009;199(6):805-14.
- (73) Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med*. 2015;372(8):711-23.
- (74) Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12180-4.
- (75) Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Gonzalez P, Kreimer AR, et al. Prevention of persistent human papillomavirus infection by an HPV16/18 vaccine: a community-based randomized clinical trial in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer Discov*. 2011;1(5):408-19.
- (76) Schiller JT, Castellsague X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F123-F138.
- (77) Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, et al. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(10):868-78.
- (78) Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(5):325-39.
- (79) Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Res*. 2018;5:46-58.
- (80) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-9.

- (81) Ondryasova H, Koudelakova V, Hajduch M. [Cervical cancer--possibilities of detection of human papillomavirus]. *Ceska Gynecol.* 2013;78(3):289-94.
- (82) Gibb RK, Martens MG. The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer. *Rev Obstet Gynecol.* 2011;4(Suppl 1):S2-S11.
- (83) Baldur-Felskov B, Munk C, Nielsen TS, Dehlendorff C, Kirschner B, Junge J, et al. Trends in the incidence of cervical cancer and severe precancerous lesions in Denmark, 1997-2012. *Cancer Causes Control.* 2015;26(8):1105-16.
- (84) Cervantes-Amat M, Lopez-Abente G, Aragonés N, Pollán M, Pastor-Barriuso R, Perez-Gomez B. The end of the decline in cervical cancer mortality in Spain: trends across the period 1981-2012. *BMC Cancer.* 2015;15:287.
- (85) de Kok IM, van der Aa MA, van BM, Siesling S, Karim-Kos HE, van Kemenade FJ, et al. Trends in cervical cancer in the Netherlands until 2007: has the bottom been reached? *Int J Cancer.* 2011;128(9):2174-81.
- (86) Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1589-97.
- (87) Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet.* 2007;370(9601):1764-72.
- (88) Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *The lancet oncology.* 2012;13(1):78-88.
- (89) Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, et al. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(7):672-82.
- (90) Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *The lancet oncology.* 2010;11(3):249-57.

- (91) Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(3):468-75.
- (92) Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol.* 2011;12(9):880-90.
- (93) Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F88-F99.
- (94) Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition--summary document. *Ann Oncol.* 2010;21(3):448-58.
- (95) Májek O, Daneš J, Zavoral M, Dvořák V, Seifert B, Suchánek Š, et al. Aktuální výsledky programů screeningu zhoubných nádorů. *Lékařské listy - Příloha Zdravotnických novin.* 2011;60(5):5-8.
- (96) van Baars R, Bosgraaf RP, ter Harmsel BW, Melchers WJ, Quint WG, Bekkers RL. Dry storage and transport of a cervicovaginal self-sample by use of the evalyn brush, providing reliable human papillomavirus detection combined with comfort for women. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):3937-43.
- (97) Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 1996;34(3):745-7.
- (98) 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.* 2007;140(1-2):32-42.
- (99) Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, Quirk JG, Stern S, Lowery CL, et al. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes.* 1997;14(1):13-7.
- (100) Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F100-F106.

- (101) Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009;124(3):516-20.
- (102) Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, et al. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(9):817-26.
- (103) Bonde J, Ejegod DM, Cuschieri K, Dillner J, Heideman DAM, Quint W, et al. The Valgent4 protocol: Robust analytical and clinical validation of 11 HPV assays with genotyping on cervical samples collected in SurePath medium. *J Clin Virol*. 2018;108:64-71.
- (104) Wentzensen N, Arbyn M, Berkhof J, Bower M, Canfell K, Einstein M, et al. Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *Int J Cancer*. 2017;140(10):2192-200.
- (105) Heideman DA, Hesselink AT, van Kemenade FJ, Iftner T, Berkhof J, Topal F, et al. The Aptima HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3653-7.
- (106) Hesselink AT, Meijer CJ, Poljak M, Berkhof J, van Kemenade FJ, van der Salm ML, et al. Clinical validation of the Abbott RealTime High Risk HPV assay according to the guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2409-10.
- (107) Poljak M, Ostrbenk A, Seme K, Ucakar V, Hillemanns P, Bokal EV, et al. Comparison of clinical and analytical performance of the Abbott Realtime High Risk HPV test to the performance of hybrid capture 2 in population-based cervical cancer screening. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1721-9.
- (108) Carozzi FM, Burrioni E, Bisanzi S, Puliti D, Confortini M, Giorgi RP, et al. Comparison of clinical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test with that of hybrid capture 2 assay in a screening setting. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1446-51.
- (109) Ejegod D, Bottari F, Pedersen H, Sandri MT, Bonde J. The BD Onclarity HPV Assay on Samples Collected in SurePath Medium Meets the International Guidelines for Human Papillomavirus Test Requirements for Cervical Screening. *J Clin Microbiol*. 2016;54(9):2267-72.

- (110) Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J, van KF, Melchers WJ, Daalmeijer NF, et al. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3983-5.
- (111) Lloveras B, Gomez S, Alameda F, Bellosillo B, Mojal S, Muset M, et al. HPV testing by cobas HPV test in a population from Catalonia. *PLoS One.* 2013;8(3):e58153.
- (112) Xu L, Ostrbenk A, Poljak M, Arbyn M. Assessment of the Roche Linear Array HPV Genotyping Test within the VALGENT framework. *J Clin Virol.* 2018;98:37-42.
- (113) Depuydt CE, Benoy IH, Beert JF, Criel AM, Bogers JJ, Arbyn M. Clinical validation of a type-specific real-time quantitative human papillomavirus PCR against the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):4073-7.
- (114) Hesselink AT, Berkhof J, van der Salm ML, van Splunter AP, Geelen TH, van Kemenade FJ, et al. Clinical validation of the HPV-risk assay, a novel real-time PCR assay for detection of high-risk human papillomavirus DNA by targeting the E7 region. *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):890-6.
- (115) Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, et al. Comparison of the clinical performance of PapilloCheck human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):797-801.
- (116) Geraets DT, Cuschieri K, de Koning MN, van Doorn LJ, Snijders PJ, Meijer CJ, et al. Clinical evaluation of a GP5+/6+-based luminex assay having full high-risk human papillomavirus genotyping capability and an internal control. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):3996-4002.
- (117) Hesselink AT, Sahli R, Berkhof J, Snijders PJ, van der Salm ML, Agard D, et al. Clinical validation of Anyplex II HPV HR Detection according to the guidelines for HPV test requirements for cervical cancer screening. *J Clin Virol.* 2016;76:36-9.
- (118) Dijkstra MG, van ND, Rijkaart DC, van Kemenade FJ, Heideman DA, Snijders PJ, et al. Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: how to manage screen-positive women? A POBASCAM trial substudy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(1):55-63.

- (119) Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Hesselink AT, Rozendaal L, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer*. 2012;130(3):602-10.
- (120) Castle PE, Sideri M, Jeronimo J, Solomon D, Schiffman M. Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis*. 2008;12(1):1-7.
- (121) Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FA, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*. 2015;136(2):178-82.
- (122) De Strooper LMA, Berkhof J, Steenbergen RDM, Lissenberg-Witte BI, Snijders PJF, Meijer CJLM, et al. Cervical cancer risk in HPV-positive women after a negative FAM19A4/mir124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int J Cancer*. 2018;143(6):1541-8.
- (123) Wright TC, Jr., Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, et al. Triage HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*. 2017;144(1):51-6.
- (124) Chrysostomou AC, Stylianou DC, Constantinidou A, Kostrikis LG. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses*. 2018;10(12)
- (125) Leeman A, Del PM, Marimon L, Torne A, Ordi J, Ter HB, et al. Reliable identification of women with CIN3+ using hrHPV genotyping and methylation markers in a cytology-screened referral population. *Int J Cancer*. 2019;144(1):160-8.
- (126) De Strooper LMA, Verhoef VMJ, Berkhof J, Hesselink AT, de Bruin HME, van Kemenade FJ, et al. Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2):341-7.
- (127) De Strooper LM, van ZM, Steenbergen RD, Bleeker MC, Hesselink AT, Wisman GB, et al. CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J Clin Pathol*. 2014;67(12):1067-71.
- (128) Hesselink AT, Heideman DA, Steenbergen RD, Gok M, van Kemenade FJ, Wilting SM, et al. Methylation marker analysis of self-sampled cervico-

- vaginal lavage specimens to triage high-risk HPV-positive women for colposcopy. *Int J Cancer*. 2014;135(4):880-6.
- (129) Schmitz M, Eichelkraut K, Schmidt D, Zeiser I, Hilal Z, Tettenborn Z, et al. Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1197.
- (130) Duskova J, Bekova A, Dvorak V, Majek O, Dusek L. [Results of the Czech National Cervical Cancer screening programme]. *Klin Onkol*. 2014;27 Suppl 2:79-86.
- (131) <http://globocan.iarc.fr/>
- (132) Cuzick J, Clavel C, Petry K, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*. 2006;119(5):1095-101.
- (133) Anttila A, Pukkala E, Söderman B, Kallio M, Nieminen P, Hakama M. Effect of organised screening on cervical cancer incidence and mortality in Finland, 1963–1995: recent increase in cervical cancer incidence. *International Journal of Cancer*. 1999;83(1):59-65.
- (134) Bulk S, Visser O, Rozendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Cervical cancer in the Netherlands 1989-1998: Decrease of squamous cell carcinoma in older women, increase of adenocarcinoma in younger women. *Int J Cancer*. 2005;113(6):1005-9.
- (135) Rossi PG, Marsili LM, Camilloni L, Iossa A, Lattanzi A, Sani C, et al. The effect of self-sampled HPV testing on participation to cervical cancer screening in Italy: a randomised controlled trial (ISRCTN96071600). *British journal of cancer*. 2011;104(2):248-54.
- (136) Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El GF. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*. 2005;6(4):204.
- (137) Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(5):303-15.
- (138) Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen?

- The international perspective. *International Journal of Cancer*. 2004;111(2):278-85.
- (139) Arbyn M, de Sanjosé S, Saraiya M, Sideri M, Palefsky J, Lacey C, et al. EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *International Journal of Cancer*. 2012;131(9):1969-82.
- (140) Snijders PJ, Verhoef VM, Arbyn M, Ogilvie G, Minozzi S, Banzi R, et al. High-risk HPV testing on self-sampled versus clinician-collected specimens: A review on the clinical accuracy and impact on population attendance in cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*. 2013;132(10):2223-36.
- (141) Gok M, van Kemenade FJ, Heideman DA, Berkhof J, Rozendaal L, Spruyt JW, et al. Experience with high-risk human papillomavirus testing on vaginal brush-based self-samples of non-attendees of the cervical screening program. *Int J Cancer*. 2012;130(5):1128-35.
- (142) Gok M, Heideman DA, van Kemenade FJ, Berkhof J, Rozendaal L, Spruyt JW, et al. HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening: cohort study. *BMJ*. 2010;340:c1040.
- (143) Ondryasova H, Koudelakova V, Drabek J, Vanek P, Slavkovsky R, Hajduch M. Utilization of self-sampling kits for HPV testing in cervical cancer screening - pilot study. *Ceska Gynekol*. 2015;80(6):436-43.
- (144) Preisler S, Rebolj M, Untermann A, Ejegod DM, Lynge E, Rygaard C, et al. Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche cobas HPV real-time PCR assay. *PLoS One*. 2013;8(3):e59765.
- (145) Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods*. 2009;156(1-2):77-83.
- (146) Petignat P, Faltin DL, Bruchim I, Tramér MR, Franco EL, Coutlée F. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecologic oncology*. 2007;105(2):530-5.

- (147) Tachezy R, Smahelova J, Kaspirkova J, Salakova M. Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One*. 2013;8(11):e79156.
- (148) Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2015- 04-08. Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). 2015;
- (149) Munoz N, Bosch FX, de SS, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
- (150) Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El GF, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):321-2.
- (151) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(14):1072-9.
- (152) Soderlund-Strand A, Kjellberg L, Dillner J. Human papillomavirus type-specific persistence and recurrence after treatment for cervical dysplasia. *J Med Virol*. 2014;86(4):634-41.
- (153) Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol*. 2006;103(1):12-7.
- (154) Arbyn M, Castle PE. Offering Self-Sampling Kits for HPV Testing to Reach Women Who Do Not Attend in the Regular Cervical Cancer Screening Program. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(5):769-72.
- (155) Jaworek H, Koudelakova V, Drabek J, Vrbkova J, Zborilova B, Oborna I, et al. A Head-to-Head Analytical Comparison of Cobas 4800 HPV, PapilloCheck HPV Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical and Cervicovaginal Swabs. *J Mol Diagn*. 2018;20(6):849-58.
- (156) Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer*. 2013;108(4):908-13.

- (157) Park Y, Lee E, Choi J, Jeong S, Kim HS. Comparison of the Abbott RealTime High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 assays to direct sequencing and genotyping of HPV DNA. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2359-65.
- (158) Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, et al. VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *J Clin Virol.* 2016;76 Suppl 1:S14-S21.
- (159) Lindemann ML, Dominguez MJ, de Antonio JC, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, et al. Analytical comparison of the cobas HPV Test with Hybrid Capture 2 for the detection of high-risk HPV genotypes. *J Mol Diagn.* 2012;14(1):65-70.
- (160) Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):449-59.
- (161) Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de SS. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789-99.
- (162) Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de SS, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer.* 2012;131(10):2349-59.
- (163) Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, Mikyskova I, Smahel M, Van RM, et al. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol.* 1999;58(4):378-86.
- (164) Arbyn M, Verdoordt F, Snijders PJ, Verhoef VM, Suonio E, Dillner L, et al. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014;15(2):172-83.

7. Seznam publikací autora

7.1 Původní a přehledové práce

1. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Hajduch M. Karcinom cervixu-možnosti detekce lidského papilomaviru. Ceska Gynekol. 2013, 78(3), 289-294.
2. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Drabek J, Vanek P, Slavkovsky R, Hajduch M. Pilotní studie pro využití samoodběrové soupravy a molekulární diagnostiky HPV infekce pro skrínink karcinomu děložního čípku. Ceska Gynekol. 2015;80(6):436-43.
3. **Jaworek H**, Koudelakova V, Drabek J, Vrbkova J, Zborilova B, Oborna I, et al. A Head-to-Head Analytical Comparison of Cobas 4800 HPV, PapilloCheck HPV Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical and Cervicovaginal Swabs. J Mol Diagn. 2018;20(6):849-58.
4. **Jaworek H**, Koudelakova V, Slavkovsky R, Drabek J, Hajduch M. The absence of high-risk human papillomavirus in Czech non-small cell lung cancer cases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2019.

7.2. Publikovaná abstrakta

1. Oborna I, **Ondryasova H**, Zborilova B, Brezinova J, Vrbkova J. Does presence of human papillomavirus (HPV) infection influence the results of in vitro fertilization (IVF) treatment? Fertil Steril 2016; 106: e355–e356.
2. Koudelakova V, **Jaworek H**, Slavkovsky R, Drabek J, Potockova J, Vrbkova J, Hajduch M. Human papillomavirus infection in Czech non-small cell lung cancer patients, Abstrakt book: IPVC 2018, 32nd International Papillomavirus Conference, Sydney, 2-6. 10.2018.
3. Koudelakova V, **Jaworek H**, Hajduch M. Human papillomavirus (HPV) and HPV-related diseases, XIV. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 19.11.-21.11.2018 Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
4. Koudelakova V, **Jaworek H**, Oborna I, Zborilová B, Brezinova J, Ruzickova D, Vrbkova J, Kourilova P, Hajduch M. HPV infection in women and men from infertile couples and gamet donors, Abstrakt book:EUROGIN 2018, International Multidisciplinary HPV Congress, Lisbon, 2.-5.12.2018

7.3. Seznam přednášek a posterů přednesených autorem na veřejných odborných fórech

1. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Pereira M, Woodman C, Hajduch M. Míra exprese epigenetických modulátorů v karcinomu cervixu. In: Sborník abstrakt,

- XXXVII. Brněnské onkologické dny a XXXVII. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno, 18.-19. dubna 2013. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2013, 93-94. ISBN 978-80-904596-9-4.
2. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Hajduch M. New options of cervical cancer screening: self-sampling and PCR based HPV detection. In: Sborník abstrakt, Konference chemické biologie a genetiky 2013. Malá Morávka-Karlov pod Pradědem, 12.-14. květen 2013, 14-15.
 3. **Ondryášová H**, Oborná I, Březinová J, Koudeláková V, Hajdúch M. HPV infekce, víme o ní dost? Informovanost školáků v ČR o HPV, In: Sborník abstrakt, 12. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 23. sympozium Asistované reprodukce, Brno, 12. –13. 11. 2013,
 4. **Ondryášová H**, Březinová J, Koudeláková V, Oborná I, Sobek A, Filipčíková R., Doležal J, Novotný J, Hajdúch M. Prevalence HPV infekce u neplodných párů a dárců - pilotní studie, In: Sborník abstrakt, 12. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 23. sympozium Asistované reprodukce, Brno, 12. – 13. 11. 2013.
 5. **Ondryášová H**, Koudeláková V, Hajdúch M. Detekce HPV DNA v cervikovaginálním stěru- Alternativní možnosti screeningu karcinomu cervixu, In: Sborník abstrakt, IX. Diagnostic Predictive and Experimental ONcology Days, Olomouc, 21.-22.11.2013, 26.
 6. **Ondryášová H**, Koudeláková V, Hajdúch M. Nové možnosti screeningu cervikálního karcinomu – Samoodběr a HPV DNA detekující metody, In: Sborník abstrakt, Konference vědeckých prací studentů DSP na LF UP v Olomouci, Olomouc, 16.-17.12.2013, 34.
 7. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Hajduch M. Assay distinguishing integrated and episomal form of HPV16, 18, 31 and 56 Sborník abstrakt, XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 2.-3.12.2014. Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
 8. **Ondryášová H**, Koudeláková V, Slavkovský R, Věnsková V, Hajdúch M. Assay rozlišující integrovanou a epizomální formu HPV16, 18, 31 a 56: Sborník abstrakt, Prague ONCO, Praha, 27.-29.1.2015. Praha, 1. LF UK a Onkologická klinika VFN, 2014, 29.
 9. **Ondryášová H**, Koudeláková V, Slavkovský R, Věnsková V, Drábek J, Hajdúch M. Assay pro detekci integrované a epizomální formy HPV16, 18, 31 a 56 Sborník abstrakt, Brněnské onkologické dny a XXXIX. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno, 8. -10.4. dubna 2015. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2015, 54. ISBN 978-80-86793-32-0. BEZ IF.
 10. **Ondryášová H**, Koudeláková V, Slavkovský R, Věnsková V, Drábek J, Hajdúch M. Assay pro rozlišení integrované a epizomální formy HPV16, 18, 31 a 56, Sborník abstrakt, **XV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků 2015, Milovy, 12.-15.5.2015**
 11. **Ondryasova H**, Zborilová B, Koudelakova V, Oborna I, Brezinova J, Vrbkova J, Hajduch M. Prevalence of HPV infection in oocyte donors and women treated for

