

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Kateřina Kubáňová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Validace genotypizace HPV68 v cervikálních stěrech.

Bakalářská práce

Kateřina Kubáňová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Hana Jaworek

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Hany Jaworek a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 3. 4. 2018

.....

Kateřina Kubáňová

Souhrn

Infekce lidskými papilomaviry (HPV) je jednou z nejrozšířenějších sexuálně přenosných infekcí u mužů i žen po celém světě. Přetrvávající infekce vysoce rizikovými HPV viry může vést ke vzniku maligních lézí anogenitálního traktu, u žen především ke karcinomu cervixu. Neustálý vývoj screeningových metod a zlepšování jejich senzitivity a specifity, je klíčový pro včasnou diagnostiku přednádorových a nádorových změn v oblasti cervixu.

Cílem této práce byla validace nové detekční metody pro HPV68, která by sloužila k potvrzení pozitivitu vzorku pro tento genotyp v případech, kdy se rutinně používané CE-IVD HPV DNA detekční metody Cobas[®] 4800 HPV Test a PapilloCheck[®] HPV-Screening test neshodují. Mezi další cíle práce patřilo objasnění příčiny rozdílnosti výsledků získaných při detekci HPV68 pomocí dvou výše uvedených CE-IVD HPV detekčních metod. Výsledky získané pomocí těchto dvou detekčních metod byly porovnány s údaji získanými pomocí nově navržené kvantitativní multiplex real-time PCR, která byla využita k potvrzení přítomnosti infekce genotypem HPV68 ve 42 cervikálních a cervikovaginálních stěrech, a ve vzorku cervikálního karcinomu. Ve všech vzorcích byla určena virální nálož a forma HPV infekce (epizomální nebo integrovaná). Cílovými geny multiplex real-time PCR byly HPV68 geny *E2* a *E6*, které hrají důležitou roli při integraci viru do genomu hostitele a gen pro GAPDH, který byl použit jako interní kontrola amplifikace. Oblast genu *E6* byla dále využita k rozlišení subtypů HPV68a a HPV68b v jednotlivých vzorcích pomocí touchdown PCR s následnou analýzou křivek tání (HRM).

Výsledky multiplex real-time PCR i PapilloCheck[®] HPV-Screening testu prokázaly přítomnost HPV68 ve všech studovaných vzorcích. Cobas[®] 4800 HPV Test detekoval přítomnost HPV68 pouze u 39,4 % vzorků. Falešně negativní výsledek byl zaznamenán u více než poloviny vzorků infikovaných pouze genotypem HPV68. Jako příčina rozdílnosti výsledků byla identifikovaná nízká senzitivita Cobas[®] 4800 HPV Testu pro subtyp HPV68a. Cobas[®] 4800 HPV Test je rutinně používaným HPV screeningovým testem, který je zároveň používán v mnoha studiích. Prevalence HPV68 může být díky jeho nižší senzitivě vůči HPV68a falešně nižší.

Summary

Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most common sexually transmitted diseases in men and women. Persistent HPV infection with high-risk HPV can lead to malignant transformations of anogenital tract, primarily to cervical cancer in women. Incessant development of new screening strategies and increase in their sensitivity and specificity is key for early detection of precancerous and cancerous changes of the cervix area.

The aim of this study was validation of a new detection method for HPV68, which could be used to confirm the occurrence of this genotype in case of the discrepancy between the commonly used CE-IVD HPV DNA detection methods Cobas[®] 4800 HPV Test and PapilloCheck[®] HPV-Screening test. The aim was also to clarify the cause of the discrepancy between the results obtained with the two mentioned CE-IVD HPV detection methods. Results obtained from the two methods were then compared with results from the newly designed quantitative multiplex real-time PCR, which was used to confirm the occurrence of HPV68 infection in 42 cervical and cervicovaginal swab samples, and a sample of cervical cancer. All the samples were tested for viral load and were examined on the type of infection (episomal or integrated). Targeted genes for the multiplex real-time PCR were *E2* and *E6*, which play an important role in the integration of the virus to the host's genome and the gene for GAPDH which was used as internal control of amplification. Detection of the *E6* gene region was also used to distinguish the two subtypes – HPV68a and HPV68b using touchdown PCR followed by high resolution melting (HRM).

The results obtained from both, quantitative multiplex real-time PCR and PapilloCheck[®] HPV-Screening test proved the presence of HPV68 in all studied samples. However, Cobas[®] 4800 HPV Test detected HPV68 only in 39,4 % of the studied samples. The false negative result was detected in more than half of HPV68 single type infection cases due to its lower sensitivity for HPV68a. Prevalence of HPV68 genotype could be falsely lower as the Cobas[®] 4800 HPV Test is routinely used HPV screening test and is used in the majority of published studies.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Haně Jaworek, za její odborné vedení, čas, trpělivost, ochotu a přátelský přístup po celou dobu práce v laboratoři i při následném písemném zpracování mé bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala své rodině, za podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Lidské papilomaviry	3
3.1. HPV68	5
3.2. Struktura viru a jeho genom	7
3.3. Infekce HPV viry a jejich integrace do lidského genomu	10
4. Cervikální karcinom	13
4.1. Cervikální léze	15
4.2. Prevence	17
4.2.1. Vakcinace	17
4.3. Screening a HPV detekce	18
5. Experimentální část	21
5.1. Materiál, pomůcky a přístrojové vybavení	25
5.1.1. Použité chemikálie	25
5.1.2. Příprava roztoků	25
5.1.3. Biologický materiál	25
5.1.4. Pomůcky	25
5.1.5. Přístroje	26
5.1.6. Software	26
5.2. Vzorky cervikálních a cervikovaginálních stěrů	26
5.3. Pracovní postup	27
5.4. Kvantifikace virální nálože a určení formy HPV infekce	27
5.4.1. Návrh primerů a prób pro multiplex real-time PCR	27
5.4.2. Měření koncentrace DNA na přístroji Qubit 2.0	28
5.4.3. Testování navržených primerů	28
5.4.4. Testování prób	30
5.4.5. Určení limitu detekce	31
5.4.6. Testování cross-reakivity navrženého detekčního systému	31
5.4.7. Validace přítomnosti HPV68 v patientských vzorcích	33
5.5. Rozlišení subtypů HPV68 v patientských vzorcích	34
5.5.1. Návrh primerů pro HRM	34
5.5.2. Testování primerů	34
5.5.3. Testování subtypu HPV68 u patientských vzorků	36
6. Výsledky	37
7. Diskuze	41
8. Závěr	43
9. Seznam literatury	44
10. Přílohy	54