- infertility: a prospective study, Abstrakt book, 31st Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology Lisbon, 14.-17.6.2015, European Society of human Reproduction and Embryology 2015-2017.
12. **Ondryasova H**, Koudelakova V , Drabek J, Oborna I, Brezinova J, Zborilová B, Vrbkova J, Hajduch M. Comparison of HPV detection Methods: cobas 4800 HPV, PapilloCheck and LMNX Genotyping Kit HPV GP, Abstrakt book: HPV 2015, 30th International Papillomavirus Conference, Lisbon, 17-21.9.2015.
 13. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Drabek J, Slavkovsky R, Vanek P, Hajduch M. Pilot Study for the Utilization of Self-sampling Devices for HPV Testing iv Cervical Cancer Screening. Abstrakt book, XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 2.-3.12.2015. Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
 14. **Ondryasova H**, Koudelakova V , Drabek J, Oborna I, Brezinova J, Zborilová B, Vrbkova J, Hajduch M. Comparison of HPV DNA Detection Methods: Cobas 4800, PapilloCheck HPV-Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP. Abstrakt book, XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 2.-3.12.2015. Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
 15. **Ondryasova H**, Koudelakova V , Drabek J, Oborna I, Brezinova J, Zborilová B, Vrbkova J, Hajduch M. Comparison of HPV DNA Detection Methods: cobas[®] 4800 HPV Test, PapilloCheck[®] HPV-Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP Sborník abstrakt, XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 2.-3.12.2015 Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
 16. **Ondryasova H**, Koudelakova V, Drabek J, Slavkovsky R, Vanek P, Hajduch M. Utilization of Self-sampling Devices for HPV Testing in Cervical Cancer Screening – Pilot study Sborník abstrakt, Prague ONCO, Praha, 25-27.1.2016. Praha, 1. LF UK a Onkologická klinika VFN, 2014, 29.
 17. **Jaworek H**, Zborilová B, Oborna I, Brezinova J, Koudelakova V, Vrbkova J, Hajduch M. Prevalence of HPV Infection in Oocyte Donors and Women Treated for Infertility: a Prospective Study Sborník abstrakt, XII. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 30.12.-1.12.2016 Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
 18. **Jaworek H**, Koudelakova V, Drabek J, Slavkovsky R, Vanek P, Hajduch M. Comparison of cobas 4800 HPV. PapilloCheck HPV-screening, and LMNX genotyping kit for detection of HPV DNA in cervical and cervicovaginal swabs Sborník abstrakt, Prague ONCO, Praha, 25.-27.1.2017. Praha, 1. LF UK a Onkologická klinika VFN.
 19. **Jaworek H**, Potockova J, Slavkovsky R, Koudelakova V, Drabek J, Trojanec R, Hajduch M. Detection of HPV infection in non-small cell lung carcinoma – retrospective study Sborník abstrakt, Brněnské onkologické dny a XXXIX. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno, 26.-28.4.2017. Brno: Masarykův onkologický ústav.

20. **Jaworek H**, Zborilová B, Oborna I, Koudelakova V, Vrbkova J, Dolezal J, Hajduch M. Prevalence of HPV infection in sperm donors and men treated for infertility: a prospective study.: Sborník abstrakt, XXIII. Symposium biologie a imunologie reprodukce s mezinárodní účastí, Třešť, 18.-20.5.2017, Praha, Biotechnologický ústav akademie věd České republiky.
21. **Jaworek H**, Zborilová B, Oborna I, Koudelakova V, Vrbkova J, Dolezal J, Hajduch M. Prevalence of HPV infection in sperm donors and men treated for infertility: a prospective study.: Abstrakt book 2017. IMTM REACTOR, Pastviny, 14.-16.6.2017, Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
22. **Jaworek H**, Kubanova K, Slavkovsky R, Koudelakova V, Drabek J, Hajduch M. Pitfalls in HPV68a detection. Sborník abstrakt, Prague ONCO, Praha, 24.-26.1.2018. Praha, 1. LF UK a Onkologická klinika VFN.
23. **Jaworek H**, Oborna I, Zborilová B, Brezinova J, Ruzickova D, Koudelakova V, Vrbkova J, Hajduch M. Prevalence of HPV Infection in Sperm Donors and Men from Infertile Couples in the Czech Republic.:34th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain, 1.-4.7.2018, European Society of human Reproduction and Embryology 2018.
24. **Jaworek H**, Kubanova K, Slavkovsky R, Koudelakova V, Drabek J, Hajduch M. Pitfalls in HPV68a detection, Abstrakt book: IPVC 2018, 32nd International Papillomavirus Conference, Sydney, 2-6. 10.2018.
25. **Jaworek H**, Koudelakova V, Oborna I, Zborilová B, Brezinova J, Ruzickova D, Vrbkova J, Kourilova P, Hajduch M. Human papillomavirus infection and fertility alternations. Sborník abstrakt, XIV. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Olomouc, 19.11.-21.11.2018 Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc.
26. **Jaworek H**, Kubanova K, Slavkovsky R, Drabek J, Koudelakova V, Hajduch M. Pitfalls in HPV68a detection, Abstrakt book:EUROGIN 2018, International Multidisciplinary HPV Congress, Lisbon, 2.-5.12.2018.
27. **Jaworek H**, Kubanova K, Slavkovsky R, Drabek J, Koudelakova V, Hajduch M. Pitfalls in HPV68a detection. Sborník abstrakt, Prague ONCO, Praha, 23.-25.1.2019. Praha, 1. LF UK a Onkologická klinika VFN.

8. Přílohy

Příloha 1.

Karcinom cervixu – možnosti detekce lidského papilomaviru

Cervical cancer – possibilities of detection of human papillomavirus

Ondryšová H., Koudeláková V., Hajdůch M.

Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN, Olomouc, vedoucí doc. MUDr. M. Hajdůch, Ph.D.

ABSTRACT

Objective: To describe the possibility of detection of HPV DNA in cervical cancer.

Design: Review.

Setting: Institute of Molecular and Translational Medicine, Laboratory of Experimental Medicine, Palacky University and University Hospital Olomouc.

Methods: Human papillomavirus (HPV) is the cause of many cancers, especially cervical cancer. Current cervical cancer screening is based on cytological examination, which is followed by HPV DNA diagnostics only in cases with abnormal results or uncertain significance. Methods used for HPV detection are often based on PCR

reaction followed by genotyping (complete or partial). HPV DNA diagnostics isn't currently included into the primary cervical cancer screening in the Czech Republic although it has higher sensitivity than cytology. **Conclusion:** Inclusion of HPV DNA testing into the primary cervical cancer screening would significantly increase its sensitivity and thus would help to reduce the morbidity and mortality of this disease in Czech population.

KEYWORDS

human papillomavirus – HPV – cervical carcinoma – cervical cancer screening – cytology – LBC – PCR

SUMMARY

Cle studie: Popsat možnosti detekce HPV DNA u cervikálního karcinomu.

Typ studie: Přehledový článek.

Název a sídlo pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř experimentální medicíny, LF UP a FN Olomouc.

Metodika a výsledky: Lidský papilomavirus (HPV) je příčinou řady nádorových onemocnění, především karcinomu cervixu. Současný screening karcinomu cervixu je založen na cytologickém vyšetření, které je v případech s abnormálním výsledkem nejčastěji významu doplněno HPV DNA diagnostikou. HPV detekční metody jsou

nejčastěji založeny na PCR reakci s následnou genotypizací (úplnou či částečnou). Přestože má HPV DNA diagnostika vyšší senzitivitu v porovnání s cytologií, není v současné době v České republice zahrnuta do primárního screeningu cervikálního karcinomu. **Závěr:** Zařazení HPV DNA testů do primárního screeningu karcinomu cervixu by významně zvýšilo jeho senzitivitu, a napomohlo by tak ke snížení morbidity i mortality tohoto onemocnění v české populaci.

KLÍČOVÁ SLOVA

lidský papilomavirus – HPV – karcinom cervixu – screening cervikálního karcinomu – cytologie – LBC – PCR

Čes. Gynék, 2013, 78, č. 3, s. 289–294

PREVALENCE HPV INFECE

Infekce lidským papilomavirem (HPV) patří mezi nejrozšířenější pohlavně přenosné choroby. HPV je vysoce infekční, často bezpříznakové onemocnění s inkubační dobou 1–8 měsíců. Prevalence HPV infekce se v jednotlivých studiích značně liší v závislosti na geografii, věku zkoumané po-

pulace a citlivosti použitých detekčních metod. Vyhodnocení celoživotní prevalence ukazuje, že s HPV infekcí se během svého života setká přibližně 80 % sexuálně aktivních jedinců. Nejčastěji k tomu dojde krátko po začátku sexuálního života. Nejvyšší prevalence je ve věkové skupině do 25 let a je výrazně vyšší u skupiny jedinců se 3 a více

Tab. 1 Rozdělení HPV podle míry onkogenního vlivu na vznik karcinomu cervixu [18]

| Klasifikace | HPV podtypy |
|-----------------------------|--|
| Onkogenní (high-risk) HPV | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 |
| Pravděpodobně onkogenní HPV | 23, 53, 66 |
| Neonkogenní (low-risk) HPV | 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108 |
| HPV s neurčitým rizikem | 34, 57, 83 |

sexuálními partnery. Ve většině případů je HPV infekce během 12-18 měsíců eliminována imunitním systémem (clearance virové DNA). Přibližně u 10 % HPV pozitivních jedinců dochází k persistenční HPV infekci a u méně než 1 % z nich k vývoji cervikálního karcinomu [6, 9, 11]. HPV se podle míry onkogenního potenciálu dělí na high risk (hrHPV) a low risk (lrHPV). HPV subtypy jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce 1. Pro vznik karcinomu cervixu je nezbytná infekce alespoň jedním onkogenním podtypem hrHPV [7]. V HPV indukované karcinogenezi je zásadním krokem integrace HPV DNA do lidského genomu, která vede k chromozomální instabilitě, fragmentaci HPV DNA v oblasti E2 genu (v některých případech rovněž E1 nebo L1 genu), nadměrné expresi E6 a E7 onkogenu a progresi onemocnění. K časté integraci dochází u HPV16 a 18, které jsou zároveň nejvíce onkogenní a zodpovědné za většinu případů karcinomu cervixu [17, 23, 24].

KARCINOM CERVIXU

Celosvětově je karcinom cervixu u žen třetím nejčastějším nádorovým onemocněním a čtvrtou nejčastější příčinou jejich úmrtí na nádorové onemocnění. K 85 % případů karcinomu cervixu a s ním spojených úmrtí dochází v rozvojových zemích, kde neexistuje screeningový program, který by umožnil včasnou detekci prekanceróz nebo časných stadií karcinomu [14, 19]. V České republice je každý rok nově diagnostikováno přes 1000 nových případů karcinomu cervixu a přibližně 400 pacientek s touto diagnózou ročně zemře. Věkově specifická incidence začíná výrazně růst od 29. roku života, vrcholu dosahuje ve věkové skupině 40-44 let [10]. Vztah mezi infekcí hrHPV podtypy a karcinomem cervixu je nezpochybnitelný, 99,7 % karcinomů cervixu je HPV pozitivních. Nejrozšířenější hrHPV podtypy jsou HPV16 a 18, vyskytující se u přibližně 70 % karcinomů cervixu [7, 24].

Globálně je infekce hrHPV příčinou přibližně 10 % karcinomů vyskytujících se u žen a více než 5 % všech nádorových onemocnění [14, 19]. Mimo

karcinomu cervixu je infekce hrHPV spojena se vznikem karcinomu vulvy, vagíny, penisu, konečníku, kůže, dutiny ústní, orofaryngu a laryngu. HPV DNA byla také detekována v nádorech ezofagu, plic, dutého střeva, vaječníků, prsu, prostaty, močového měchýře a nosní dutiny. Vliv hrHPV infekce na vznik těchto typů nádorů však není zcela objasněn [19].

SCREENING CERVIKÁLNÍHO KARCINOMU V ČESKÉ REPUBLICE

V České republice je screening karcinomu děložního hrdla upraven v zákonem ministerstva zdravotnictví č. 07/2007. Podle doporučení ministerstva zdravotnictví by mělo být cytologické screeningové vyšetření prováděno dospělým ženám při pravidelné gynekologické prohlídce jednou ročně. Pro screeningové vyšetření se používá cervikální cytologie (Pap test nebo jeho modifikace), kdy jsou buňky z odběrového kartáčku naneseny na sklo, obarveny a hodnoceny pod mikroskopem. Pro hodnocení nálezu cervikální cytologie je v současné době platný systém Bethesda 2001 [20]. Zdokonalením Pap testu je Liquid-based cytology (LBC), kdy jsou buňky stěru solubilizovány ve vhodném médiu a následně naneseny na mikroskopické sklo. LBC zvyšuje senzitivitu vyšetření díky odstranění rušivého vlivu krve či hlenu při klasickém Pap testu, test je navíc lépe hodnotitelný díky rovnoměrnému rozložení buněk v jedné vrstvě a je použitelný k dalšímu testování, např. k HPV DNA diagnostice.

Problémem cervikální cytologie je vysoká míra falešné negativity, která je udávána u 15-35 % CINIII (cervical intraepithelial neoplasia, grade 3) a karcinomu cervixu [12]. Mnohem efektivnější jsou metody založené na detekci HPV DNA, které jsou schopné zachytit přes 99 % prekancerotických změn a nádorů [5].

HPV DNA SCREENING

Přínos HPV DNA diagnostiky byl jednoznačně potvrzen klinickou studií ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV diagnostics). Do studie bylo zařazeno více než 47 000 žen starších 21 let, u nichž byly srovnávány výsledky LBC a HPV DNA diagnostiky. Tato studie ukázala na vyšší citlivost HPV DNA diagnostiky na úkor nižší specifity, která byla pravděpodobně ovlivněna zařazením žen nižších věkových skupin. Vzhledem k vysokému výskytu HPV infekce a následně clearance viru u mladších žen by měly být pomocí HPV DNA diagnostiky vyšetřovány pouze ženy nad 30 let. Ideální screening by měl zahrnovat jak LBC, tak HPV testování [4, 21]. HPV testování poskytuje vel-

mi vysokou negativní prediktivní hodnotu (NPV), která při souběžném použití cytologie umožňuje prodloužit screeningový interval až na 6 let [8]. V současné době jsou v České republice k HPV DNA diagnostice zasílány pouze případy s abnormální cytologií s neznámým významem (atypical squamous cells of undetermined significance; ASC-US), vyskytující se přibližně u 4 % případů [1].

Zavedení celoplošného screeningu celosvětově výrazně snížilo incidenci i mortalitu cervikálního karcinomu. Česká republika bohužel stále patří mezi státy s nedostatečně funkčním screeningovým programem, kdy se screeningu účastní přibližně polovina cílové populace [16]. Řešením pro ženy, které z nějakého důvodu nenavštěvují gynekologa, by mohlo být použití samoodběrové sady v podobě tamponů, samoodběrových cervikovaginálních kartáčků nebo laváží. V několika studiích byla prokázána vysoká shoda hrHPV detekce mezi vzorky získanými samoodběrem a cervikálním stěrem provedeným gynekologem [3, 22].

HPV DNA TESTY S IVD CERTIFIKACÍ

Při HPV DNA testu může být detekována pouze přítomnost některého z hrHPV nebo může docházet k částečné či úplné genotypizaci. Většina metod detekujících HPV DNA je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR), která využívá primery detekující různé části HPV genomu, jako MY09/MY11, GP5+/6+, SPF10 (detekce HPV genu L1), CP primery (detekce HPV genu E1)[2,15] nebo pU primery (detekce HPV genů E6 a E7) [13]. Pomocí klasické PCR reakce se specifickými HPV primery je možné detekovat pouze přítomnost HPV DNA, nikoli odlišit jednotlivé podtypy. Pro genotypizaci jsou nejčastěji použity metody založené na značení primerů (biotin) a následné ELISA reakci (enzyme-linked immunosorbent assay), real-time PCR se značenými průbarami, popř. hybridizační PCR produktů se specifickými oligonukleotidovými průbarami fixovanými na stripu (line blot) nebo čipu (microarray). Jednotlivé metodiky, které jsou certifikovány jako in vitro diagnostikum (CE-IVD) a schváleny pro detekci HPV u cervikálních buněk jsou shrnuty v tabulce 2.

Mnoho metod umožňuje detekci přítomnosti hrHPV podtypů, některé z nich umožňují jejich úplnou genotypizaci. Z klinického hlediska je nejvýznamnější detekce hrHPV a genotypizace nejvíce onkogenních podtypů HPV16 a 18 [7]. Některé firmy (Roche, Seegene) proto uvedly na trh systémy určené k částečné genotypizaci HPV. Jde většinou o automatizované metody založené na real-time PCR s průbarami specifickými pro HPV16 a 18 a průbami pro ostatní typy HPV. Tyto

metody se zdají být pro klinickou praxi nejvhodnější, poskytují informaci o přítomnosti širokého spektra hrHPV, blíže specifikují přítomnost HPV16 a 18, jsou automatizované, tedy do značné míry eliminují chyby způsobené lidským faktorem a umožňují rychlou analýzu vysokého počtu vzorků v krátkém čase. Některé systémy jsou také spojené s automatickou izolací DNA ze vzorku (např. Cobas 4800, Roche). Téměř všechny HPV DNA testy jsou kompatibilní s odběrovými médii PreservCyt a SurePath.

Problémem většiny HPV DNA testů může být jejich cílení na HPV gen L1. Při integraci viru do lidského genomu v některých případech dochází k rozpadu fragmentu L1. V těchto případech je možnost falešně negativní výsledků, a může tak dojít k opomínutí nejzávažnějších případů [7, 23, 24].

ZÁVER

HPV DNA testy jsou vhodné pro primární screening karcinomu cervixu, mají vyšší senzitivitu než cytologické vyšetření, nulovou subjektivitu a je možné je spolehlivě automatizovat. Zahnutí HPV DNA diagnostických metod do rutinního screeningového programu by výrazně snížilo morbiditu i mortalitu karcinomu děložního čípku. HPV DNA diagnostika je ideální metodikou primárního cervikálního screeningu pro ženy nad 30 let, která však v současné době není v České republice hrazená z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Velkým problémem screeningového programu je rovněž malá účast českých žen, se kterou souvisí vysoký výskyt karcinomu cervixu v porovnání se zeměmi západní Evropy. V současné době se nabízí dvě možnosti, a to adresně zavést k vyšetření a zavedení kvalitního vyšetření vzorků získaných samoodběrem.

**Práce byla podpořena granty IGA
UP LF_2015_015 a Biomedreg
CZ.1.05/2.1.00/01.0030.**

LITERATURA

1. Arbyn, M., Anttila, A., Jordan, J., et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second ed. – summary document. *Ann Oncol*, 2010, 21, p. 448–458.
2. Baay, M.F., Quint, W.G., Koudstaal, J., et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*, 1996, 34, p. 745–747.
3. Castle, P.E., Gage, J.C., Partridge, E.E., et al. Human papillomavirus genotypes detected in clinician-collected and self-collected

- specimens from women living in the Mississippi Delta. *BMC Infect Dis*, 2013, 13, p. 5.
4. **Castle, PE., Stoler, MH., Wright, TC., Jr., et al.** Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*, 2011, 12, p. 880-890.
 5. **Chalwongkot, A., Pientong, C., Ekalaksananan, T., et al.** Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2007, 8, p. 279-282.
 6. **de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., et al.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7, p. 453-459.
 7. **de Sanjose, S., Quint, WG., Alemany, L., et al.** Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 2010, 11, p. 1048-1056.
 8. **Dillner, J., Rebolj, M., Birembaut, P., et al.** Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*, 2008, 337, p. 1754.
 9. **Dunne, EF., Nielson, CM., Stone, KM., et al.** Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis*, 2006, 194, p. 1044-1057.
 10. **Dušek, L., Muzik, J., Kubáček, M., et al.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005]. [cit. 2013-3-18]. Dostupný z WWW: [http://www.svd.cz. Verze 7.0 \(2007\). ISSN 1802-981](http://www.svd.cz. Verze 7.0 (2007). ISSN 1802-981).
 11. **Fernandes, JV., Araújo, JMG., Fernandes, TAAM.** Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J Clin Trials*, 2013, 5, p. 1-12.
 12. **Gibb, RK., Martens, M.G.** The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer. *Rev Obstet Gynecol*, 2011, 4, p. 52-57.
 13. **Hermonat, PL., Han, L., Wendol, PJ., et al.** Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes*, 1997, 14, p. 13-17.
 14. **Jemal, A., Bray, F., Center, MM., et al.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61, p. 69-90.
 15. **Joney, C., Takacs, T., Sebo, A., et al.** Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods*, 2007, 140, p. 32-42.
 16. **Májek, O., Daneš, J., Zavoral, M., et al.** Aktuální výsledky programů screeningu zhoubných nádorů. *Lékařské listy - Příloha Zdravotnických novin*, 2011, 60, p. 5-8.
 17. **Morris, BJ.** Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43, p. 1171-1177.
 18. **Munoz, N., Bosch, FX. de, et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348, p. 518-527.
 19. **Parkin, DM.** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 2006, 118, p. 3030-3044.
 20. **Solomon, D., Davey, D., Kumran, R., et al.** The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287, p. 2114-2119.
 21. **Stoler, MH., Wright, TC. Jr., Sharma, A., et al.** High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol*, 2011, 135, p. 468-475.
 22. **van Baars, R., Bosgraaf, RP., ter Harmsel, BW., et al.** Dry storage and transport of a cervicovaginal self-sample by use of the evalyn brush, providing reliable human papillomavirus detection combined with comfort for women. *J Clin Microbiol*, 2012, 50, p. 3937-3943.
 23. **Vinokurova, S., Wentzson, N., Kraus, I., et al.** Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*, 2008, 68, p. 307-313.
 24. **Walboomers, JM., Jacobs, MV., Manos, MM., et al.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, 189, p. 12-19.

Mgr. Hana Ondryášová
 Laborator experimentální medicíny
 Ústav molekulární a translační medicíny
 LF UP a FN
 Hněvotinská 5
 779 00 Olomouc
 e-mail: ondryasova.hana@gmail.com

Pilotní studie pro využití samoodběrové soupravy a molekulární diagnostiky HPV infekce pro skrínink karcinomu děložního čípku

Utilization of self-sampling kits for HPV testing in cervical cancer screening – pilot study

Ondryášová H., Koudeláková V., Drábek J., Vanek P., Slavkovský R., Hajdúch M.

Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN, Kladr MedChemBio, Olomouc-Holice, vedoucí doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

ABSTRACT

Objective: To get initial experience with alternative sampling (self-sampling) for HPV testing as the means of cervical cancer screening program.

Design: Original work.

Setting: Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc.

Methods: Based on expression of interest, 215 self-sampling kits were posted to women. Evalyn® Brush Vaginal swabs obtained by self-sampling were analyzed for the presence of HPV infection by Cobas 4800 HPV (Roche) followed by genotyping using PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One). Sixty women randomly chosen from our sample were sent a questionnaire focused on their experience with self-sampling.

Results: One hundred seventy-four of 215 (81%) distributed self-sampling devices have been delivered to analysis. All cervicovaginal swabs were sampled correctly and it was possible to analyze them by Cobas 4800 HPV test. Similarly, 98% (171/174) samples were analyzable by PapilloCheck® HPV-Screening. One hundred twenty-five (72%) of 174 tested samples were HPV negative. Low risk HPV infection was detected only in 7 samples (4%), and high risk HPV (hrHPV)

infection was present in 42 samples (24%). The most frequently detected hrHPV genotypes were HPV16 (11/42; 26%) and HPV53 (6/42; 14%). HrHPV co-infection was detected in 10 cases, in 5 of them IrHPV infection was found also.

Of the 60 questionnaires, 48 (80%) were returned. From this group, 47 (98%) women rated their experience with self-sampling device as good to excellent. User manual of self-sampling device was considered good to excellent by all women (100%). All women also rated the convenience of self-sampling device using as good to excellent. As expected, most of the women (n = 42 [88%]) preferred self-sampling to physician sampling.

Conclusion: Cervicovaginal self-sampling leads to valid results of HPV screening using two molecular genetics methods and was accepted by Czech women very well. The self-sampling as an opportunity to participate in cervical cancer screening could increase the attendance of the screening program and would help to reduce the incidence and mortality for this disease in the Czech population.

KEYWORDS

cervical cancer, cervical cancer screening, self-sampling, human papillomavirus, HPV, cytology, PCR

SOUHRN

Cíle studie: Získat prvotní zkušenosti s alternativním odběrem vzorku (samoodběrem) pro testování přítomnosti HPV za účelem skríninku karcinomu děložního čípku.

Typ studie: Původní práce.

Název a sídlo pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc.

Metodika: Na základě předem projevového zájmu o HPV vyšetření byly 215 ženám zaslány samoodběrové sady

Evalyn® Brush. Cervikovaginální stěry obdržené potrubou byly analyzovány v naší laboratoři na přítomnost HPV infekce systémem Cobas 4800 HPV (Roche) s následnou genotypizací pomocí PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One). Náhodně vybraným 60 ženám z našeho souboru byl společně se samoodběrovou sadou zaslán dotazník zaměřený na jejich zkušenost se samoodběrem.

Výsledky: Z rozeslaných 215 samoodběrových sad bylo k analýze doručeno 174 (81 %) cervikovaginálních stěrů. Všechny vzorky byly odebrány správně a bylo možné je vyšetřit Cobas 4800 HPV testem. PapilloCheck® HPV-Screening systémem bylo možné za zisku validního výsledku vyšetřit 98 % vzorků (171/174).

Z vyšetřených 174 vzorků bylo 125 vzorků (72 %) HPV negativních, u 7 vzorků (4 %) byla detekována pouze přítomnost nízkorizikové HPV infekce a u 42 vzorků (24 %) jsme detekovali přítomnost vysokorizikové HPV infekce.

Nejčastěji detekovanými vysoce rizikovými genotypy byly HPV 16 (11/42; 26 %) a HPV 53 (6/42; 14 %). V 10 případech byla detekována současná infekce několika hrHPV, v 5 z nich byla nalezena současná infekce hrHPV.

Z 60 odeslaných dotazníků bylo zasláno zpět 48 (80 %). Z této skupiny ohodnotilo svou zkušenost se samoodběrovou sadou jako dobrou až výbornou 47 (98 %) dotázných žen. Návod k použití Evalyn® Brush byl považován za dobrý až vynikající všemi ženami (100 %). Všechny ženy také ohodnotily použití samoodběrové sady jako dobré až vynikající. Podle očekávání většina žen z našeho souboru (n = 42 [88 %]) dává přednost samoodběru před odběrem vzorku lékařem.

Závěr: Samoodběr cervikovaginálního stěru vede při použití dvou testovaných molekulárně genetických metod k validním výsledkům a byl českými ženami velmi dobře přijat. Zavedení samoodběru jako způsobu účasti na cervikálním skríninku by mohlo vést ke zvýšení návštevnosti skríninkového programu karcinomu děložního čípku, a napomohlo by tak ke snížení incidence i mortality tohoto onemocnění v české populaci.

KLÍČOVÁ SLOVA

karcinom cervixu, skrínink cervikálního karcinomu, samoodběr, lidský papilomavirus, HPV, cytologie, PCR

Čes. Gynek, 2015, 80, č. 6, s. 436–443

ÚVOD

V současné době je celosvětově karcinom děložního čípku s 528 000 nově diagnostikovanými případy ročně sedmá nejčastější nádorové onemocnění a čtvrtá nejčastější nádorové onemocnění u žen. Každý rok na toto onemocnění zemře 266 tisíc žen, což odpovídá 7,5 % ze všech úmrtí žen na nádorová onemocnění. V České republice byl karcinom cervixu v roce 2011 nově diagnostikován 1023 ženám a 399 žen na toto onemocnění zemřelo. Onemocnění postihuje především ženy v produktivním věku, přibližně 50 % incidence a 30 % mortality tvoří skupina žen mladších 50 let [11, 15, 23].

Zavedení cytologického screeningového programu, využívajícího tzv. Pap (Papanicolaou) testu, popř. liquid-based cytology (LBC), vedlo v řadě zemí k dramatickému snížení incidence a mortality karcinomu děložního čípku [4, 19]. V České republice došlo během posledních 10 let k poklesu incidence karcinomu děložního hrdla o 14 % a poklesu úmrtnosti dokonce o 27 % [9]. Pomocí skríninku založeného na cytologickém vyšetření se podařilo především snížit incidenci spinocelulárního karcinomu cervixu (SCC), který představuje až 85 % všech cervikálních karcinomů. Incidenci adenokarcinomu, vzhledem k jeho lokalizaci, skrínink významně neovlivnil [1, 6]. Pravidelným preventivním cytologickým vyšetřením (každých 12 měsíců) lze docílit negativní prediktivní hodnoty 99,3 % a pozitivní prediktivní hodnoty 27,5 % [21].

Zásadním problémem skríninkového programu zůstává nízké pokrytí cílové populace žen (v ČR 55 %

žen ve věku 25–59 let). Ženy, které preventivní vyšetření nepodstupují (45 %), se podílejí 50 procenty na diagnostikovaném karcinomu děložního hrdla [11, 24]. Přestože cytologický skrínink dosahuje specifity 96,3 %, jeho nevýhodou je nízká senzitivita (53 %) a značná subjektivita interpretace, vyžadující striktní kontrolu kvality cytologických laboratoří [9].

Pro vznik přednádorových i nádorových změn na děložním čípku je nezbytná infekce vysoce rizikovým genotypem HPV (hrHPV, jedná se o subtypy/genotypy HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 66) [8, 28]. HPV 16 a HPV 18 jsou genotypy s největším onkogenním potenciálem, způsobující až 70 % SCC a více než 90 % adenokarcinomů cervixu [7, 17]. Nespornou výhodou hrHPV diagnostiky je také nízké riziko (< 2 %) rozvoje závažného onkologického nálezu na děložním hrdle (CIN3+) pro hrHPV negativní ženy v následujících 5 letech [2].

Ačkoli řada studií prokázala vyšší senzitivitu (přibližně o 30 %) a nepatrně nižší specifitu (přibližně o 4 %) hrHPV diagnostiky pro detekci středně těžké cervikální intraepiteliální neoplazie a vyšších stadií neoplazie (CIN2+) než cytologie, a tím lepší ochranu proti cervikálnímu karcinomu, zůstává morfologické vyšetření cervikální cytologie nejpoužívanější metodou cervikálního skríninku [2, 3, 4, 9, 22].

Pro dosažení optimální ochrany žen před vznikem karcinomu děložního čípku je nezbytné se zaměřit na nejvíce rizikovou skupinu žen, a to ženy, které se skríninkového programu neúčast-

Tab. 1 Srovnání základních charakteristik použitých detekčních metod. HrHPV podtypy detekované všemi třemi detekčními metodami jsou označeny tučným písmem

| | Cobas® 4800 HPV | PapilloCheck® HPV-Screening | LMNX Genotyping Kit HPV GP |
|------------------------------|---|---|---|
| Výrobce | Roche | Greiner Bio-One | Diassay |
| Certifikace | CE-IVD | CE-IVD | CE-IVD |
| Princip testu | multiplex real-time PCR, fluorescenční detekce | PCR, fluorescenční značení a hybridizace na microarray | PCR s biotinylovanými GPS+/E+ primery, RHA |
| Detekovaný HPV gen | L1 (200 bp) | E2 (350 bp) | L1 (150 bp) |
| Interní kontrola kvality DNA | β-globin | ADATI | CH4 |
| Detekované HPV genotypy | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) | 18 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) + 6 IHPV (6, 11, 40, 42, 43, 44/55) | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) |

ADATI – adenzinová deamináza; CE-IVD – Conformité Européenne, In Vitro Diagnostic; CH4 – chromozom 4; hrHPV – vysokorizikové hrčkové papilomaviry; IHPV – nízkorizikové hrčkové papilomaviry; PCR – polymerázová řetězová reakce; RHA – reálná hybridizační assay.

ní. Jednou možností je adresné zvaní těchto žen k návštěvě gynekologa s následným hodnocením cytologie. Projekt adresného zvaní byl v České republice zaveden začátkem roku 2014. I přes mediální kampaň však zvýšil projekt adresného zvaní účast na cervikálním skríninkovém programu pouze o 8,1 %. Navýšení je nižší než v jiných evropských zemích, kde se účast zvýšila průměrně o 15,2 % (v jednotlivých studiích 4,5–26,2 %) [16, 25]. Řada studií naopak ukázala, že tyto ženy preferují možnost samoodběru. Nabídnutí samoodběrové sady ženám, které nechťejí navštívit gynekologa za účelem skríninku, vedlo k vyššímu procentu vyšetřených žen: až 39,1 % žen, které nenavštěvovaly skríninkový program, odeslalo vzorek odebraný samoodběrem na hrHPV testování, zatímco opětovně adresné zvaní přesvědčilo v jednotlivých studiích jen 9,1–35,5 % žen [28]. Navíc 89 % žen, jejichž samoodběr byl hrHPV pozitivní, následně navštívilo svého gynekologa a podstoupilo cytologické vyšetření, případně nový HPV test [13, 14]. Z publikovaných studií tedy vyplývá, že by zaslání samoodběrové sady ženám nenavštěvujícím skrínink mohlo výrazně zvýšit zachyt přednárodových/národových změn i v České republice a přinejmenším skupinu hrHPV pozitivních žen pak dostat do gynekologických ambulancí. O plnošném zaslání samoodběrových sad se v ČR zatím neuvažuje, cíleně je nabízí Rakovina věc veřejná – nadace pro výzkum rakoviny (www.vecverejna.cz).

Cílem naší práce bylo ověřit potenciál samoodběru v kombinaci s molekulárním vyšetřením na HPV pro zvýšení účasti českých žen ve skríninkovém programu karcinomu děložního hrdla.

MATERIÁL A METODY

Ženám ve věku 19–75 let, které projevily zájem znát svůj HPV status a objednaly si HPV test prostřednictvím internetových stránek <http://www.vecverejna.cz.eu/>, byly zoslaány poštou samoodběrové sady Evalym® Brush (Rovers Medical, Holandsko), které byly po odběru doručeny poštou do útvaru molekulární a translační medicíny LF UP k další analýze. Pilotní skupině 60 žen byl společně se samoodběrovou sadou zaslán dotazník zaměřený na jejich zkušenost a spokojenost s tímto typem odběru. U analyzované skupiny žen nejsou známy sociologické údaje ani informace o zdravotním stavu. Všechny ženy zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii. Výzkumný projekt byl schválen etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc.