Seznam zkratek

ASC-H	atypické skvamózní buňky, nelze vyloučit dlaždicové intraepiteliální léze vysokého stupně
ASC-US	atypické skvamózní buňky neurčeného významu
BHQ1	komerčně dostupný flouroforový zhášec Black Hole Quencher-1
BHQ2	komerčně dostupný flouroforový zhášec Black Hole Quencher-2
BLAST	proteinová databáze Basic Local Alignment Search Tool
bp	pár bází (base pair)
CC	cervikální karcinom (cervical cancer)
CE-IVD	certifikované <i>in vitro</i> diagnostické metody
CEM	T-lymfoblastická leukémická buněčné linie
CIN	cervikální intraepiteliální neoplazie
CIN1	lehká dysplazie/intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu
CIN2	středně těžká dysplazie/intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu
CIN3	těžká dysplazie/intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu
CIS	karcinom <i>in situ</i> (carcinoma <i>in situ</i>)
CPI/II	komerční název primerů
Cy5	fluorofor cyanin
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DPEC	voda ošetřená dietyl pyrokarbonátem
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleotidová kyselina
dTTP	deoxytimidintrifosfát
E	časná oblast (early region), kódující oblast genomu papilomavirů
E1 – E6	časné proteiny papilomavirů
E2F-1	buněčný transkripční faktor kódovaný genem <i>E2F1</i>
EcoRI	restrikční místo stěpené restriční enzymem izolovaným z bakterie <i>Escherichia coli</i> kmenem RY13

EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
FAM	fluorescein
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GP5+/6+	komerční název primerů
hc2	signál amplifikující metoda detekce HPV Hybrid Capture 2
HEX	fluorofor hexachloro-fluorescein
HE	barvení buněk hematoxylinem a eosinem
HIV	syndrom získaného imunodeficitu (human immunodeficiency virus)
HPV/HPVs	lidský papilomavirus/lidské papilomaviry
HPV68a	subtyp genotypu HPV68
HPV68b	subtyp genotypu HPV68
HPV68Ref(R)	referenční sekvence pro virus HPV68
HR-HPV	vysoce rizikové lidské papilomaviry
HRM	vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting)
HS	vysoce senzitivní (high sensitive)
HSIL	dlaždicové intraepiteliální léze vysokého stupně (high-grade squamous intraepithelial lesion)
IA1	mikroinvazivní typ nádorů s invazí do hloubky 3 mm
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
ICTV	Mezinárodní komise pro klasifikaci virů (International Committee on Taxonomy of Viruses)
L	pozdní oblast (late region), kódující oblast genomu papilomavirů
L1	majoritní strukturní protein virové kapsidy
L2	minoritní strukturní protein virové kapsidy
LGL	léze nízkého stupně (low-grade lesion)
LRC (=URR)	nekódující dlouhá kontrolní oblast papilomaviru (long control region)
LR-HPV	nízko rizikové lidské papilomaviry
LSIL	dlaždicové intraepiteliální léze nízkého stupně (low-grade squamous intraepithelial lesion)
MAP	mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinases)
ME180	nádorová buněčná linie cervikálního karcinomu

MgCl ₂	chlorid hořečnatý
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MY09/11	komerční název primerů
ORF	čtecí rámeček (open reading frame)
p53	tumor supresorový protein kódovaný genem <i>TP53</i>
PaVE	genomová databáze papilomavirů (Papilloma virus genome database)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PGMY	komerční název primerů
pRb	tumor supresorový retinoblastomový protein
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní forma dusíku
ROS	reaktivní forma kyslíku
S fáze	syntetická fáze buněčného cyklu
SCJ	squamokolumnární junkce (squamocolumnar junction)
SIL	intraepiteliální léze dlaždicového epitelu (squamous intraepithelial lesion)
<i>Taq</i>	deoxyribonukleová polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TaqMan	hydrolyzační próby pro polymerázovou řetězovou reakci
TBS	hodnotící systém intraepiteliálních lézí Bethesda
Tris/EDTA	tris(hydroxymethyl)aminometan/ethylendiamintetraoctový pufr
URR	nekódující dlouhá kontrolní oblast papilomaviru (upstream regulatory region)
VL	virální nálož (viral load)
VLP/VLPs	virus-připomínající částice (virus-like particles)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
ZAP II	typ bakteriofága lambda