Odebrané vzorky byly skladovány nasucho až do doručení do laboratoře, kde byly fixovány v Cobas® PCR Cell Collection médiu (Roche Diagnostics, Česká republika). Všechny vzorky byly analyzovány na přítomnost HPV 16/18 a dalších 12 hrHPV systémem Cobas 4800 HPV Test (Roche Diagnostics, Česká republika). Detekce HPV DNA pomocí Cobas 4800 HPV Test je založena na real-time PCR na přístroji Cobas z 480, které předchází automatizovaná izolace DNA na přístroji Cobas x 480 [20]. Genotypizace HPV byla provedena systémem PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One, Německo), který detekuje 18 hrHPV a 6 nízkorizikových HPV (1rHPV, tab. 1). PapilloCheck® HPV-Screening systém je založen na amplifikaci cílové sekvence virové DNA PCR reakcí s následným fluorescenčním značením a hybridizací na microarray. Zpracování a vyhodnocení microarray probíhá automaticky za pomoci

Tab. 2 Analýza HPV statusu, u nichž se výsledky testu systémem Cobas® 4800 HPV a PapilloCheck® HPV-Screening neshodovaly nebo analýza PapilloCheck® HPV-Screening selhala

| číslo vzorku | Cobas® 4800 HPV | PapilloCheck® HPV-Screening | LMNX Genotyping Kit HPV GP | Konsenzusní HPV výsledky |
|--------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 1 | Negativní | HPV 56, 53, 42 | Negativní | HPV 56, 53, 42 |
| 2 | HPV 16 | HPV 42 | Negativní | HPV 16, 42 |
| 3 | HPV 16 | HPV 42 | Negativní | HPV 16, 42 |
| 4 | HPV 16+ další HPV | HPV 68 | Negativní | HPV 16, 68 |
| 5 | HPV 16+ další HPV | Negativní | HPV 39 | HPV 16, 39 |
| 6 | HPV 16+ další HPV | HPV 39, 66, 6 | HPV 39, 66 | HPV 16, 39, 66, 6 |
| 7 | Další HPV | Negativní | HPV 45 | HPV 45 |
| 8 | Další HPV | HPV 40 | HPV 58 | HPV 58, 40 |
| 9 | Další HPV | HPV 40 | Negativní | Další HPV+HPV40 |
| 10 | Další HPV | HPV 53 | HPV 53, 58 | HPV 53, 58 |
| 11 | Další HPV | HPV 44/55 | HPV 45 | HPV 45, 44/55 |
| 12 | Další HPV | Negativní | HPV 56 | HPV 56 |
| 13 | Negativní | Test selhal | Negativní | Negativní |
| 14 | Negativní | Test selhal | Negativní | Negativní |
| 15 | Další HPV | Test selhal | HPV 58 | HPV 58 |

Další HPV+ zahrnuje HPV 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66 a 68. Konsenzusní HPV výsledky je založené na shodě výsledků dvou detekčních metod, v případě HPV genotypů detekovaných všemi třemi použitými metodami. Přítomnost HPV 53, 70, 73, 82 a hrHPV (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44/55) byla vyhodnocena pouze na základě analýzy systémem PapilloCheck® HPV-Screening.

CheckScanner™ a CheckReport™ Software [10]. Rozdělení HPV genotypů na hrHPV a IrHPV bylo zachováno dle klasifikace výrobců použitých detekčních metod. V případě neshody výsledků systému Cobas 4800 HPV Test a PapilloCheck® HPV-Screening jsme k potvrzení HPV statusu použili LMNX genotyping kit HPV GP (Diassay, Holandsko). Principem testu je amplifikace cílové sekvence virové DNA pomocí biotinylovaných GP5+/6+ primerů a následná hybridizace na sondy specifické pro jednotlivé genotypy, které jsou nanesené na částicích značených odlišnými fluorofory (RHA - Reverse Hybridisation Assay). Zpracování a vyhodnocení vzorků je plně automatizováno na sestavě přístrojů společnosti Luminex [12]. Ke všem testům jsme použili DNA připravenou automatem Cobasx 480. Výsledky byly následně statisticky zpracovány pomocí software R a Microsoft Excel.

VÝSLEDKY

Výsledky HPV testování

Na začátku studie bylo poštou rozesláno 215 samoodběrových sad Evalyn Brush, z nichž by-

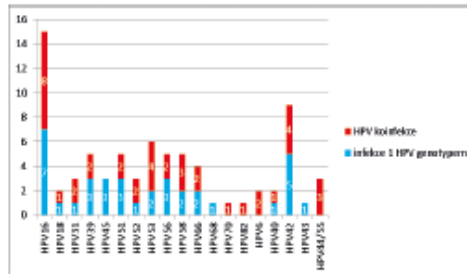
lo k analýze doručeno 174 (81 %) samoodběrem získaných cervikovaginálních stěrů. U všech vyšetřovaných vzorků poskytl samoodběr dostatečné množství buněk potřebných pro vyšetření systémem Cobas® 4800 HPV (amplifikace vnitřní kontroly), žádné vyšetření nebylo nutné z technických důvodů opakovat. Systémem PapilloCheck® HPV-Screening nebylo možné vyšetřit 2 % (3/174) vzorků (opakovaně selhání amplifikace vnitřní kontroly). Tyto vzorky byly stejně jako vzorky, u nichž výsledky testu systémem Cobas® 4800 HPV a PapilloCheck® HPV-Screening neshodovaly ve výsledku (7 %; 12/174), následně vyšetřeny pomocí LMNX genotyping kit HPV GP (tab. 2).

Z analyzovaných 174 cervikovaginálních stěrů bylo 125 (72 %) HPV negativních, u 4 vzorků (2 %) byla detekována přítomnost pouze IrHPV infekce a 45 vzorků (26 %) bylo hrHPV pozitivních. Nejčastěji detekovaným genotypem byl HPV 16 (15/45; 33 %). Přítomnost dalších genotypů je zobrazena na obrázku 1. Ve 13 případech byla detekována současná infekce několika hrHPV, v šesti z nich byla nalezena současně infekce IrHPV (tab. 3). Skupina hrHPV pozitivních žen měla o čtyři roky mladší věkový medián než hrHPV ne-

Tab. 3 Detekované HPV koinfekce u 20/49 HPV pozitivních vzorků

| Koinfekce více hrHPV genotypy (číslo vzorku) | Detekované genotypy | Koinfekce více hrHPV a hrHPV (číslo vzorku) | Detekované genotypy | Koinfekce hrHPV a hrHPV (číslo vzorku) | Detekované genotypy |
|--|---------------------|---|---------------------|--|---------------------|
| 1, 2 | HPV 16, 39 | 8, 9 | HPV 16, 42 | 15 | HPV 16, 18, 53, 42 |
| 3 | HPV 16, 31, 51 | 10 | HPV 45, 44, 55 | 16 | HPV 16, 39, 66, 6 |
| 4 | HPV 16, 56 | 11 | HPV 52, 6 | 17 | HPV 31, 51, 42 |
| 5 | HPV 18, 68 | 12 | HPV 58, 40 | 18 | HPV 39, 66, 44/55 |
| 6 | HPV 52, 53 | 13 | HPV 58, 44/55 | 19 | HPV 56, 53, 42 |
| 7 | HPV 53, 58 | 14 | other HPV, HPV 40 | 20 | HPV 82, 70, 42 |

hrHPV genotypy HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 jsou v tabulce vyznačeny tučným písmem
hrHPV genotypy HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44/55



Obr. 1 Zastoupení jednotlivých HPV genotypů u 49 HPV pozitivních vzorků (modře – počet případů infekce 1 HPV genotypem, červeně – počet případů HPV koinfekce) hrHPV genotypy HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, hrHPV genotypy HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44/55

gativní (34 vs. 38, $p = 0,011$). S rostoucím věkem počet hrHPV pozitivních žen nesignifikantně klesal ($p = 0,013$).

Hodnocení spokojenosti se samoodběrovou sadou

Ze 60 odeslaných dotazníků bylo zasláno zpět 48 (80 %) vyplněných formulářů. Výsledky dotazníkového šetření jsou znázorněny v obrázku 2. Svou zkušenost se samoodběrovou sadou ohodnotilo jako dobrou až výbornou 47/48 (98 %) dotázaných žen. Návod k použití byl považován za dobrý až vynikající všemi ženami (100 %). Všechny ženy také ohodnotily pohodlnost použití samoodběrové sady jako dobrou až vynikající. Většina žen (42/48; 88 %) dává přednost samoodběru před odběrem vzorku lékařem, pouze 10 % (5/48) hodnotí samoodběr a odběr lékařem stejně.

DISKUSE

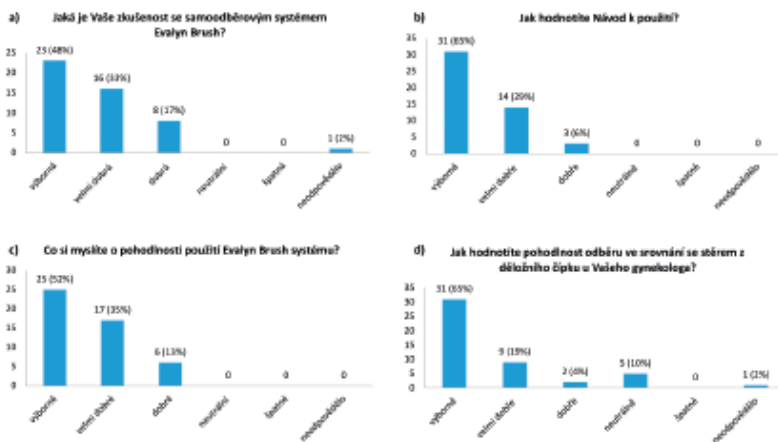
Získání validního výsledku při testu systémem Cobas® 4800 HPV u všech 174 analyzovaných vzorků potvrzuje, že množství a kvalita odebraného materiálu samoodběrovou sadou jsou pro hrHPV vyšetření dostatečné.

V naší studované skupině vzorků jsme detekovali hrHPV DNA u 24 % vzorků, což je více než dvakrát vyšší hodnota, než uvádějí nejrozsáhlejší studie žen ($n = 27792$ a $n = 26145$), které nenavštěvují cervikální screening (10 % a 8 %) [13, 14]. Naopak podobně vysoké zastoupení (27,4 %) hrHPV pozitivních žen bylo pozorováno ve studiích zaměřených na ženy se zvýšeným rizikem hrHPV infekce (ženy s cervikální dysplazií, HIV pozitivní ženy a pacientky kolposkopických klinik)

[18]. Náš vysoký zachyt hrHPV může být způsoben nereprezentativností výběru. Větší zájem zjistit svůj HPV status pomocí samoodběru mohou mít ženy, které již trpí HPV-asociovaným onemocněním nebo z jiných důvodů spadají do skupiny se zvýšeným rizikem HPV infekce (zejména rizikové sexuální chování).

Nicméně celkově vysoké procento pozitivních vzorků je v souladu s nedávno publikovanou studií HPV pozitivních vzorků [26] a ukazuje na mimofádně vysokou prevalenci hrHPV v populaci českých žen ve srovnání s jinými evropskými zeměmi (obr. 3).

Možnost samoodběru cervikovaginálního stěru pro HPV test byla ženami velmi dobře přijata. Ženy ocenily především pohodlnost a jednoduchost použití sady. Většina dotázaných žen upřednostnila samoodběr před odběrem vzorku lékařem. Pouze dvě dotazované ženy (2/48; 4 %) by po vyzkoušení samoodběru upřednostnily



Obr. 2 Výsledky dotazníkového šetření
 a) Hodnocení zkušeností žen se samoodběrovou sadou, b) Hodnocení návodu k použití, c) Hodnocení pohodlnosti použití samoodběrové sady, d) Hodnocení pohodlnosti samoodběru ve srovnání s odběrem vzorku u gynekologa



Obr. 3 Prevalence výskytu HPV v Evropě – vážený průměr 121 studií publikovaných v letech 1996–2014, kumulativně sesbíraných ve studii Bruni et al. 2016 [5]

odběr cervikálního stěru gynekologem. Naše výsledky na českých ženách jsou v rozporu se studií van Baars et al. z roku 2012, kdy nizozemské ženy nejčastěji upřednostňovaly odběr vzorku lékařem, protože se jim zdá spolehlivější a nemusí mít obavy z nesprávně provedeného odběru. Pozorovaný rozdíl lze vysvětlit například podstatně menším souborem jedinců v našem souboru, ale potenciálně i různým přístupem lékařů k pacientce nebo selekcí aktivnější skupiny žen v našem souboru. Získané výsledky se nicméně shodují s daty ze stejné studie, která také sledovala spokojenost žen se samoodběrem pomocí Evalyn® Brush [27].

U vzorků odebraných lékařem a samoodběrem je podle literatury dosahována vysoká míra shody v detekci hrHPV (pro Evalyn® Brush 86,6%) [18, 27]. Naše studie svým designem neumožňuje shodu mezi samoodběrem a odběrem provedeným gynekologem zhodnotit, nicméně můžeme potvrdit excelentní vyšetřitelnost v všech odebraných vzorcích, což svědčí o spolehlivosti provedeného samoodběru.

Přes pozitivní výsledky naší pilotní studie nemůžeme své nálezy generalizovat a kvantifikovat potenciální přínos samoodběru ke skríninku karcinomu cervixu v našich podmínkách. Abychom byli schopni odhadnout, jaký efekt by

měla možnost samoodběru, bylo by nezbytné členěné zaslat samoodběrovou sadu skupině žen, které se skríninku neúčastní, případně neregistrovaly ani na adresné vyzvání k preventivnímu vyšetření. Provedení takové studie a případná implementace samoodběru do skríninkového algoritmu v České republice může být jednou z efektivních cest, jak snížit výskyt tohoto onemocnění v populaci.

ZÁVĚR

Samoodběr cervikovaginálního stěru umožňuje získat validní výsledky HPV genotypizace. Samoodběrový kit Dyalyn® Brush byl českými ženami dobře přijat (návrstnost testu k analýze činila 81 %; ženy byly s odběrem spokojeny). Kombinace samoodběru s hrHPV diagnostikou pro ženy, které se zatím skríninku neúčastní, by mohla vést ke zvýšení pokrytí cílové populace a záchytu časných stadií cervikálního karcinomu.

Práce na tomto projektu byla financována z prostředků vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2014_009), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (CZ.1.05/3.1.00/14.0307; CZ.1.07/2.3.00/30.0041; LO1304), Ministerstva průmyslu České republiky (OPPI 5.1 SPK02/052) a Technologické agentury České republiky (TE02000058).

LITERATURA

1. Anttila, A., Pukkala, E., Söderman, B., et al. Effect of organised screening on cervical cancer incidence and mortality in Finland, 1963-1995: recent increase in cervical cancer incidence. *Int J Cancer*, 1999, 83, p. 59-65.
2. Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*, 2012, 30 Suppl 5, p. F88-F99.
3. Arbyn, M., de Sanjosé, S., Saraiya, M., et al. EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int J Cancer*, 2012, 131, p. 1969-1992.
4. Arbyn, M., Rafter, A.O., Waldorpass, E., et al. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer*, 2009, 45, p. 2640-2648.
5. Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., et al. Human papillomavirus and related diseases in the world. Summary report 2015-04-06. Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre) 2015.
6. Bulk, S., Vissers, O., Rozendael, L., et al. Cervical cancer in the Netherlands 1989-1998: Decrease of squamous cell carcinoma in older women, increase of adenocarcinoma in younger women. *Int J Cancer*, 2005, 113, p. 1005-1009.

7. Castellsagué, X., Diaz, M., de Sanjosé, S., et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J National Cancer Institute*, 2006, 98, p. 303-315.
8. Coghen, V., Baan, R., Straif, K., et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*, 2005, 6, p. 204.
9. Cuzick, J., Cleaveland, C., Petry, K., et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 2006, 119, p. 1095-1101.
10. Dalstein, V., Morlin, S., Bell, C., et al. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods*, 2009, 156, p. 77-83.
11. Duskova, J., Bakova, A., Dvorak, V., et al. Results of the Czech National Cervical Cancer screening programme. *Klin Onkol*, 2014, 27, Suppl 2, p. 79-96.
12. Geraets, D.T., Cuschieri, K., de Koning, M.N., et al. Clinical evaluation of a GP5+/6+ based luminax assay having full high-risk human papillomavirus genotyping capability and an internal control. *J Clin Microbiol*, 2014, 52, p. 3996-4002.
13. Gok, M., Holdeman, D.A., van Komenade, F.J., et al. HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening cohort study. *BMJ*, 2010, 340, p. e1040.
14. Gok, M., van Komenade, F.J., Holdeman, D.A., et al. Experience with high-risk human papillomavirus testing on vaginal brush-based self-samples of non-attendees of the cervical screening program. *Int J Cancer*, 2012, 130, p. 1128-1135.
15. <http://endglobecon.lercr.fr/>, 1B-5-0015. (GENERIC). Ref Type: Report.
16. Majek, O., Dvorak, V., Dusak, L., et al. Carverix.cz - Program cervikálního screeningu v České republice. *Int J Lab Hematol*, 6-5-2015. (GENERIC). Ref Type: Online Source.
17. Munoz, N., Bosch, F.X., Castellsagué, X., et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*, 2004, 111, p. 278-285.
18. Peltgen, P., Faltin, D.L., Bruchim, I., et al. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 2007, 105, p. 530-535.
19. Peto, J., Gilham, C., Fletcher, O., Matthews, F.E. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*, 2004, 364, p. 249-256.
20. Pretzler, S., Reboll, M., Untermann, A., et al. Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche cobas HPV real-time PCR assay. *PloS One*, 2013, 8, p. e59765.
21. Rijksart, D.C., Berkhof, J., van Komenade, F.J., et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer*, 2012, 130, p. 602-610.
22. Rijksart, D.C., Berkhof, J., Rozendael, L., et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 2012, 13, p. 78-88.
23. Ronco, G., Giorgi-Rossi, P., Carozzi, F., et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical

cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 2010, 11, p. 249-257.

24. Rossi, PG., Marilli, LM., Camilloni, L., et al. The effect of self-sampled HPV testing on participation to cervical cancer screening in Italy: a randomised controlled trial (ISRCTN96071600). *Brit J Cancer*, 2011, 104, p. 248-254.

25. Snijders, P.J., Verhoef, V.M., Arbyn, M., et al. High-risk HPV testing on self-sampled versus clinician-collected specimens: A review on the clinical accuracy and impact on population attendance in cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 2013, 132, p. 2223-2236.

26. Tachazy, R., Smahelova, J., Kaspirkova, J., Selskova, M. Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One*, 2013, 8, p. e79156.

27. van Baars, R., Bosgraaf, RP., ter Horstse, BW., et al. Dry storage and transport of a cervicovaginal self-sample by use of the

evalyn brush, providing reliable human papillomavirus detection combined with comfort for women. *J Clin Microbiol*, 2012, 50, p. 3937-3943.