Seznam obrázků

Obr. 1:	Restrikční mapa DNA sekvencí ME 180 (HPV68b) a HPV68a	6
Obr. 2:	Fylogenetické vztahy mezi vybranými zástupci HPV patřících do HR-HPV rodu Alfa 7	7
Obr. 3:	Struktura virové kapsidy	8
Obr. 4:	Struktura HPV viru	8
Obr. 5:	Struktura genomu HPV viru	9
Obr. 6:	Vliv nadměrné exprese produktů genů <i>E6</i> a <i>E7</i> , při integraci HR-HPV viru, na regulaci buněčného cyklu	12
Obr. 7:	Světová incidence a mortalita cervikálního karcinomu v roce 2012 (počet onemocnění na 100 000 žen)	14
Obr. 8:	Schéma vzniku prekarcerózních a karcerózních změn cervikálního epitelu a jejich rozdělení podle jednotlivých hodnotících systémů	16
Obr. 9:	Porovnání cervikálního epitelu bez atypie spolu s CIN1 (atypické změny v dolní třetině epitelu), CIN2 (změny ve dvou třetinách epitelu) a CIN3 (atypie v celé šíři epitelu), barvení buněk hematoxylinem a eosinem (HE)	16
Obr. 10:	Schéma průběhu PCR reakce	23
Obr. 11:	Schéma hydrolýzy TaqMan próby	24

Seznam tabulek

Tab. 1:	Lidské papilomaviry a jejich klinické příznaky	5
Tab. 2:	Funkce jednotlivých HPV proteinů	9
Tab. 3:	Soupis reagensů k přípravě real-time PCR reakčních směsí k ověření funkčnosti primerů navržených do oblasti genů <i>E2</i> a <i>E6</i> HPV68	29
Tab. 4:	Program real-time PCR k ověření funkčnosti primerů navržených pro geny <i>E2</i> a <i>E6</i> HPV68.	29
Tab. 5:	Soupis reagensů pro přípravu multiplex real-time PCR reakční směsi k ověření funkčnosti primerů a práb pro oblasti genů <i>E2</i> a <i>E6</i> HPV68	30
Tab. 6:	Vzorky použité k vyloučení cross-reakce navrženého detekčního systému pro HPV68 s jinými HPV genotypy	32
Tab. 7:	Reagencie k přípravě reakční směsi pro multiplex real-time PCR k vyloučení cross-reakce navrženého systému s jinými HPV genotypy	32
Tab. 8:	Reagencie pro přípravu reakční směsi k rozlišení subtypů HPV68 pomocí HRM	35
Tab. 9:	Program HRM pro ověření funkčnosti primerů pro gen <i>E6</i> , sloužících k rozlišení subtypů HPV68	35
Tab. 10:	Rozdělení vzorků podle výsledků detekce použitých CE-IVD metod	38
Tab. 11:	Zastoupení jednotlivých forem infekce, rozdělených podle detekce HPV68 pomocí systémů PapilloCheck [®] HPV Screening a Cobas [®] 4800 HPV Testu	40
Tab. 12:	Zastoupení jednotlivých subtypů HPV68, rozdělených podle detekce HPV68 pomocí systémů PapilloCheck [®] HPV Screening a Cobas [®] 4800 HPV Testu	40

1. Úvod

Virus HPV je nezbytnou příčinou onkogeneze některých epiteliálních karcinomů anogenitální oblasti. Spojitost mezi vysoce rizikovými HPV viry infikujícími anogenitální trakt a cervikálním karcinomem byla poprvé odhalena na začátku osmdesátých let dvacátého století. Od té doby byl vliv infekce HR-HPV viry na vznik cervikálního karcinomu důkladně prozkoumán. I přes dostupnost HPV vakcín a screeningových testů, zůstává cervikální karcinom u žen celosvětově čtvrtým nejčastějším karcinomem. Každý rok je ve světě nově diagnostikováno přibližně 528 tisíc případů cervikálního karcinomu a přibližně 266 tisíc žen na toto onemocnění ročně zemře.

Vzniku cervikálního karcinomu předcházejí přednádorové změny buněk, tzv. prekancerózy. Přednádorové změny bývají zpočátku asymptomatické, proto je velmi důležité, aby ženy po zahájení sexuálního života pravidelně chodily na preventivní gynekologické prohlídky. Diagnostiku HPV infekcí je možné provádět pomocí přímých a nepřímých metod. Mezi nepřímé diagnostické metody patří cytologické, kolposkopické, histologické a sérologické vyšetření. Tyto metody zakládají potvrzení přítomnosti HPV infekce na průkazu charakteristických změn postižených tkání či buněk. Přímá diagnostika je založena na průkazu přítomnosti HPV částic nebo HPV DNA v postižených buňkách.

Neustálé zlepšování diagnostických metod je nezbytné pro snížení incidence přednádorových změn, a tím i incidence cervikálního karcinomu. Časně objevené přednádorové stavy lze úspěšně vyléčit. Čím později však dojde k diagnóze, tím je léčba náročnější a bohužel i méně úspěšná.

2. Cíl práce

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma lidské papilomaviry, s důrazem na jejich dělení, organizaci genomu, princip integrace do lidského genomu, vliv na vznik cervikálního karcinomu a na metody detekce HPV infekce.