28. Walboomers, JM., Jacobs, MV., Manos, MM., et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, 189, p. 12-19.

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny

LF UP a FN

Hněvotínská 5

779 00 Olomouc

e-mail: marian.hajduch@upol.cz

horm A15300303

PHARMATEX vaginální lokální antikoncepce bez hormonů a bez receptu

Vhodná antikoncepční metoda pro ženy, které nemohou nebo nechtějí užívat hormonální antikoncepci...

Vhodné uživatelky:

- kojící matky
- kuřačky
- hypertoničky
- ženy s ICHS
- s anamnézou tromboembolické nemoci
- s trombofilními mutacemi
- se srdeční chlopenní vadou
- ženy trpící migrénou
- po operaci s imobilizací
- s karcinomem prsu
- pacientky s diabetes mellitus
- s onemocněním jater (virová hepatitida, cirhóza jater, atd...)
- užívající antikoncepční přípravky (fenytoin, karbamazepin)

PHARMATEX je lokální nehormonální antikoncepce se spermicidním účinkem. Jedná se o spermicidní metodu nové generace s účinnou látkou benzalkonium chlorid. Výhodou je, že nemá vliv na menstruační cyklus a nemá systémové účinky, tudíž neovlivní ani krevní srážlivost. Je založena na principu znehybnění spermií v ejakulátu a zabíjení cervikálního hlenu. Spermiie ztrácejí schopnost proniknout k vajíčku a oplodnit ho. Účinnost antikoncepce se určuje takzvaným Pearl Indexem, což je počet těhotných ze 100 žen používajících danou antikoncepci jeden rok. PHARMATEX má tento Pearl index od 0,68 do 3,6. Spolehlivost je srovnatelná s některými gestagenovými tabletami. Pro tuto účinnost je nezbytné dodržovat základní pravidla používání:

- PHARMATEX křemí i globule musí být aplikovány vždy znovu před každým novým i opakovaným pohlavním stykem
- mýdlo narušuje účinnost PHARMATEXU, proto 2 hodiny před stykem a 2 hodiny po styku se provádí intimní hygiena pouze čistou vodou
- nepoužívá se společně s jinou vaginální léčbou

Výhodou této metody je použití globulí nebo křemí přímo před pohlavním stykem, žena nemusí pravidelně denně užívat tablety. Neovlivňuje celkové organismus, působí pouze ve vagíně, neprostupuje do krve, a ani do mateřského mléka. Nenarušuje pojení s dítětem. Další možností této antikoncepce je působení proti některým chlamydiálním bakteriím a virům a zároveň nepůsobí na laktobacily, které jsou součástí přirozené vaginální mikroflóry. Zvláště u křemí je významným obohacením této metody lubrikační efekt. Spermicidní antikoncepce je určena pro všechny ženy, které nechtějí užívat hormonální antikoncepci, nebo nemohou ze zdravotních důvodů. Léčivý přípravek PHARMATEX se spermicidním účinkem je možné zakoupit v lékárně bez lékařského předpisu. Po své lokální působení nemá celkovou kontraindikaci.

Více informací naleznete na stránkách

www.pharmatex.cz



A Head-to-Head Analytical Comparison of Cobas 4800 HPV, PapilloCheck HPV Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical and Cervicovaginal Swabs



Hana Jaworek,[†] Madimira Koudelakova,[†] Jiri Drabek,[†] Jana Vrbkova,[†] Blazena Zborilova,^{†§} Ivana Oborna,^{†§} Jana Brezinova,[†] Radim Marek,[¶] Karel Huml,[¶] Peter Vanek,[†] and Marian Hajdich[†]

From the Institute of Molecular and Translational Medicine* and the Departments of Biology[†] and Obstetrics and Gynecology,[‡] Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc; Cancer Research Czech Republic,[§] Olomouc; Fertilon Ltd,[¶] Olomouc; and Arleta IVF Ltd,^{||} Kostelec nad Ohří, Czech Republic

Accepted for publication
July 9, 2018.

Address correspondence to
Marian Hajdich, M.D., Ph.D.,
Institute of Molecular and
Translational Medicine, Faculty
of Medicine and Dentistry,
Palacky University Olomouc,
Cancer Research Czech Re-
public, Hnevotínská 5, 775 15
Olomouc, Czech Republic. E-
mail: marian.hajdich@upol.cz

High-risk human papillomavirus (hrHPV) infection is a cause of cervical cancer development. The addition of hrHPV testing to cervical cancer screening and monitoring of cervical intraepithelial neoplasia treatment improves the efficacy of screening and treatment, respectively. Self-sampling for hrHPV testing seems a promising tool for increasing patient participation in cervical cancer screening. In this project, 1198 cervical swabs obtained by physicians and 176 cervicovaginal swabs obtained by self-sampling (not collected in parallel) were analyzed for the presence of 14 hrHPV genotypes using three commercially available assays in comparison. HPV DNA was detected in 21.2% of all samples (21% of cervical swabs and 22.7% of cervicovaginal swabs). The cobas 4800 HPV Test was the most sensitive (0.983) and specific (0.992) for hrHPV detection overall. The PapilloCheck HPV-Screening and LMNX Genotyping Kit HPV GP had comparable specificity with that of the cobas (0.989 and 0.955, respectively), but lesser sensitivity (0.897 and 0.909, respectively). In physician-obtained cervical swabs, the cobas showed the highest sensitivity and specificity (0.980 and 0.994, respectively) for hrHPV detection, whereas in cervicovaginal swabs, the cobas had the highest sensitivity (1.00), but the PapilloCheck had the highest specificity (0.993). In conclusion, all of the detection methods evaluated were highly sensitive and specific for hrHPV detection from both clinician-collected cervical swabs and self-sampled cervicovaginal swabs. (*J Mol Diagn* 2018, 20: 849–858; <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.07.004>)

Persistent high-risk human papillomavirus (hrHPV) infection is a cause of cervical cancer and high-grade cervical intraepithelial neoplasia.^{1,2} HPV-based cervical cancer screening is more effective than cytology-based screening (Papanicolaou test) for preventing invasive cervical cancer development and cervical cancer mortality.³ Several European randomized trials have shown that the cumulative incidence of cervical cancer in groups with negative HPV tests was lower after 5 years than the incidence in groups with a normal cytology result after 3 years.^{4–7}

Validated HPV tests and HPV tests certified by Conformité Européenne In Vitro Diagnostics usually target 14 hrHPV genotypes.⁸ These genotypes were classified by the International Agency for Research on Cancer as follows: carcinogenic (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,

Supported by Palacky University grant LF-2018_005 (H.J.); Ministry of School, Education and Youth grants LO1304, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001818, and LM2015064 (M.H.); Technological Agency of the Czech Republic grant TE02000058 (M.H.); and Cancer Research Czech Republic. Disclosure: None declared.

Table 1 Comparison of the Basic Characteristics for Each of the HPV DNA Tests

| Assay characteristics | Cobas 4800 HPV test | PapilloCheck HPV screening | LMNX genotyping kit HPV GP |
|---|---|--|---|
| Manufacturer | Roche | Greiner Bio-One | Diassay |
| Principle of test | Multiplex real-time PCR, fluorimetric detection | PCR, fluorescent labeling, hybridization on chip | PCR with biotinylated GP5+/6+ primers, RHA |
| Analyzed gene (size of PCR product) | L1 (200 bp) | E1 (350 bp) | L1 (150 bp) |
| Internal control | β -globin | ADMT1 | Human DNA fragment located on chromosome 14 |
| Detected genotypes | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) | 18 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) + 6 lrHPV (6, 11, 40, 42, 43, 44/55) | 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) |
| Form of results | Partial genotyping (HPV16, HPV18, other HPV) | Full genotyping | Full genotyping |
| Limit of detection* (HPV16; HPV18) | 300–600 copy/mL [†] ; 600 copy/mL [‡] | 50 copy/reaction; 300 copy/reaction | 10–100 copy/reaction; 10–100 copy/reaction |
| Volume of DNA input | 25 μ L | 5 μ L | 10 μ L |
| Automatization (DNA isolation included) | Yes | No | No |
| Turnaround time/technician time | 4 hours/0.5 hours | 4.25 hours/1 hour | 4 hours/1.25 hours |
| Cost per sample | 7 Euros | 11 Euros | 29 Euros |
| Special equipment required | The cobas x 480 (instrument for automatized sample preparation); cobas z 480 (real-time PCR analyzer) | PCR cyder; CheckScanner; CheckReport software | PCR cyder, Lumindex 100/200 |

HPV genotypes detectable by all tested methods are shown in bold.

*Limit of detection was determined by the manufacturer of each assay.

[†]Per mL of original sample.

ADMT1, adenosine deaminase 1; HPV, human papillomavirus; hrHPV, high-risk HPV; lrHPV, low-risk HPV; RHA, reverse hybridization assay.

and 59), probably carcinogenic (HPV66), and possibly carcinogenic (HPV68).¹

Many HPV detection tests are commercially available and typically detect clusters of hrHPV genotypes or provide partial genotyping. Only a few tests provide full genotype-specific information.⁸ Partial genotyping for HPV16 and HPV18 could be beneficial because these genotypes pose a greater risk of causing cervical cancer than the other hrHPV genotypes.^{9,10} Genotyping hrHPVs other than HPV16 and HPV18 is valuable for the identification of type-specific persistent infection, follow-up evaluation of women who screen positive, and an indication of residual or recurrent disease in women treated for high-grade cervical lesions.^{11,12}

Three Conformité Européenne In Vitro Diagnostics–certified methods were compared in this study: the cobas 4800 HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; referred to as the cobas 4800), the PapilloCheck HPV-Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany; referred to as PapilloCheck), and the LMNX Genotyping Kit HPV GP (Diassay, Rijswijk, the Netherlands; referred to as LMNX). The cobas 4800^{13,14} and PapilloCheck¹⁵ were fully validated according to the Meijer

protocol.¹⁶ The Meijer protocol was assembled by an expert committee in 2009 and proposes that new hrHPV DNA detection methods should be highly reproducible (sensitivity, ≥ 0.90 ; specificity, ≥ 0.98) to detect high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) or cancer.¹⁶

Hybrid Capture 2 (HC2; Qiagen, Hilden, Germany) and the GP5+/6+ PCR enzyme immunoassay were used as standard comparator assays and are considered fully clinically and epidemiologically validated.¹⁶ LMNX fulfills the criteria for clinical accuracy based on comparisons with standard comparator assays; however, no publication exists showing its reproducibility according to the Meijer protocol. Thus, the LMNX assay may be considered partially validated according to the Meijer protocol.¹⁷

Self-sampling seems a promising method for improving patient participation in cervical cancer screening.^{18,19} Thus, we tested the performance of selected diagnostic systems as well for women self-collected samples, even if the paired self-collected and physician-collected samples were not available.

The aim of this study was to directly compare the detection of HPV16, 18, and a pool of 12 other hrHPV genotypes using the cobas 4800, PapilloCheck, and LMNX.

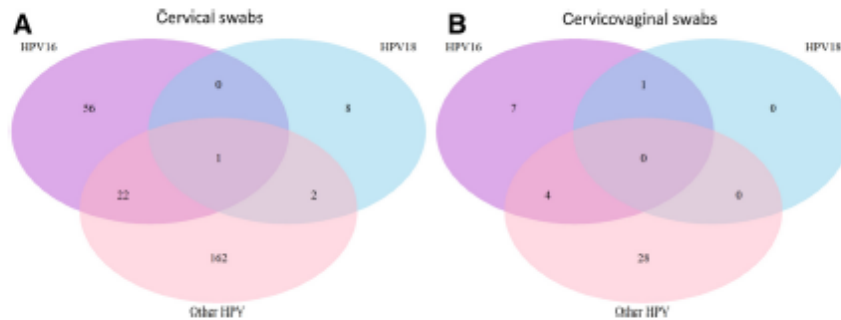


Figure 1 A and B: Venn diagrams showing the distribution of positive detection of human papillomavirus (HPV) 16, HPV18, and the other 12 high-risk HPV (hrHPV) genotypes (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) in cervical (A) and cervicovaginal (B) swabs.

Materials and Methods

Ethical Considerations

This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration according to the study ethics proposal approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Dentistry at Palacky University and the Faculty Hospital in Olomouc. Written informed consent for the use of collected samples for research was obtained from all study participants.

Clinical Specimen Collection

For this study, 1374 samples were collected from February 2013 to August 2015 from Czech women ages 17 to 72 years (median age, 33.7 years), regardless of histopathology or cytomorphology findings. Physicians collected 1198 cervical swabs for this study in cervical screening centers (302 cases) or *in vitro* fertilization clinics (896 cases). After sampling, each cervical brush was rinsed in cobas PCR Cell Collection Media (Roche Diagnostics). All samples were stored and transported at room temperature.

A total of 176 cervicovaginal swabs were obtained by self-sampling using the Evalyn Brush device (Rovers Medical

Devices B.V., Oss, the Netherlands) via a cervical cancer prevention program organized by the Cancer Research Czech Republic (<http://www.vyzkumrakoviny.cz/lets-combat-cancer-together>, last accessed May 9, 2018). After sampling, each specimen was sealed in its original dry state inside its case with a cap and sent by mail for HPV testing. Each Evalyn Brush received was rinsed in cobas PCR Cell Collection Media. The median time between sampling and sample receipt was 3 days. All samples were stored at room temperature. Cervical and cervicovaginal swabs were not collected in parallel.

Sample Preparation

All samples were collected in cobas PCR Cell Collection media, which is recommended for the cobas 4800 HPV Test. PreservCyt transport medium (Hologic, Inc., Marlborough, MA) is recommended for PapilloCheck HPV-Screening and the LMNX Genotyping Kit HPV GP. Because the chemical composition of the PreservCyt and the cobas PCR Cell Collection media is not available from manufacturers and thus not comparable, we have performed extensive chemical analysis to compare both preservation medias. Of interest, both compositions are based on 55.4% or 57.5% buffered methanol without further significant differences as evidenced

Table 2 Summary of HPV Positivity Rates in Overall, Cervical, and Cervicovaginal Swabs

| | All samples | % | Cervical swabs | % | Cervicovaginal swabs | % |
|--------------------------|-------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| Total number | 1372 | | 1196 | | 176 | |
| HPV negative | 1081 | 78.8* | 945 | 79.0* | 136 | 77.3* |
| HPV positive | 291 | 21.2* | 251 | 21.0* | 40 | 22.7* |
| HPV16 | 63 | 21.6 [†] | 56 | 22.3 [†] | 7 | 17.5 [†] |
| HPV16 and 18 | 1 | 0.34 [†] | 0 | 0 | 1 | 2.50 [†] |
| HPV16, 18, and other HPV | 1 | 0.34 [†] | 1 | 0.40 [†] | 0 | 0 |
| HPV16 and other HPV | 26 | 8.93 [†] | 22 | 8.76 [†] | 4 | 10.0 [†] |
| HPV18 | 8 | 2.75 [†] | 8 | 3.19 [†] | 0 | 0 |
| HPV18 and other HPV | 2 | 0.69 [†] | 2 | 0.80 [†] | 0 | 0 |
| Other HPV | 190 | 65.3 [†] | 162 | 64.5 [†] | 28 | 70.0 [†] |

*Percentage from a total number of samples.

[†]Percentage from a number of HPV-positive samples.
HPV, human papillomavirus.

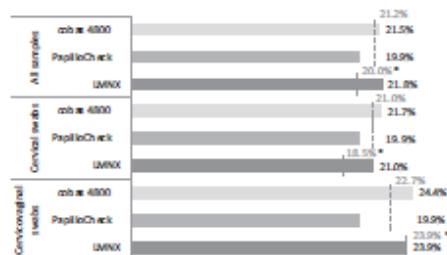


Figure 2 Comparison of method-specific human papilloma virus (HPV)-positive rates with consensus results. The dashed lines represent the HPV-positive detection rate values of consensus results in 1372 cervical ($n = 1196$) and cervicovaginal ($n = 176$) samples analyzed by the cobas 4800 and PapilloCheck. Because only part of the sample collection was examined by the LMNX method, the asterisks mark the HPV-positive detection rate values of consensus results in 330 (238 cervical and 92 cervicovaginal) samples analyzed by the cobas 4800, PapilloCheck, and the LMNX in parallel. The consensus HPV result for a given sample was obtained when at least two methods were concordant.

by elementary analysis and nuclear magnetic spectroscopy (Supplemental Table S1; Supplemental Figure S1).

DNA was extracted from all of the samples using the cobas x 480 for use with all three HPV detection methods, although the PapilloCheck HPV-Screening and the LMNX Genotyping Kit HPV GP recommend using different DNA extraction methods. The oCheck DNA extraction kit (Greiner Bio-One) is recommended for PapilloCheck and the QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) for LMNX. For this reason, the validation of the cobas x 480 DNA extraction for these two HPV detection assays was performed according to International Organization for Standardization ISO 15189. For this validation study, a set of 193 cervical swabs (collected during 2012) was selected and tested by the cobas 4800. The results from using the cobas x 480 DNA extraction were compared with those using the oCheck DNA extraction kit on 49 HPV-positive and 50 HPV-negative cervical swabs and compared with those using the QIAamp DNA Micro kit on 46 HPV-positive and 48 HPV-negative cervical swabs (Supplemental Table S2).

HPV DNA Detection

All samples were tested for HPV DNA using the cobas 4800 HPV Test according to the manufacturer's recommendations (Table 1). PapilloCheck was used to test all samples according to the manufacturer's instructions, except for the nucleic acid preparation. LMNX was used for parallel testing of the first 337 samples according to the manufacturer's instructions, except for the nucleic acid preparation. Unfortunately, the concentration and quality (as measured by a 260/280 ratio) of the DNA isolated using the cobas x 480 (HPV Detection Failure) was lower than that obtained using the QIAamp DNA Micro kit and contributed to an unacceptable failure rate of both the PapilloCheck and LMNX assays. DNA extraction using

the recommended methods reduced the failure rate from 0.44% to 0% and from 11.1% to 1.9%, respectively. Because of this, the LMNX assay was used only for result confirmation in the remaining 42 samples, in which the results from cobas 4800 and PapilloCheck were not concordant (Supplemental Table S3).