Cílem experimentální části byla validace nové detekční metody pro HPV68, která by sloužila k potvrzení positivity vzorku pro tento genotyp v případech, kdy se rutinně používané CE-IVD HPV DNA detekční metody Cobas[®] 4800 HPV Test a PapilloCheck[®] HPV-Screening test neshodují. Mezi další cíle práce patřilo objasnění příčiny rozdílnosti výsledků získaných při detekci HPV68 pomocí dvou výše uvedených CE-IVD HPV detekčních metod. V rámci této práce mělo být prokázáno, zda je neshoda těchto detekčních metod způsobena nízkou virální náloží, vlivem integrace do lidského genomu nebo rozdílnou citlivostí metod pro subtypy HPV68a a HPV68b. Za účelem ověření přítomnosti HPV68 DNA, výpočtu virální nálože a určení formy infekce v jednotlivých vzorcích byla navržena kvantitativní multiplex real-time PCR. K rozlišení přítomnosti konkrétního subtypu HPV68 v testovaných vzorcích byla použita metoda založená na real-time touchdown PCR s následnou HRM. Tyto výsledky byly poté porovnány s výsledky Cobas[®] 4800 HPV Testu a PapilloCheck[®] HPV-Screening testu.

3. Lidské papilomaviry

Lidské papilomaviry (HPVs – human papilloma viruses) jsou malé, neobalené viry obsahující dvouvláknovou DNA, patřící do rodiny *Papillomaviridae*. Dříve byly tyto viry klasifikovány spolu s *Polyomaviridae* do společné rodiny *Papoviridae*, nyní tvoří samostatnou rodinu (Bernard *et al.*, 2010; Bofill-Mas, 2016; Burd, 2016).

Klasifikace HPV virů je ustanovena Mezinárodní komisí pro klasifikaci virů (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV), a je založena na variabilitě nukleotidové sekvence čtecího rámce (tzv. ORF – open reading frame), kodujícího pro strukturní kapsidový protein L1 (Artaza-Irigaray *et al.*, 2017). HPV se podle ICTV dělí na rody „genera“ (< 60% sekvenční homologie) a druhy „species“ (60 - 70% sekvenční homologie). HPV pak dále dělíme na typy „types“ (< 90% sekvenční homologie), subtypy „subtypes“ (90 - 98% sekvenční homologie) a varianty „variants“, které se mezi sebou liší méně než 2 % (de Villiers *et al.*, 2004; Gomez a Santos, 2007; Bernard *et al.*, 2010). Doposud bylo identifikováno více než 200 typů HPV, patřících do 49 druhů (označeny arabskými číslicemi) a pěti rodů: Alfa, Beta, Gama, Mu a Nu (Bzhalava *et al.*, 2015; Brianti *et al.*, 2017).

Infekce HPV viry je spojována s širokou škálou klinických příznaků, počínaje benigními lézemi až po karcinomy (viz Tab. 1). Jednotlivé HPV typy vykazují při infekci tkáňovou specificitu. Podle druhu epitelu, který infikují, rozlišujeme HPV typy na kožní a slizniční (Mistry *et al.*, 2008). Toto rozdělení se může částečně překrývat. Kožní HPV typy infikují bazální epitelální buňky keratinizujícího epitelu kůže, zejména kůži na rukou a chodidlech. Slizniční typy infikují především vnitřní epitel anogenitálního traktu, ale mohou se vyskytovat ve sliznici dutiny ústní, spojivky nebo ve sliznici dýchacích cest (Burd, 2003; Longworth a Laimins, 2004; Forman *et al.*, 2012). Tkáňový tropismus se u HPV virů liší mezi jednotlivými typy. HPV typy patřící mezi Alfa papilomaviry infikují sliznici, Beta, Gama, Mu a Nu papilomaviry infikují převážně kůži (Doorbar, 2006; Mui *et al.*, 2017).

Kožní HPV typy nejčastěji způsobují vznik plantárních, běžných nebo plochých bradavic. Kožní bradavice se přenáší přímým kontaktem s infikovanou tkání nebo nepřímo při kontaktu s virem kontaminovanými objekty (Burd, 2003). Infekce určitými HPV typy (viz Tab. 1), má také vliv na průběh vzácného genetického onemocnění epidermodysplasia verruciformis, tzv. Lewandowsky – Lutz syndrom. Jedná se o dědičné autozomálně recesivní kožní onemocnění, které se projevuje HPV asociovanými bradavicemi na trupu a horních

končetinách s vysokým rizikem vzniku karcinomu kůže (Cardoso a Calonje, 2011). Infekce typu HPV6 a HPV11 může zejména u malých dětí, ale i u dospělých, způsobit rekurentní respirační papilomatózu. Při tomto onemocnění vznikají v dýchacím traktu, především v hrtanu, četné benigní léze, u nichž může dojít k maligní transformaci (Gomez a Santos, 2007). Mezi další onemocnění spojené s HPV infekcí patří fokální epiteliální hyperplazie ústní dutiny (Heckova choroba), papilomy a karcinomy spojivky (Conway a Meyers, 2009).

Přibližně 40 typů HPV infikuje anogenitální trakt (Baseman a Koutsky, 2005). Tyto HPV typy se přenáší sexuálním stykem (pohlavním, orálním i análním). Jedná se o typy infikující primárně děložní čípek, vagínu, vulvu, penis a anus (Gomez a Santos, 2007). Častým klinickým projevem těchto typů jsou vnější anogenitální bradavice, tzv. kondylomata (Conway a Meyers, 2009; zur Hausen, 2009). HPV typy infikující sliznici jsou děleny podle jejich onkogenního potenciálu na vysoce rizikové (high-risk HPVs, HR-HPVs) a nízko rizikové (low-risk HPVs, LR-HPVs) typy. Toto rozlišení bylo Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) v roce 2009 blíže specifikováno a rozděleno do čtyř skupin. Skupina 1 (Group 1), zahrnuje 12 HPV typů: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 59, které byly označeny jako pro člověka karcinogenní. Do Skupiny 2A (Group 2A) patří pouze HPV68, který byl označen za pravděpodobně „probably“ karcinogenní. HPV typu 5, 8, 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 a 97 tvoří Skupinu 2B (Group 2B), pro člověka možná „possibly“ karcinogenních typů. HPV typy 6 a 11, spolu s určitými HPV typy rodů Beta a Gama byly zařazeny do Skupiny 3 (Group 3), které nejsou klasifikovány jako karcinogenní (Shiffman *et al.*, 2009; IARC, 2012; Burd, 2016). Mezi nejčastěji se vyskytující HR-HPV patří HPV16, 18, 31, 33, 52 a 58. Mezi nejčastější LR-HPV patří 6, 11 a 53 (Brianti *et al.*, 2017).

Anogenitální infekce slizničními HPV, patří mezi jednu z nejčastějších sexuálně přenosných nemocí u mužů i žen po celém světě. Během života se infikuje aspoň jedním HPV typem až 80 % sexuálně aktivní populace. Ve většině případů je HPV infekce asymptomatická a v průběhu 6 až 24 měsíců je eliminována imunitním systémem (Pannato *et al.*, 2012; Harari *et al.*, 2014; Groves a Coleman, 2015).

Infekce vysoce rizikovými HPV viry má dva vrcholy prevalence. Prevalence je nejvyšší mezi mladými ženami do 25 let, u kterých je výskyt HPV spojován se začátkem sexuálního života a s nedostatečnou imunitou vůči HPV infekci. V období od 25 do 34 let prevalence značně klesá a to především vlivem reprodukčního věku, ve kterém žena často navštěvuje gynekologa. Druhý vrchol prevalence tvoří, ženy od 35 let do 54 let, které mohou mít perzistující infekci nebo u nich může dojít k reaktivaci latentní formy infekce vlivem

fyziologické a imunologické dysregulace v období menopauzy (Burd, 2016; Wu *et al.*, 2018). Perzistující infekce se objevuje u 10-15 % žen infikovaných HPV viry. Přetrvávající infekce vysoce rizikovými HPV viry představuje riziko vzniku anogenitálních karcinomů (Groves a Coleman, 2015). HPV viry odpovídají za více než 50 % karcinomů pocházejících z infekčních chorob u žen a 5 % u mužů (Tulay a Serakinci, 2016). DNA HR-HPV virů byla nalezena ve více než 99 % případů cervikálního karcinomu, 85 % případů karcinomu análu, a 50 % případů karcinomu penisu, vulvy a vagíny (Mui *et al.*, 2017).

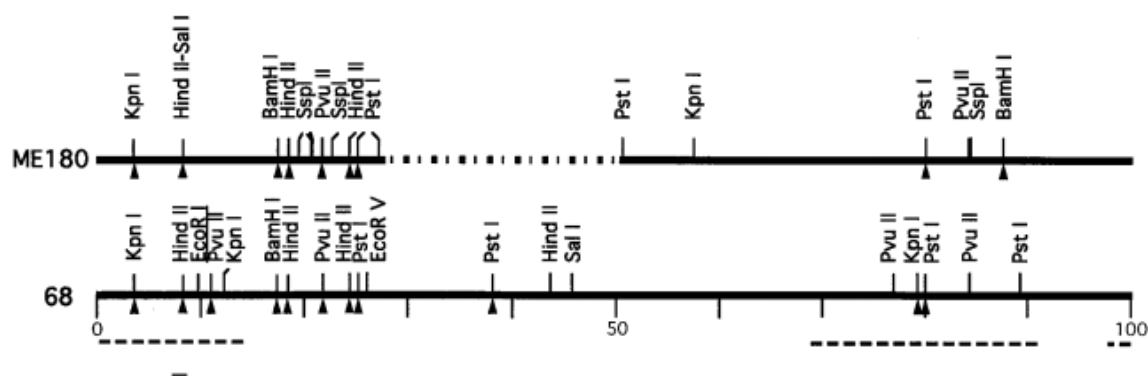
Tab. 1: Lidské papilomaviry a jejich klinické příznaky. Jednotlivé HPV typy jsou seřazeny podle relativního výskytu, tučně zvýrazněné typy jsou nejčastěji asociovány s příslušnými klinickými příznaky (zdroj: Gomez a Santos, 2007).

Klinické příznaky	Typ HPV
Plantární bradavice	1, 2, 4, 63.
Běžné bradavice	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 3, 10, 28.
Ploché bradavice	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76.
Jiné kožní léze (např. epidermoidní cysty, nádory hrtanu)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73.
Epidermodysplasia verruciformis (Lewandowsky – Lutz syndrom)	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50.
Rekurentní respirační papilomatóza	6, 11.
Fokální epiteliální hyperplazie (Heckova choroba)	13, 22.
Papilomy a karcinomy spojivky	6, 11, 16.
Genitální bradavice (condyloma acuminatum)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70.
Nízko rizikové cervikální intraepiteliální neoplazie	6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74.
Vysoce rizikové cervikální intraepiteliální neoplazie	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66.
Cervikální karcinom	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70.
Jiné karcinomy genitálií (vagíny, vulvy, penisu a anu)	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70.