Although each detection method tests a slightly different spectrum of genotypes, only 14 high-risk HPV types detected by all three methods were analyzed for comparison: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68. HPV16 and HPV18 results were analyzed individually, and the remaining 12 high-risk HPV types were pooled for analysis. Of the 1374 samples collected, 1 produced inconclusive results and 1 failed in all tested assays, most probably because of inappropriate sample collection. These two samples were excluded from our study. In total, 1372 cervical and cervicovaginal samples were analyzed. The consensus HPV result for a given sample was obtained when at least two detection methods were in agreement.

Analyses of samples deemed invalid by PapilloCheck (6 cases) or LMNX (42 cases) were repeated after DNA extraction according to the assay manufacturer's recommendations to clarify the role of the DNA extraction method in assay robustness. DNA concentration was measured using the fluorescence-based Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Statistical Analysis

The statistical software R version 3.2.1 (R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>, last accessed February 26, 2018) was used for data evaluation. Measures of agreement, such as sensitivity, specificity, and Cohen's κ coefficients with 95% CIs, were calculated for each method and compared with the HPV consensus result using functions from the *epiSIX* R package, version 1.3. The McNemar test was used to evaluate the symmetry of positive results. HPV consensus results (concordance of at least two methods) were considered the gold standard for sensitivity, specificity, and κ coefficient calculations. The sensitivity, specificity, Cohen's κ coefficient, and concordance of results obtained by the LMNX assay were calculated only for 337 samples tested in parallel with the cobas 4800 and PapilloCheck. Concordance between the results of the HPV detection methods was analyzed only when both methods being compared produced valid results. In a validation study, the cobas 4800 was considered the gold standard for sensitivity, specificity, and accuracy assessment (Supplemental Table S2).

Results

HPV Positivity Rates

Three HPV DNA detection methods, the cobas 4800 HPV Test, PapilloCheck HPV-Screening, and the LMNX

Table 3 Pairwise Concordance between HPV DNA Detection Methods and Consensus Results

| | cobas 4800 | | PapilloCheck | | LMNX | | Consensus HPV result | |
|-----------------------------|------------|------|-------------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| | HPV+ | HPV- | HPV+ | HPV- | HPV+ | HPV- | HPV+ | HPV- |
| cobas 4800 | | | | | | | | |
| HPV+ | | | 0.876 (0.844 to 0.907)* | | 0.767 (0.681–0.852)* | | 0.970 (0.954–0.985)* | |
| HPV- | | | 0.005 [†] | | 0.860 [†] | | 0.423 [†] | |
| PapilloCheck | | | | | | | | |
| HPV+ | 256 | 17 | | | 0.705 (0.609–0.802)* | | 0.906 (0.878–0.934)* | |
| HPV- | 39 | 1060 | | | 0.031 [†] | | 0.009 [†] | |
| LMNX | | | | | | | | |
| HPV+ | 58 | 14 | 50 | 22 | | | 0.835 (0.762–0.909)* | |
| HPV- | 12 | 246 | 9 | 249 | | | 0.239 [†] | |
| Consensus HPV result | | | | | | | | |
| HPV+ | 286 | 5 | 261 | 30 | 60 | 6 | | |
| HPV- | 9 | 1072 | 12 | 1069 | 12 | 252 | | |

Only samples with valid results from each method were included in the analyses. Every intersection of method row and method column corresponds to a 2 × 2 contingency table for those two methods.

*κ (95% CI) concordance metrics.

[†]P value was calculated using the McNemar test.

HPV, human papillomavirus.

Genotyping Kit HPV GP, were used to identify HPV infection in cervical and cervicovaginal samples. In total, 1196 of 1198 cervical samples and all 176 cervicovaginal samples were included in the study. For one cervical specimen, all three methods showed an invalid result (low DNA content); the other cervical specimen had an inconclusive result, probably owing to hemorrhage. These two samples were not analyzed further (Supplemental Table S3).

HPV DNA was detected in 291 of 1372 samples (21.2%) (Figure 1, Table 2). HPV16 alone was identified positively in 63 of the 291 samples (21.6%). HPV16 co-infection with other HPVs was found in 26 cases (8.93%). One (0.34%) of the 291 samples showed co-infection with HPV16 and HPV18, and co-infection with HPV16, HPV18, and the other HPVs was found in 1 case also. HPV18 alone was detected positively in 8 of the 291 samples (2.75%), whereas co-infection with HPV18 and the other HPVs was detected in 2 samples (0.69%). The other 12 HPV types were found in the majority of positive cases (190 of 291; 65.3%).

Age information was available for 94.5% (1297 of 1372) of the women in the study. Of these, 10.6% (137 of 1297) were younger than age 25 years, and 1.3% (17 of 1297) were older than age 60 years. The median age of all women examined was 32.7 years. A majority of the women (88.1%) were within the recommended age range for cytologic screening (age range, 25 to 60 years).²⁰ HPV-positive women were significantly younger than HPV-negative women (median age, 30.6 versus 33.2 years; $P < 0.001$). This association of positive HPV detection with younger age was observed both in women sampled by physicians (median age, 30.1 versus 32.7 years; $P < 0.001$), as well as in self-sampled women (median age, 34.3 versus 38.0 years; $P = 0.012$).

Comparison of HPV Positivity Rates in Cervical and Cervicovaginal Swabs

Twenty-one percent of cervical samples (251 of 1196) collected by physicians were HPV positive. Similarly, 22.7% (40 of 176) of cervicovaginal self-samples were HPV positive. The distribution of HPV-positive results between cervical and cervicovaginal swabs was comparable within individual HPV subgroups (Figure 1, Table 2).

Comparison of HPV Results from the cobas 4800 HPV Test, PapilloCheck HPV-Screening, and LMNX Genotyping Kit HPV GP Methods

HPV was detected in 295 of 1372 samples (21.5%) using the cobas 4800, and in 273 of 1372 samples (19.9%) using PapilloCheck (Figure 2). LMNX produced valid results in 330 of 337 samples tested. Of the 330 samples with valid results, 72 (21.8%) were HPV positive.

Irrespective of HPV genotype, the three HPV detection assays used produced concordant results in 291 of 330 cases (88.2%). Genotyping results of all three methods coincided in 288 (87.3%) cases. The cobas 4800 HPV detection results were concordant with PapilloCheck results in 95.9% (1316 of 1372) of samples, and genotyping results were concordant between the two methods in 95.3% (1307 of 1372) of cases. The cobas 4800 and LMNX methods produced concordant HPV identification results in 92.1% (304 of 330) of cases, and concordant genotyping results in 90.6% (299 of 330) of cases.

The lowest concordance was observed between the PapilloCheck and LMNX methods: 90.6% (299 of 330) concordant for HPV detection and 90.0% (297 of 330)

Table 4 Sensitivity, Specificity, and Cohen's κ Coefficient of the Different Methods Calculated Using Consensus HPV Status (Defined by Concordance of at Least Two Methods) as a Reference

| HPV type | Method | All samples | | | | | Cervical swabs | |
|-----------|--------------|-------------|-------|-------|-------------------------|----------|----------------|-------|
| | | N | SE | SP | κ (95% CI) | P value* | N | SE |
| hrHPV | cobas 4800 | 1372 | 0.983 | 0.992 | 0.970 (0.954–0.985) | 0.423 | 1196 | 0.98 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0.897 | 0.989 | 0.906 (0.878–0.934) | 0.009 | 1196 | 0.904 |
| | LMNX | 330 | 0.909 | 0.955 | 0.835 (0.762–0.909) | 0.239 | 238 | 0.886 |
| HPV16 | cobas 4800 | 1372 | 0.989 | 0.995 | 0.954 (0.923–0.986) | 0.077 | 1196 | 0.987 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0.956 | 1 | 0.976 (0.952–0.999) | 0.134 | 1196 | 0.949 |
| | LMNX | 330 | 0.950 | 0.990 | 0.898 (0.800–0.997) | 0.617 | 238 | 0.923 |
| HPV18 | cobas 4800 | 1372 | 1 | 0.997 | 0.856 (0.716–0.995) | 0.134 | 1196 | 1.000 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0.667 | 1 | 0.799 (0.606–0.992) | 0.134 | 1196 | 0.636 |
| | LMNX | 330 | 0.500 | 0.991 | 0.328 (–0.161 to 0.817) | 0.617 | 238 | 1.000 |
| Other HPV | cobas 4800 | 1372 | 0.977 | 0.994 | 0.968 (0.949–0.986) | 0.773 | 1196 | 0.973 |
| | PapilloCheck | 1372 | 0.886 | 0.989 | 0.894 (0.861–0.927) | 0.074 | 1196 | 0.898 |
| | LMNX | 330 | 0.902 | 0.975 | 0.863 (0.787–0.939) | 0.773 | 238 | 0.882 |

(table continues)

Other HPV includes HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68 genotypes.

*The P value was calculated using the McNemar test.

HPV, human papillomavirus; hrHPV, high-risk human papillomavirus; κ , Cohen's κ coefficient; NA, not available; SE, sensitivity; SP, specificity.

concordant for HPV genotyping (Table 3, Supplemental Table S3).

Sensitivity and Specificity of Detection Methods Tested in Comparison with Consensus Result

Overall, the cobas 4800 had the highest sensitivity (0.983) and specificity (0.992) of the three detection methods evaluated. The LMNX had lower sensitivity (0.909) and comparable specificity (0.955). Similarly, PapilloCheck had comparable specificity (0.989), but lesser sensitivity (0.897) (Table 4). PapilloCheck showed higher false negativity compared with the cobas 4800 and LMNX (2.33% versus 0.44% and 2.12%, respectively), whereas higher false positivity was observed in the LMNX (3.94% versus 1.31% for cobas 4800 and 0.95% for PapilloCheck) (Supplemental Table S3).

In addition, all tests showed comparably high specificity for HPV16 (0.995 to 1.0), HPV18 (0.991 to 1.0), and the other 12 hrHPV (0.975 to 0.994) genotype detection.

Comparison of Sensitivity and Specificity in Cervical Versus Cervicovaginal Swabs

In cervical swabs, the cobas 4800 showed the highest sensitivity (0.980) and specificity (0.994) for hrHPV detection. Similarly, in cervicovaginal swabs, the cobas 4800 was the most sensitive (1.0); however, PapilloCheck was the most specific (0.993) (Table 4).

The cobas 4800 was similarly sensitive and specific for both cervical and cervicovaginal swabs tested for HPV16 (sensitivity, 0.987 versus 1.0; specificity, 0.997 versus 0.976), HPV18 (sensitivity, 1.0 versus 1.0; specificity, 0.997 versus 0.994), and for the other 12 hrHPV genotypes

(sensitivity, 0.973 versus 1.0; specificity, 0.994 versus 0.993). PapilloCheck showed comparable specificity for cervical and cervicovaginal swabs tested for HPV16 (specificity, 1.0 versus 1.0), HPV18 (specificity, 1.0 versus 1.0), and the other hrHPV genotypes (specificity, 0.988 versus 0.993), but was less sensitive to HPV16 and HPV18 in cervical swabs than in cervicovaginal swabs (sensitivity, 0.949 versus 1.0; sensitivity, 0.636 versus 1.0, respectively). In contrast, PapilloCheck showed greater sensitivity to the other 12 hrHPV genotypes in cervical swabs than in cervicovaginal swabs (sensitivity, 0.898 versus 0.813).

The LMNX showed comparable specificity for HPV16 (0.991 versus 0.988) and HPV18 (0.987 versus 1.0) in cervical and cervicovaginal swabs, but lesser sensitivity to HPV16 in cervical swabs than in cervicovaginal swabs (0.923 versus 1.0). In contrast to the absolute sensitivity of LMNX to HPV18 in cervical swabs, LMNX had zero sensitivity to HPV18 in cervicovaginal swabs because of the false-negative result of only one HPV18-positive case. The LMNX showed comparable sensitivity (0.95 versus 0.926) but higher specificity (1.0 versus 0.968) for the other hrHPV genotypes in cervicovaginal swabs than in cervical swabs (Table 4).

HPV Detection Failures

One or more of the HPV DNA detection methods repeatedly failed to detect HPV DNA in 50 of 1374 samples (3.64%). DNA isolated using the cobas x 480 showed lower concentration and purity compared with DNA isolated by the QIAamp DNA Micro kit and oCheck DNA extraction kit. In the invalid samples, DNA therefore was re-extracted according to the assay manufacturer's recommendations and the detection method was repeated. Two samples were excluded because of poor quality (see the *Materials and*

Table 4 (continued)

| Cervical swabs | | | Cervicovaginal swabs | | | | |
|----------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-------|-------|----------------------|-----------------|
| SP | κ (95% CI) | <i>P</i> value* | N | SE | SP | κ (95% CI) | <i>P</i> value* |
| 0.994 | 0.972 (0.956–0.989) | 1.000 | 176 | 1.000 | 0.978 | 0.953 (0.900–1.0060) | 0.248 |
| 0.988 | 0.91 (0.881–0.939) | 0.043 | 176 | 0.85 | 0.993 | 0.882 (0.796–0.967) | 0.131 |
| 0.943 | 0.788 (0.689–0.887) | 0.211 | 92 | 0.955 | 0.986 | 0.940 (0.858–1.022) | 1.000 |
| 0.997 | 0.973 (0.947–0.999) | 0.617 | 176 | 1.000 | 0.976 | 0.845 (0.697–0.993) | 0.134 |
| 1.000 | 0.972 (0.945–0.999) | 0.134 | 176 | 1.000 | 1.000 | 1.000 (–1.100) | NA |
| 0.991 | 0.882 (0.751–1.01) | 1.000 | 92 | 1.000 | 0.988 | 0.927 (0.786–1.069) | 1.000 |
| 0.997 | 0.879 (0.743–1.015) | 0.248 | 176 | 1.000 | 0.994 | 0.664 (0.046–1.283) | 1.000 |
| 1.000 | 0.776 (0.563–0.990) | 0.134 | 176 | 1.000 | 1.000 | 1.000 (–1.10) | NA |
| 0.987 | 0.396 (–0.147 to 0.939) | 0.248 | 92 | 0 | 1.000 | 0 (–0.203 to 0.203) | 1.000 |
| 0.994 | 0.965 (0.945–0.986) | 1.000 | 176 | 1.000 | 0.993 | 0.981 (0.944–1.018) | 1.000 |
| 0.988 | 0.900 (0.866–0.935) | 0.281 | 176 | 0.813 | 0.993 | 0.858 (0.755–0.960) | 0.131 |
| 0.966 | 0.818 (0.714–0.922) | 0.546 | 92 | 0.941 | 1.000 | 0.963 (0.891–1.035) | 1.000 |

Methods section). After repeated testing of 6 of 1372 (0.44%) samples in which the PapilloCheck assay failed, 1 sample was found to be “other HPV positive” and 5 samples had HPV-negative results. Of the 42 of 377 cases (11.1%) initially determined invalid by the LMNX assay, 1 was found HPV16 positive, 4 had the “other HPV positive” result, 31 were HPV negative, and 6 remained invalid after repeated testing. The median DNA concentration of the LMNX-invalid samples was 0.222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.0608 to 0.504 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared with 11.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6.42 to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 40 randomly selected LMNX-valid samples. The DNA concentration of LMNX-invalid samples was significantly lower ($P < 0.001$) compared with other tested samples, even after using the recommended isolation method (Supplemental Table S4).

Finally, the cobas 4800 and PapilloCheck assays did not fail to detect HPV in any sample included in the analysis whereas the LMNX assay failed in 1.59% of samples (6 of 377; $P < 0.001$), even though the analysis was repeated with the recommended DNA extraction method (Supplemental Table S4).

Discussion

This study compared the performance of three Conformité Européenne In Vitro Diagnostics hrHPV detection methods: the cobas 4800 HPV Test, PapilloCheck HPV-Screening, and the LMNX Genotyping Kit HPV GP in 94 cervicovaginal self-samples and 243 cervical clinician-collected samples and the cobas 4800 HPV Test and PapilloCheck HPV-Screening in 176 cervicovaginal self-samples and 1198 cervical clinician-collected samples.

Of the three assays evaluated, the cobas 4800 was the most sensitive and specific for detecting the 14 hrHPV genotypes overall, and in particular from the cervical swabs. In the cervicovaginal swabs, the cobas 4800 was the most

sensitive, but PapilloCheck was the most specific. The sensitivity and specificity of the LMNX method may have been influenced by the lower number of samples tested using this method compared with the other two methods. The sensitivity and specificity of the cobas 4800 and PapilloCheck was calculated from 1372 cervical/cervicovaginal samples including 42 samples with discordant cobas 4800 and PapilloCheck results verified by the LMNX. The sensitivity and specificity of the cobas 4800 and PapilloCheck therefore could be slightly affected by the bias. Clinical validation of all methods tested was confirmed in several studies.^{13–15,17} The Cobas 4800 and PapilloCheck yielded concordant results, with consensus in more than 97% of samples, and the LMNX aligned with the consensus results in 94.5% of samples (Table 3).

Few publications exist on the analytical sensitivity and specificity of the cobas 4800, PapilloCheck, and the LMNX for patient specimens, in contrast with the high number of clinical validation studies mentioned in the previous paragraph.^{21–25} Only two studies^{23,25} comparing the analytical sensitivity and specificity of the cobas 4800 with a consensus HPV result (a true positive/negative result) have been published. No study comparing the analytical sensitivity and specificity of PapilloCheck or the LMNX with a consensus HPV result has been published to our best knowledge.

Lindemann et al²⁵ performed an analytical comparison of the cobas 4800 and the HC2. In a set of 1360 cervical samples, the cobas 4800 was comparable with the HC2, with concordance of both methods in 86.6% of samples. However, only 82.4% (140 of 170) of the inconclusive results from the cobas 4800 and the HC2 were analyzed by the Linear Array HPV Genotyping test.²⁵ Park et al²³ published the only study ($n = 356$) comparing the analytical sensitivity and specificity of the cobas 4800, RealTime HR HPV assay, and the HC2 with consensus HPV results. Samples with discrepant results were analyzed both by sequencing

and by the GeneFinder HPV liquid beads microarray (Innometech Inc., Seoul, South Korea). Compared with the findings of Park et al²³, it was found that the cobas 4800 showed a higher sensitivity for the 14 hrHPV genotypes (0.98 versus 0.917), and for HPV16 individually (0.987 versus 0.885), HPV18 sensitivity (1 versus 1) and specificity for the 14 hrHPV genotypes (0.994 versus 0.97), HPV16 (0.997 versus 0.991), and HPV18 (0.997 versus 0.994) were comparable.