3.1. HPV68

HPV68 bylo poprvé objeveno v podobě parciálního genomu, o velikosti 5993 párů bází, integrovaného do chromozomu nádorové buněčné linie ME180. Neúplnost sekvence znemožnila rozpoznání nového HPV typu, a proto byl tento fragment původně zařazen mezi sekvence příbuzné HPV39 (Reuter *et al.*, 1991). Později byl HPV68 izolován z biopsie

lehké dysplazie cervikální intraepiteliální neoplazie CIN1 (Calleja-Macias *et al.*, 2005). Celý genom HPV68 byl získán po inserci HPV68 do DNA bakteriofágu lambda ZAP II v restričním místě EcoRI, který byl následně klonován v Bluescript II fágomidu. Fyzická mapa HPV68 byla konstruována na základě štěpných míst získaných pomocí 17 restričních endonukleáz (viz Obr. 1) (Longuet *et al.*, 1996).

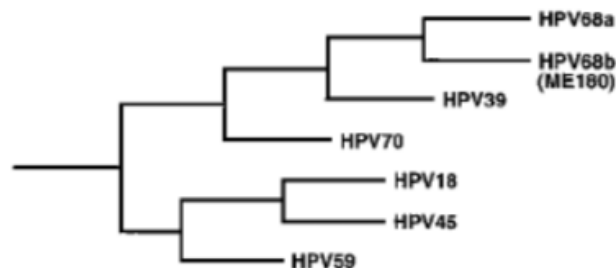


Obr. 1: Restriční mapa DNA sekvencí ME 180 (HPV68b) a HPV68a (zdroj: Longuet *et al.*, 1996, upraveno).

Při porovnání nukleotidových sekvencí HPV68 a ME180, vykazovaly tyto sekvence, z celkově 3168 analyzovaných nukleotidů, 93% identitu a 93 až 94% identitu u čtecích rámců pro E6, E7 a L1. Identita aminokyselinové sekvence se pohybuje od 89 do 95 %, v závislosti na kódovaných proteinech (Longuet *et al.*, 1996).

Jak už bylo zmíněno, v rámci klasifikace HPV, můžeme některé HPV typy dále dělit na subtypy či varianty. HPV subtypy jsou definovány sekvenční variabilitou čtecího rámce L1 v rozmezí 2 až 10 %. Jelikož původní sekvence ME180 a HPV68 vykazovaly 7% sekvenční variabilitu, byly rozděleny na dva subtypy - HPV68a (HPV68Ref(R)) a HPV68b (ME-180) (Longuet *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2013).

Z fylogenetického hlediska patří HPV68 do rodu Alfa 7 papilomavirů. Mezi další genotypy rodu Alfa 7 patří HPV18, 39, 45, 59, 68, 70, 85 a 97 (Burd, 2016). HPV68 je sekvenčně nejbližší příbuzné typům HPV39 a HPV70 (viz Obr. 2). Při aligmentu sekvencí těchto tří typů, byla prokázána 82% nukleotidová identita mezi HPV68 a HPV39 a 81% identita mezi HPV68 a HPV70 (Longuet *et al.*, 1996).



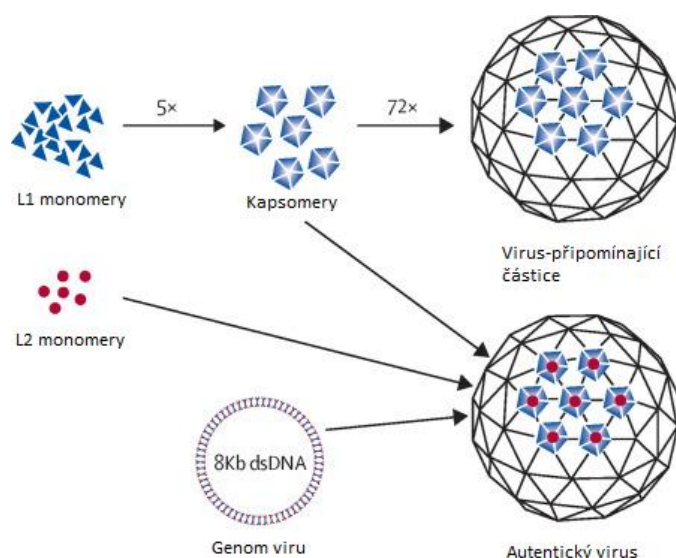
Obr. 2: Fylogenetické vztahy mezi vybranými zástupci HPV patřících do HR-HPV rodu Alfa 7 (zdroj: Longuet *et al.*, 1996).

HPV68 byl z důvodu nedostatku klinických dat roku 2012 WHO klasifikován jako pravděpodobně „probably“ kancerogenní (skupina 2A). Hlavním důvodem této klasifikace byla nízká prevalence HPV68 v cervikálních nádorech (1 %) a nedostatečné důkazy o biologické aktivitě v nádorové tkáni.

Až studie Halec *et al.*, z roku 2014, potvrdila přítomnost infekce pouze genotypem HPV68 (tzv. single-type infekce) v cervikálních nádorech. Tato studie také potvrdila, že HPV68 ovlivňuje stejné buněčné dráhy (popsané v kapitole 3.3. Infekce HPV viry a integrace do lidského genomu) jako další HR-HPV genotypy (Arbyn *et al.*, 2014).