PapilloCheck and the LMNX were compared in the Validation of HPV Genotyping Tests study, but these assays were not compared with the gold standard. The concordance of PapilloCheck with the LMNX was 0.947 ($\kappa = 0.875$) for all 14 hrHPV genotypes, 0.99 ($\kappa = 0.936$) for HPV16, and 0.99 ($\kappa = 0.801$) for HPV18.²⁴ This study showed a concordance of PapilloCheck with the LMNX of only 0.906 ($\kappa = 0.705$) for all 14 hrHPVs, 0.991 ($\kappa = 0.898$) for HPV 16, and 0.988 ($\kappa = -0.005$) for HPV18. Several false-positive/false-negative results were probably a reflection of different analytical sensitivities (limits of detection) of each assay. The highest limit of detection of almost all tested genotypes was indicated by the manufacturer in PapilloCheck, which showed the highest number of false-negative samples. The highest number of false-positive results was produced by the LMNX assay, which described the lowest limit of detection.

The accuracy of HPV detection and genotyping in all laboratories using the cobas 4800 and PapilloCheck has been proved by the HPV Laboratory Network's international proficiency study. No laboratory using LMNX participated in that study.²⁶

The main disadvantage of the LMNX was its high detection failure rate (42 of 377; 11.1%; $P < 0.001$) when using DNA extracted using the cobas x 480. As performed in other studies, the DNA extraction method was unified to reduce cost, use limited sample quantity, and reduce technician hands-on time requirements.²³ However, DNA quantity and quality were an issue with the cobas x 480 and required validation of the other recommended DNA extraction methods. DNA extracted using the cobas x 480 was of sufficiently good quality in almost all cases for the internal control to be amplified by the cobas 4800 and by the PapilloCheck assays. The concentration and purity of the DNA isolated by the cobas x 480, however, was lower compared with the DNA isolated by the QIAamp DNA Micro kit and likely contributed to the failure rates of the PapilloCheck and the LMNX assays because the detection rates improved from 0.44% to 0% and from 11.1% to 1.59%, respectively, when the recommended DNA extraction methods were used. Despite the use of the recommended isolation method, a significantly lower DNA concentration was measured in the remaining six LMNX-invalid samples (0.222 $\mu\text{g/mL}$, compared with 11.61 $\mu\text{g/mL}$ in the LMNX-valid samples). This clearly shows that the LMNX has higher demands for DNA content compared with the cobas 4800 and PapilloCheck. Nevertheless, using two different DNA extraction

methods for HPV detection and genotyping is extremely inconvenient in clinical practice.

hrHPV infection was observed in 21.2% of samples, with the highest prevalence of hrHPV-positive results found in the 26- to 30-year-old age category. These observations correspond with another study performed on the Czech population. Tachezy et al²⁷ showed a 22.3% (310 of 1393) prevalence of hrHPV infection using a PCR-based HPV detection method but, in their study, hrHPV infection was most prevalent in the 21- to 25-year-old age group.

The worldwide HPV prevalence in women with normal cytologic findings ranged from 10.4% to 12%, and prevalence varied between continents and regions.²⁸⁻³⁰ Overall, the HPV prevalence in Europe was 8.1% to 14.2%,²⁸⁻³⁰ with the highest prevalence (21.4%) in Eastern Europe.^{29,30} The high prevalence of HPV in the Czech Republic is comparable with that in the Eastern European countries, and has been confirmed by our data. HPV16 and HPV18 are the most common HPV genotypes in the Czech Republic and also worldwide. The HPV16 and HPV18 genotypes have a frequency of 20.4% to 24% and 7.4% to 9.8% respectively, worldwide, and a frequency of 24.2% to 55% and 7.7% to 10.3%, respectively, in the Czech Republic.^{27,31} Similarly, HPV 16 was the most frequent genotype in this study, reflected in the finding that 31.3% of HPV-positive samples were HPV16 positive. On the other hand, HPV18 was detected in only 4.12% cases.

Although parallel cervical and cervicovaginal samples were not compared, the frequency of hrHPV-positive samples was comparable for both clinician-collected samples and self-samples, with a difference of only 1.7%. Similarly, the distribution of HPV-positive samples between cervical and cervicovaginal swabs was comparable within individual HPV subgroups.

This finding was consistent with the results of several large meta-analyses.^{18,32,33} Petignat et al³³ reported a comparable average frequency of hrHPV-positive samples between self-sample and physician-collected sample groups (24.1% versus 24.8%), with a difference ranging between 0.3% and 22.2% (median, 4.9%). These differences could have been caused by the use of different types of self-sampling devices, which affects the sensitivity and specificity of the examination. The PCR-based HPV testing of self-samples collected by brush or lavage has reached the highest relative sensitivity and specificity.³² In this study, the analytical sensitivity and specificity of all detection methods evaluated also were comparable for self- and clinician-sampling. Only the sensitivity of the PapilloCheck assay was 5.4% higher for cervical swabs than for cervicovaginal swabs ($P = 0.441$). The marginal differences between the sensitivity (1.7% to 5.4%) and specificity values (0.5% to 4.0%) of HPV detection methods analyzed using self- and clinician-samples could be caused by the varied sizes of the sample groups analyzed.

In conclusion, this study showed a high concordance between all tested methods. The concordance was the

highest between the cobas 4800 HPV Test and the PapilloCheck HPV-Screening assay, and the lowest between the PapilloCheck HPV-Screening assay and the LMNX Genotyping Kit HPV GP. The analytical parameters of all methods tested were comparable; however, the cobas 4800 HPV Test showed the highest analytical sensitivity and specificity. The LMNX Genotyping Kit HPV GP showed the highest detection failure rate and the highest demands for DNA content, which may be limiting in clinical practice.

Acknowledgments

We thank Rastislav Slavkovsky (Palacky University Olomouc, Olomouc, the Czech Republic) for writing and editing assistance, and Miroslav Soural (Palacky University Olomouc, Olomouc, the Czech Republic), Jiri Lukes (University Hospital Olomouc, Olomouc, the Czech Republic), and Vaclav Ranc (Palacky University Olomouc, Olomouc, the Czech Republic) for analysis of transport media composition.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.07.004>.

References

- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Talaa L, Gaha N, Freeman C, Galichet L, Coglian V: A review of human carcinogens—part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009, 10:321–322.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003, 348:518–527.
- Aubyn M, Ronco G, Antilla A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Nauder P, Sankaranarayanan R, Peto J: Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012, 30 Suppl 5:S88–P99.
- Nauder P, Ryd W, Tomberg S, Strand A, Wadell G, Elfgen K, Radberg T, Strandler B, Johansson B, Forstrand O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J: Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007, 357:1589–1597.
- Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Ghiringhella B, Giraldo S, Gilio-Tos A, De Marco L, Naldoni C, Plesoni P, Rizzolo R, Schincaglia P, Zorzi M, Zappa M, Segnan N, Cuzick J: New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group: Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010, 11: 249–257.
- Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhout FJ, Verbeijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruttinga W, van Ballegoijen M, Snijders PJ, Meijer CJ: Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007, 370: 1764–1772.
- Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, Gilham C, Baysson H, Roberts C, Dowle R, Deml M, Mather J, Bailey A, Turner A, Moss S, Peto J: HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2009, 10:672–682.
- Aubyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Koçjan BJ, Poljak M: Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect* 2015, 21:817–826.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustemeier JE, Lloveras B, et al: Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010, 11: 1048–1056.
- Khan MJ, Castle PE, Lortcuz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Ruth BB, Glass AG, Schiffman M: The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97:1072–1079.
- Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE: Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 2006, 103:12–17.
- Soderlund-Strand A, Kjelberg L, Dillner J: Human papillomavirus type-specific persistence and recurrence after treatment for cervical dysplasia. *J Med Virol* 2014, 86:634–641.
- Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J, van Kemenade F, WJ Melchers WJ, Duimelmeijer NF, Verkaaijen M, Meijer CJ, Snijders PJ: Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol* 2011, 49:3983–3985.
- Lloveras B, Gomez S, Alameda F, Bellonillo B, Mojal S, Muset M, Para M, Palomares JC, Serrano S: HPV testing by cobas HPV test in a population from Catalonia. *PLoS One* 2013, 8:e58153.
- Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ: Comparison of the clinical performance of PapilloCheck human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. *J Clin Microbiol* 2010, 48:797–801.
- Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Aubyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ: Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009, 124:516–520.
- Geraets DT, Cuschieri K, de Koning MN, van Doorn LJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Quint WG, Aubyn M: Clinical evaluation of a GP5+/6+-based Lumina assay having full high-risk human papillomavirus genotyping capability and an internal control. *J Clin Microbiol* 2014, 52:3996–4002.
- Aubyn M, Castle PE: Offering self-sampling kits for HPV testing to reach women who do not attend in the regular cervical cancer screening program. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015, 24:769–772.
- Gok M, Heideman DA, van Kemenade FJ, Berkhof J, Rozendaal L, Spruyt JW, Voorhout F, Belien JA, Babovic M, Snijders PJ, Meijer CJ: HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening: cohort study. *BMJ* 2010, 340:c1040.
- Duskova J, Bekova A, Dvorak V, Majek O, Dusek L: Results of the Czech National cervical cancer screening programme. *Klin Onkol* 2014, 27 Suppl 2:79–86.
- Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Romain C: Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods* 2009, 156:77–83.
- Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Wright C, Lyons D, Szaewski A: Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer* 2013, 108:908–913.
- Park Y, Lee E, Choi J, Jeong S, Kim HS: Comparison of the Abbott RealTime high-risk human papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 assays to direct sequencing and genotyping of HPV DNA. *J Clin Microbiol* 2012, 50:2359–2365.

24. Auby M, Depuydt C, Benoy I, Bogen J, Caschlen K, Schmitt M, Pawlita M, Genest D, Heard I, Gheit T, Tommasino M, Poljak M, Bonde J, Quint W: VALGENT: a protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *J Clin Virol* 2016, 76 Suppl 1: S14–S21
25. Lindemann ML, Dominguez MJ, de Antonio JC, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, Khin H, Ravet S, Boyle S, Aldrich C, Halfon P: Analytical comparison of the cobas HPV test with Hybrid Capture 2 for the detection of high-risk HPV genotypes. *J Mol Diagn* 2012, 14:65–70
26. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J: Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol* 2014, 52:449–459
27. Tachezy R, Smahelova J, Kaspiřkova J, Salakova M: Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One* 2013, 8:e79156
28. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, Clifford GM: Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* 2012, 131:2349–2359
29. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S: Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010, 202:1789–1799
30. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, Bosch FX: Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007, 7:453–459
31. Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, Mikyskova I, Smabel M, Van Ranst M, Kanka J, Havrankova A, Rob L, Gutner V, Slavik V, Anton M, Kratochvil B, Kotmova I, Vonka V: Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol* 1999, 58:378–386
32. Auby M, Verdoost F, Snijders PJ, Verhoef VM, Suonio E, Dillner I, Minozzi S, Bellisario C, Banzi R, Zhao FH, Hillemann P, Anttila A: Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2014, 15: 172–183
33. Pétignat P, Fatin DL, Bruchim I, Tramer MR, Franco EL, Coutlée P: Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2007, 105:530–535

The absence of high-risk human papillomavirus in Czech non-small cell lung cancer cases

Hana Jaworek, Vladimira Koudelakova, Rastislav Slavkovsky, Jiri Drabek, Marian Hajduch

Aims. The purpose of our study was to examine the presence of human papillomavirus (HPV) DNA in Czech patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Methods. A highly sensitive quantitative polymerase chain reaction (qPCR) detecting the E6 gene of HPV16, 18, 31, and 56 was designed. The limit of detection was assessed using serial dilutions of HPV-positive plasmids. The qPCR was validated on a set of 402 cervical swabs where the qPCR, Cobas, and PapilloCheck methods were tested in parallel. Finally, qPCR was used for HPV detection in a set of 80 patients with primary NSCLC, both from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and fresh frozen (FF) tissue samples.

Results. The qPCR method was able to reliably detect at least 4 copies of the E6 gene per reaction in HPV16, 18, and 31, and 40 copies per reaction in HPV56. The sensitivity and specificity of the qPCR were 75.6-99.3% and 63.9-100% respectively, depending on the HPV genotype and reference method used. HPV DNA was not detected in the FFPE and FF samples from the set of 80 NSCLC patients.

Conclusion. No hrHPV DNA was found in primary NSCLC tumors from a Czech population.

Keywords: human papillomavirus, non-small cell lung cancer, PCR, HPV16, HPV18

Received: August 23, 2018; Accepted: December 11, 2018; Available online: January 10, 2019

<https://doi.org/10.5507/bp.2018.079>

Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 1333/5, 779 00 Olomouc, Czech Republic

Corresponding author: Vladimira Koudelakova, e-mail: vladimira.koudelakova@upol.cz

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide. The pathogenesis of lung cancer is a complex interaction between environmental and genetic factors. Exposure to tobacco smoke (active or passive), radiation, radon, asbestos, hard metals, indoor/outdoor air pollution and genetics were identified as main etiologic factors for lung cancer development¹. However, several viral infections were identified as human carcinogens, including the human papillomavirus (HPV) infection². The carcinogenic role of high-risk (hr) HPV infection has been demonstrated in almost all cervical carcinomas, and in a subset of oropharyngeal and anogenital (penile, vaginal, vulvar, and anal) cancers³.

The respiratory tract is located close to the oropharynx, where HPV is a known causal agent of a subset of cancers⁴. Moreover, the HPV infection is the causal agent of benign respiratory papillomas that occasionally progress to malignancy^{5,6}. In addition, lung tumors have morphological similarities to anogenital cancers caused by HPV (ref.^{7,8}). These facts led to the hypothesis that there is an association between HPV infection and lung cancer. Several studies have examined the impact of the HPV infection on lung cancer development, including large meta-analyses, but with conflicting results^{9,10}.

HPV prevalence, as reported in these studies, ranged from 0% to 78% and showed extreme geographical variability¹¹. HPV prevalence was significantly higher in South American and Asian studies compared to European

ones¹². The presence of E6/E7 mRNA is the most informative for recognizing biologically-relevant HPV infection. A recent, large Central European study found no active HPV infections in its samples even though the samples were 10% positive for HPV DNA (ref.¹⁴).

While several studies have shown the presence of HPV in lung cancer, the causative role of HPV in lung carcinogenesis remains unclear. The objective of this study was to determine HPV prevalence in NSCLC in the Czech Republic, and its potential clinical significance.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids containing HPV DNA

Plasmids containing HPV16 (pHPV16 purified plasmid DNA, ATCC® 45113D™), HPV18 (HPV18 purified plasmid DNA, ATCC® 45152D™), and HPV56 (HPV56 clone 2C purified plasmid DNA, ATCC® 40549™) genomes were purchased from ATCC (Rockville, MD); these plasmids were used to determine the limit of detection (LOD) of the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method developed for this study. Plasmids containing HPV31 genome were kindly provided by L.A. Laimins (Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, USA). Serial dilutions of 4, 40, 400, 4000, 40000, and 400000 copies of HPV genome per reaction were prepared from the plasmid DNA to generate standard curves by plotting DNA concentrations against cycle threshold values (C_t).

Clinical specimen collection

The qPCR method was validated using a set of 402 cervical swabs which were collected in cobas[®] PCR Cell Collection media (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and stored and transported at room temperature. Next, the qPCR was used to determine the presence of HPV in a cohort of 80 patients who had experienced radical surgical resection of primary NSCLC between 2009 and 2013. Histology slides were reviewed for classification, grading, and pathological staging. Surgical resection was considered the primary treatment method for all cases with (n=42) or without (n=38) adjuvant therapy. No patients had prior tumor diagnoses. Table 1 summarizes the clinicopathological characteristics of the patient cohort in this investigation.

DNA Extraction and BRAF, KRAS, EGFR mutation analysis

DNA from the cervical samples of the validation set was isolated using cobas x 480 and analyzed using the cobas[®] 4800 HPV Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), PapilloCheck[®] HPV-Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), and the HPV16, 18, 31, 56 qPCR in parallel.

DNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and fresh frozen (FF) tissue from the same NSCLC tumor sample was isolated using a cobas[®] DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to manufacturer's instructions.

DNA isolated from FFPE tissue was subjected to further testing to determine the presence of *KRAS*, *EGFR*, and *BRAF* mutations. Tests for the *BRAF* mutation in all FFPE samples were conducted using the BRAF p.Val600Glu kit (IntellMed, Olomouc, Czech Republic). The Cobas[®] EGFR Mutation Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used to detect *EGFR* mutations. The TheraScreen[®]: K-RAS Mutation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used to detect *KRAS* mutations. All detection methods used were performed according to the manufacturer's recommendations.

HPV DNA detection

DNA of the HPV16, 18, 31, and 56 was detected using type-specific multiplex qPCR simultaneously detecting the *E6* HPV gene and the human *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene. The qPCR was performed with 2 µL of total DNA, Thermo-Start DNA polymerase (ThermoScientific, Waltham, MA), and the PCR primers and probes listed in Table 2 using LightCycler[®] 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The qPCR conditions consisted of 95 °C for 15 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. LightCycler[®]480 software (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used for data evaluation. A special stringent protocol was followed to avoid specimen contamination, including glove changes after DNA extraction of each sample, use of barrier pipette tips, and daily cleaning of all laboratory surfaces and equipment

Table 1. Clinicopathological characterization of 80 patients with primary non-small cell lung cancer

| Characteristic | n (%) | |
|------------------------|-----------------------|-------------|
| | | |
| Sex | Female | 26 (32.5%) |
| | Male | 54 (67.5%) |
| Smoking ^a | Never-smokers | 9 (11.25%) |
| | Former smokers | 27 (33.75%) |
| | Current smokers | 34 (42.5%) |
| | NA | 10 (12.5%) |
| Grading | G1 | 8 (10%) |
| | G2 | 24 (30%) |
| | G3 | 48 (60%) |
| Histology | ADC | 27 (33.75%) |
| | SCC | 42 (52.5%) |
| | LCC | 9 (11.25%) |
| | ASC | 2 (2.5%) |
| Lymph nodes metastasis | Yes | 26 (32.5%) |
| | No | 53 (66.3%) |
| | NA | 1 (1.25%) |
| Distant metastasis | Yes | 0 (0%) |
| | No | 80 (100%) |
| <i>KRAS</i> | Wild type | 67 (83.75%) |
| | Mutation ^b | 13 (16.25%) |
| <i>EGFR</i> | Wild type | 73 (91.25%) |
| | Mutation ^c | 7 (8.75%) |
| <i>BRAF</i> | Wild type | 77 (96.25%) |
| | Mutation V600E | 2 (2.5%) |
| | NA | 1 (1.25%) |

NA - not available; ADC - adenocarcinoma; SCC - squamous cell carcinoma; LCC - large cell carcinoma; ASC - adenosquamous carcinoma
^aself-reported smoking status; ^b includes G12A, G12C, G12D, G12S, G12V and G13D; ^c includes deletion of exon 19, insertion in exon 20 and G719X

by DNA-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). At least two no-template, control reaction mixtures (negative controls) were included in each run. All patient samples were analyzed in triplicate for the presence of HPV16, 18, 31, and 56 *E6* DNA and *GAPDH*.