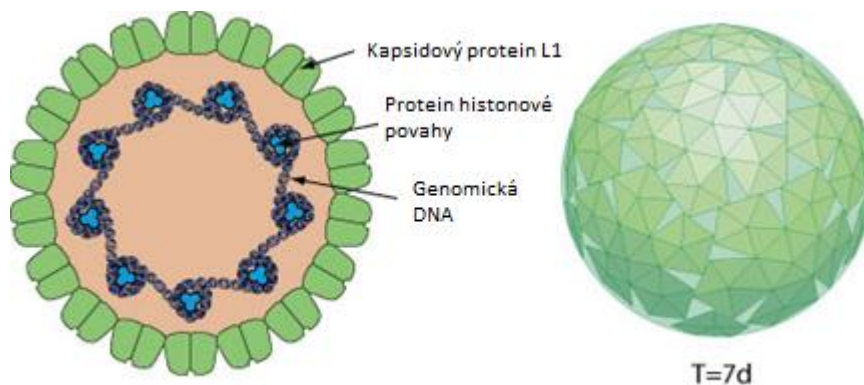
3.2. Struktura viru a jeho genom

HPV viry jsou malé, neobalené viry o průměru 55 - 60 nm, chráněné ikosahedrální kapsidou (Gomez a Santos, 2007; Mui *et al.*, 2017). Kapsida virionu se skládá ze dvou strukturních proteinů - majoritního L1 a minoritního L2. Vnější strana kapsidy se skládá z 360 molekul strukturního proteinu L1, tvořících 72 kapsomer. Každá kapsomera je tvořena pěti monomerními jednotkami proteinu L1 o molekulové hmotnosti 55 kDa (Fernandes a de Medeiros Fernandes, 2012; Mui *et al.*, 2017). Jednotlivé kapsomery jsou navzájem propojeny disulfidickou vazbou (Doorbar *et al.*, 2015). Minoritní kapsidový protein L2 o molekulové hmotnosti 75 kDa, tvoří vnitřní část kapsidy. Ve virionu se protein L2 nachází ve variabilním počtu, obvykle ve dvanácti kopiích. Při vytváření kapsidy se kapsomery, tvořené strukturním proteinem L1, spojí s kopiemi L2, nacházejícími se v jejich středu. N-terminus proteinu L2 zasahuje až na povrch kapsidy (viz Obr. 3) (Burd, 2003; Doorbar, 2006; Gomez a Santos, 2007; Conway a Meyers, 2009; Mui *et al.*, 2017).



Obr. 3: Struktura virové kapsidy (zdroj: Schiller a Müller, 2015, upraveno).

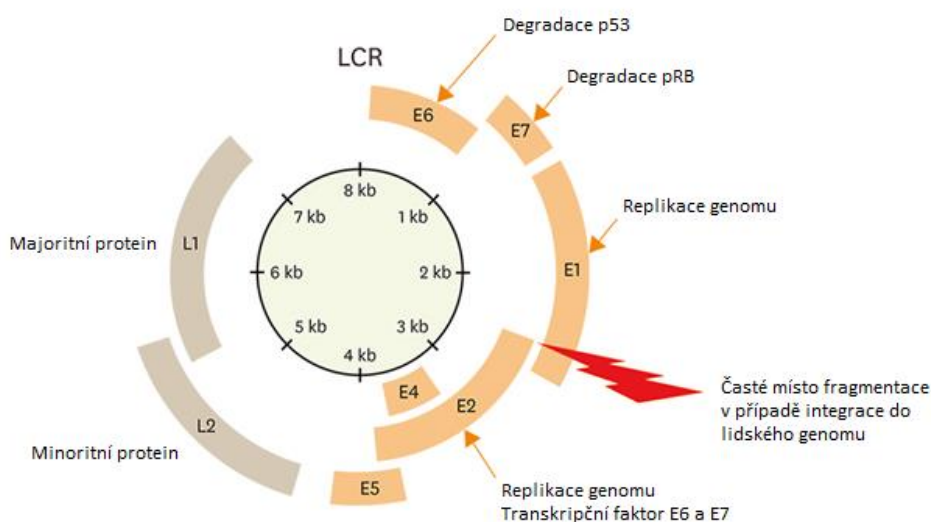
Uvnitř kapsidy je uložen HPV genom tvořený jednou dvouvláknovou, kruhovou molekulou DNA asociovanou s proteiny histonové povahy (viz Obr. 4). Genom o velikosti přibližně 8000 párů bází obsahuje v průměru 8 otevřených čtečích rámců, které jsou transkribovány z jednoho vlákna DNA do polycystronické mRNA (Williams *et al.*, 2011; Doorbar *et al.*, 2015; Mui *et al.*, 2017).



Obr. 4: Struktura HPV viru (zdroj: https://viralzone.expasy.org/5?outline=all_by_species, stáhnuto 6. 3. 2018, upraveno).

Z funkčního hlediska je genom HPV virů rozdělen na 3 oblasti. Prvními dvěma oblastmi, které tvoří kódující oblast genomu, jsou časná oblast E (early region), a pozdní oblast L (late region). Časná oblast, tvořící přes 50 % genomu, obsahuje geny *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7*, které tvoří nestrukturní produkty, účastníci se replikace viru, regulace genové exprese a u vysoce rizikových HPV typů i případné onkogeneze (viz Tab. 2) (Burd, 2003;

Gao a Smith, 2016; Burd, 2016). Pozdní oblast zaujímá necelých 40 % genomu a obsahuje dva pozdní geny *L1* a *L2*, které kódují majoritní a minoritní strukturní kapsidové proteiny (Conway a Meyers, 2009; Gao a Smith, 2016). Třetí oblastí je nekódující dlouhá kontrolní oblast LCR (long control region), známá také jako URR (upstream regulatory region), která se nachází mezi geny *L1* a *E6* a tvoří přibližně 10 % genomu (viz Obr. 5) (Harari *et al.*, 2014; Burd, 2016). Nekódující oblast je důležitá pro regulaci exprese všech HPV genů, obsahuje replikační počátek, oblasti promotoru a oblasti regulující transkripci (Williams *et al.*, 2011; Mui *et al.*, 2017).