The cobas[®] 4800 HPV Test and PapilloCheck[®] HPV-Screening were used, according to manufacturer's recommendations, to validate the qPCR HPV detection method described above. The cobas[®] 4800 HPV Test detects HPV16, 18, and 12 other hrHPV genotypes (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) in a pooled result¹¹, while the PapilloCheck[®] HPV-Screening provides genotyping information about 18 hrHPV genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, and 82) and 6 hrHPV genotypes (HPV6, 11, 40, 42, 43, and 44/55) (ref.¹⁴).

Statistical analysis

Sensitivity, specificity, concordance, and Cohen κ values were calculated for data from all qPCR assays using R version 3.5.0 (R Development Core Team, <http://www.r-project.org>, last accessed July 11, 2018). The cobas® 4800 HPV Test results were used as references for HPV16 and HPV18 DNA, and the PapilloCheck® HPV-Screening results were used as references for all tested genotypes.

RESULTS

Detection limit of the qPCR method

The limit of detection (LOD) for the qPCR method was determined using plasmid DNA containing the genomes of HPV16, 18, 31, and 56. Serial dilutions of

each type of HPV with concentrations ranging from 4 to 400000 copies of the HPV genome per reaction were analyzed in five replicates. The qPCR method reliably detected HPV genomes in samples that contained at least 4 copies of the *E6* gene in HPV 16, 18, and 31 genotypes, and 40 copies of the *E6* gene in HPV56 (Table 3).

Validation of the qPCR method

A set of 402 cervical swabs was used to validate the novel qPCR method by evaluating its sensitivity and specificity. Two established detection methods, the Cobas® 4800 HPV Test and the PapilloCheck® HPV-Screening, were used in parallel with the qPCR method to determine the presence of HPV 16, 18, 31, and 56. The Cobas® 4800 HPV Test provided specific genotyping information for HPV 16 and HPV 18 only, while the PapilloCheck® HPV-Screening provided genotyping information for all tested

Table 2. Characteristics of HPV16, 18, 31, and 56 *E6* and *GAPDH* primers/probes.

| Gene | Primer/probe | DNA sequence | Product size (bp) |
|-------------------|--------------|--|-------------------|
| HPV16 <i>E6</i> * | Forward | 5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3' | 81 |
| | Reverse | 5'-TGTATAGTTGTTGCAGCTCTGTGC-3' | |
| | Probe | BHQ1-CAGGAGCCGACCCAGAAAGTTACCACAGTFHEX | |
| HPV18 <i>E6</i> | Forward | 5'-CCCTACAAGCTACCTGATCT-3' | 100 |
| | Reverse | 5'-CGGAACTGAACACTTCACTGCAAG-3' | |
| | Probe | BHQ1-CCTCTGTAAGTTCCAATACTGTG-HEX | |
| HPV31 <i>E6</i> | Forward | 5'-CCATGGAGCCACAATTCA-3' | 134 |
| | Reverse | 5'-CCTGCACCACCTTGAGTGAGGTATF3' | |
| | Probe | BHQ1-CTCAGCACGTGTTAGTTCFHEX | |
| HPV56 <i>E6</i> | Forward | 5'-GCAGAAAGACCTCGGAAAT-3' | 95 |
| | Reverse | 5'-CTCGGCATTGGAAATACCCTACGA-3' | |
| | Probe | BHQ1-AACTGACCTTGCAGTAGAC-HEX | |
| <i>GAPDH</i> | Forward | 5'-GAGTGAGTGGAAGACAGAATG-3' | 70 |
| | Reverse | 5'-CAACTAGGATGGTGTGGCTCCC-3' | |
| | Probe | BHQ1-GGGACACAAGGTTACCATATAC-CY5 | |

* Primers for HPV16 detection were designed by Peitsaro et al. (ref²⁸)

Table 3. Evaluation of the detection limit of the qPCR method.

| HPV <i>E6</i> gene copies/ reaction | HPV16* (95% CI) | HPV18* (95% CI) | HPV31* (95% CI) | HPV56* (95%CI) |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 4x10 ⁵ | 20.02 (19.84-20.19) | 20.59 (20.49-20.69) | 19.85 (19.76-19.95) | 23.05 (21.99-24.16) |
| 4x10 ⁴ | 23.46 (23.25-23.67) | 24.99 (24.12-25.85) | 23.23 (23.15-23.32) | 26.45 (25.74-27.13) |
| 4x10 ³ | 26.92 (26.78-27.07) | 27.38 (27.30-27.46) | 26.60 (26.51-26.69) | 30.17 (29.97-30.36) |
| 4x10 ² | 30.28 (30.13-30.43) | 30.87 (30.71-31.02) | 29.86 (29.76-29.96) | 33.45 (32.02-34.88) |
| 4x10 ¹ | 33.73 (33.52-33.94) | 34.14 (33.62-34.65) | 33.27 (32.96-33.58) | 36.80 (36.24-37.35) |
| 4x10 ⁰ | 37.07 (36.72-37.42) | 36.69 (36.07-37.31) | 35.59 (35.29-35.89) | - |

CI - confidence intervals

*The average C_t value of 5 dilution series analysed in duplicate

Table 4. Specificity and sensitivity of qPCR amplifications of HPV16, 18, 31, and 56 *E6* genes in samples of the validation set

| Genotype | Tested method | Reference method | N | SE | SP | κ (95% CI) | PPV | NPV |
|----------|---------------|------------------|-----|-------|-------|---------------------|-------|-------|
| HPV16 | qPCR | PapilloCheck | 182 | 0.993 | 0.735 | 0.801 (0.683-0.919) | 0.942 | 0.962 |
| | | Cobas 4800 | 182 | 0.975 | 0.880 | 0.840 (0.725-0.956) | 0.981 | 0.846 |
| HPV18 | qPCR | PapilloCheck | 60 | 0.958 | 0.639 | 0.551 (0.357-0.745) | 0.639 | 0.958 |
| | | Cobas 4800 | 60 | 0.947 | 1.000 | 0.930 (0.834-1.025) | 1.000 | 0.917 |
| HPV31 | qPCR | PapilloCheck | 93 | 0.985 | 0.880 | 0.888 (0.780-0.995) | 0.957 | 0.957 |
| HPV56 | qPCR | PapilloCheck | 67 | 0.756 | 0.955 | 0.636 (0.457-0.815) | 0.971 | 0.656 |

SE - sensitivity; SP - specificity; κ - Cohen's kappa coefficient; CI - confidence intervals; PPV - positive predictive value; NPV - negative predictive value

genotypes. Therefore, the results of detection of HPV31 and HPV56 by the qPCR were compared to detection by the PapilloCheck® HPV-Screening results only. Samples were also tested for cross-reactivity with other HPV genotypes. Table 4 below presents the results of these comparisons.

For HPV16 detection, sensitivity and specificity levels of the qPCR were comparable to both the PapilloCheck® HPV-Screening and Cobas® 4800 HPV Test. A comparison of the qPCR method with the PapilloCheck® HPV-Screening showed sensitivity of 99.3% and specificity of 73.5%. A comparison of the qPCR method with the Cobas® 4800 HPV Test showed sensitivity of 97.5% and specificity of 88.0%.

For HPV18 detection, a comparison of the qPCR method with the PapilloCheck® HPV-Screening showed sensitivity of 95.8% and specificity of 63.9%. A comparison of the qPCR method with the Cobas® 4800 HPV Test showed sensitivity of 94.7% and specificity of 100%.

For HPV31 and HPV56, a comparison of the qPCR method with the PapilloCheck® HPV-Screening showed sensitivity of 98.5% and 75.6%, respectively, and specificity of 88.0% and 95.5%, respectively.

No cross-reactivity was found in the qPCR detection method among any of the genotypes tested.

HPV DNA detection in NSCLC

All primary NSCLC samples were negative for HPV16, 18, 31, and 56 in both FFPE (80/80, 100%) and FF samples (80/80, 100%). The amplification of the internal control, *GAPDH*, was successful in all tested DNA samples ($C_t < 30$). The qPCR was therefore successful in all 80 FFPE samples as well as all 80 FF samples.

DISCUSSION

The results of this study confirm the low prevalence of hrHPV infection in primary NSCLC. HPV16, 18, 31, and 56 were not detected in this study population. This finding corroborates the findings of other studies conducted in Western European countries¹⁷⁻²⁰. One recent large study involved lung cancer patients from six Central European countries, including patients from the Czech Republic (the number of participating Czech patients was unavailable). HPV16 DNA was detected in 6.6% of lung

tumors in 290 of the available tissue samples. However, after testing the samples at the transcription level, none of the tumors expressed viral mRNA (ref.²¹).

In other studies, reports of the prevalence of HPV associated with lung tumors demonstrate extremely large heterogeneity, ranging from 0% to 78% (ref.¹³). HPV16 and HPV18 were the most frequently detected genotypes in lung tumors, with high geographical variability¹². The highest prevalence of HPV16/18 was found in South/Central America, followed by Asia, North America, and Europe, with adjusted prevalence values of 22%, 5%, 4%, and 3% respectively¹². Geographical differences in the prevalence of HPV in lung tumor tissue could be associated with cultural variations in sexual behaviour, smoking habits, genetics, or environmental exposures^{21,11}.

High variability in HPV DNA prevalence could also be observed within a country. Chinese studies, for example, show HPV prevalence in China ranging from 8.4% to 73% (ref.^{22,23}). High rates of false positives could be contributing to the large variability in HPV prevalence. For this reason, extensive efforts should be made to avoid contamination during HPV DNA detection. Our results indicate that the stringent contamination precautions we took while conducting pre-PCR and PCR activities were sufficient for avoiding contamination. Moreover, the presence of HPV DNA does not signify an active HPV infection, and samples found positive for HPV DNA are frequently negative for HPV transcripts^{14,22}. The measurement of viral *E6/E7* transcripts is widely considered the gold standard for detecting biologically-relevant HPV infection. If possible, expression levels of viral oncoproteins should be tested to establish the causal role of the HPV in lung carcinogenesis in HPV-positive lung tumors.

Unlike cervical cancer, the HPV viral load in lung cancer is very low, with less than one copy per cell²⁴. However, like cervical cancer, HPV frequently integrates into the host genome, typically causing *E2* gene disruption²⁴⁻²⁷. In some studies, HPV infection may have been overlooked when the assay targeted the part of the HPV genome that is lost during integration. Thus, a sufficiently sensitive method for detecting a more appropriate HPV region is necessary to avoid false negatives. We designed a qPCR assay with a very low LOD to eliminate the likelihood of false negativities. This qPCR can detect up to 4 or 40 copies of HPV DNA per reaction, and ampli-

fies the *E6* HPV gene which is necessary for HPV-related cancer development and is, therefore, present during all clinically-relevant infections²⁴.

DNA degradation usually occurs in FFPE samples, and these samples can produce false negative results. The quality of the DNA obtained from the samples for the qPCR HPV detection assay developed for this study, including DNA isolated from FFPE samples, was confirmed by a sufficient 260/280 ratio and successful amplification of internal control gene *GAPDH*. Moreover, both FF as well as FFPE samples from each patient were tested to detect any positive HPV DNA in a given patient that may have been missed if only FFPE samples were tested.

CONCLUSION

In conclusion, no HPV was detected in Czech patients with non-small cell lung cancer despite the use of a very sensitive qPCR test. As is consistent with other studies, no etiologic role of the hrHPV infection in the development of primary NSCLC was identified in the Czech population. Further investigation involving a larger number of lung cancer tissues is required to reach safe conclusions.

Acknowledgement: This work was supported by a grant, NPS I LO1304, from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports.

The authors would like to thank Dr. Laimonis A. Laimins (Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, USA) for providing of plasmid containing HPV31 genome and Dr. Jana Vrbkova for statistical analysis.

Author contributions: HJ, VK, RS: conceived and designed the experiment; HJ: performed the HPV analysis; JD: performed the *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* mutation analysis; HJ, VK: analysed the data and wrote the manuscript; MH: final approval.

Conflict of interest statement: None declared.

Ethics approval and consent to participate: Study proposals were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Dentistry of Palacky University Olomouc and the Faculty Hospital in Olomouc (approval no. 122/11) in compliance with the Helsinki Declaration. Written informed consent for the use of collected samples for research was obtained from all study participants.

REFERENCES

- Spyratos D, Zargoulidis P, Porpodis K, Tsalikis K, Machairiotis N, Katsikogiannis N, Kougloumizil I, Dryllis G, Kallianos A, Rapti A, Li C, Zargoulidis K. Occupational exposure and lung cancer. *J Thorac Dis* 2013;5 Suppl 4:5440-5445.
- Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* 2010;10(12):878-89.
- Gao G, Smith DL. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. *Cytogenet Genom Res* 2016;150(3-4):185-93.
- Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2018;18(5):269-82.
- Katsenos S, Becker HD. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: a propos of two cases and a brief literature review. *Case Rep Oncol* 2011;4(1):162-71.
- Carri M, Napolitano D, Morandi M, Dell'Olivo D. Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. *Thor Clin Risk Manag* 2015;11:731-8.
- Syrjanen KJ. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case. *Respiration* 1979;38(5):299-304.
- Rubel L, Reynolds RE. Cytologic description of squamous cell papilloma of the respiratory tract. *Acta Cytol* 1979;23(3):227-31.
- Xiong WM, Xu QP, Li X, Xiao RD, Cai L, He F. The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(56):96419-32.
- Zhai K, Ding J, Shi HZ. HPV and lung cancer risk: a meta-analysis. *J Clin Virol* 2015;63:84-90.
- Syrjanen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* 2012;32(8):3235-50.
- Ragin C, Obkoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koryama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene LH, Wang J, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, Sarchanaki E, Syrjanen K, Tiao MS, Sykes J, Hsu SW, Yokota J, Zaravinos A, Taloli E. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis* 2014;35(6):1267-75.
- Srinivasan M, Taloli E, Ragin CC. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers—a meta-analysis. *Carcinogenesis* 2009;30(10):1722-8.
- Anantharaman D, Ghelt T, Waterboer T, Halec G, Carneira C, Abedi-Ardakan B, McKay-Chopin S, Zaridze D, Mukarla A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Matos D, Janout V, Forstova L, Bendok V, Rudnal F, Fabianova E, Tjonneland A, Travis RC, Boeing H, Quiros JR, Johansson M, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Kotanidou A, Clavel-Chapelon F, Weiderpass E, Johansson M, Pawlita M, Scalo G, Tommasino M, Brennan P. No causal association identified for human papillomavirus infections in lung cancer. *Cancer Res* 2014;74(13):3525-34.
- GmbH RD. Cobas[®]4800 HPV Test. Roche Molecular Systems Inc 2012
- GmbH. PapilloCheck[®] high-risk. Greiner Bio-One 2012
- Koshiol J, Rotunno M, Gillison ML, Van Doorn LJ, Chaturvedi AK, Tarantini L, Song H, Quint WG, Struik L, Goldstein AM, Hildesheim A, Taylor PR, Wacholder S, Bertazzi PA, Landi MT, Caporaso NE. Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(6):501-7.
- Coltard CJ, Besson G, Polette MC, Monteau M, Birembaut PL, Clavel CE. Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas: a study of 218 cases. *Mod Pathol* 2005;18(12):1606-9.
- Galkan A, Noci S, Tavera F, Lombardo C, Franceschi S, Pastorino U, Dragan T. Testing of human papillomavirus in lung cancer and non-tumor lung tissue. *BMC Cancer* 2012;12:512.
- van Boerdonk RA, Daniels JM, Bloemena E, Kringsman O, Steenbergen RD, Brakenhoff RH, Grunberg K, Ystra B, Meijer CJ, Smit EF, Snijders PJ, Heideman DA. High-risk human papillomavirus-positive lung cancer: molecular evidence for a pattern of pulmonary metastasis. *J Thorac Oncol* 2013;8(6):711-8.
- Cheng YW, Chiou HL, Shau GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 2001;61(7):2799-803.
- Yu Y, Liu X, Yang Y, Zhao X, Xue J, Zhang W, Yang A. Effect of FHIT loss and p53 mutation on HPV-infected lung carcinoma development. *Oncol Lett* 2015;10(1):392-8.
- Xu Y, Cheng B, Pan H, Wu A, Zhang L. [The Relationship between the Status of Human Papillomavirus 16/18 Infection and the Expression of Bcl-2 and Bax in Squamous Cell Carcinomas of the Lung]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2009;12(8):849-52.
- Xiong WM, He F, Xiao RD, Yu TT, Zhang X, Liu ZQ, Xu QP, Cai L. [Association between human papillomavirus infection and lung cancer]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2016;37(12):1658-61.
- Argyri E, Tsimplaki E, Markatos C, Politis G, Panotopoulou E.

- Investigating the role of human papillomavirus in lung cancer. *Papillomavirus Res* 2017;3:7-10.
26. de Freitas AC, Gurgel AP, de Lima EG, de Franca Sao MB, do Amaral CM. Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;142(12):2415-27.
27. Baba M, Castillo A, Koriyama C, Yanagi M, Matsumoto H, Natsugoe S, Shuyama KY, Khan N, Higashi M, Itoh T, Bzuru Y, Aikou T, Akiba S. Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. *Oncol Rep* 2010;23(4):1085-92.
28. Paikaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):886-91.