Obr. 5: Struktura genomu HPV viru (zdroj: Lee *et al.*, 2016, upraveno).

Tab. 2: Funkce jednotlivých HPV proteinů (zdroj: Burd, 2016; Tulay a Serakinci, 2016).

Proteiny časných genů	E1	účastní se virální DNA replikace, disponuje helikázovou aktivitou
	E2	reguluje replikaci a transkripci viru
	E4	napomáhá uvolnění infekčních virionů z buňky
	E5	způsobuje nadměrnou expresi růstových faktorů v buňce, inhibuje apoptózu
	E6	inaktivuje tumor supresorový protein p53 ubikvitinací, navozuje jeho degradaci
	E7	inaktivuje tumor supresorový protein pRb, navozuje buněčnou proliferaci
	Proteiny pozdních genů	L1
L2		tvoří minoritní strukturní protein kapsidy

3.3. Infekce HPV viry a jejich integrace do lidského genomu

HPV viry infikující cervikální epitel, způsobují infekci bazálních buněk cervikálního epitelu. Virus proniká do bazálních buněk prostřednictvím drobného poranění epitelu, které vede k jejich obnažení nebo proniká v oblasti squamokolumnární junctce transformační zóny, tzv. squamo-columnar junction - SCJ (Longworth a Laimins, 2004; Gomez a Santos, 2007; Cardoso a Calonje, 2011; Groves a Coleman, 2015). Oblast squamokolumnární junctce transformační zóny je náchylná k infekci a případné maligní transformaci, jelikož obsahuje dělicí se rezervní epitelové a kmenové buňky, které HPV viry při infekci využívají pro svou genovou expresi (Groves a Coleman, 2015).

Na počátku infekce, po vstupu HPV do bazálních buněk, se virus v buňce amplifikuje pouze v nízkém počtu kopií (přibližně 100 až 200 kopií/buňku) a zůstává v bazálních buňkách extrachromozomálně, v tzv. epizomální formě (Groves a Coleman, 2015; Doorbar, 2016). Na amplifikaci se podílí časné virální proteiny E1 a E2, které vytvářejí komplex a jsou spolu s replikačním aparátem zodpovědné za replikaci viru (IARC, 2007). Protein E1 má helikázovou aktivitu, která umožňuje separaci vláken virové DNA před postupujícím replikačním komplexem. Protein E2 napomáhá vazbě E1 do místa počátku replikace, zároveň funguje jako transkripční faktor časného promotoru (Longworth a Laimins, 2004; Groves a Coleman, 2015). Vazebné místa pro E2 sousedí s vazebnými místy pro transkripční faktory. Při vyšším množství E2 dochází k represi transkripce vlivem blokování transkripčních faktorů. Schopnost E2 aktivovat nebo potlačovat expresi, tak napomáhá kontrole množství virálních kopií v nediferenciovaných buňkách (Longworth a Laimins, 2004).

Na počátku infekce také dochází k expresi proteinů E6 a E7. Hlavním rozdílem mezi vysoce rizikovými a nízko rizikovými HPV typy, je ve funkci těchto proteinů. U vysoce rizikových HPV typů působí E6 a E7 jako onkoproteiny. E6 protein se váže na tumor supresorový protein p53, který za normálních podmínek chrání genom buňky, umožňuje buňce opravu poškozené DNA a navozuje apoptózu. E6 po vazbě na p53 stimuluje jeho degradaci pomocí ubiquitinizace. Protein E7 se váže na pRb tumor supresorový protein (Gao a Smith, 2016). V neinfikovaných buňkách pRb zabraňuje replikaci poškozené DNA, reguluje buněčný cyklus a díky vazbě E2F působí jako růstový supresor. Vazba E7 na pRb, narušuje komplex mezi pRb a buněčným transkripčním faktorem E2F-1. Po navázání E7 na pRb, dojde k uvolnění E2F-1, což umožní transkripci genů potřebných pro vstup buňky do S fáze buněčného cyklu. Výsledkem je stimulace syntézy buněčné DNA a buněčné

proliferace. E6 a E7 proteiny u nízko rizikových HPV typů se váží na příslušné tumor supresorové proteiny se sníženou afinitou (Gomez a Santos, 2007).

V důsledku HPV infekce dochází ke stimulaci proliferace infikovaných buněk bazálního epitelu a přenosu virálního genomu do dceřiných buněk, které z bazální vrstvy migrují směrem k povrchu epitelu (McBride a Warburton, 2017). V neinfikovaných buňkách končí buněčný cyklus po opuštění bazální vrstvy, což má často za následek ztrátu jader v suprabazální vrstvě. Když infikované buňky opouští bazální vrstvu, pořád u nich probíhá aktivní buněčný cyklus vlivem E7 proteinu. Diferenciované buňky znovu vcházejí do S fáze a aktivují expresi buněčných replikačních faktorů nezbytných pro virální replikaci. Přítomnost E7 vede k zachování buněčného jádra ve všech vrstvách infikovaného epitelu (Longworth a Laimins, 2004).

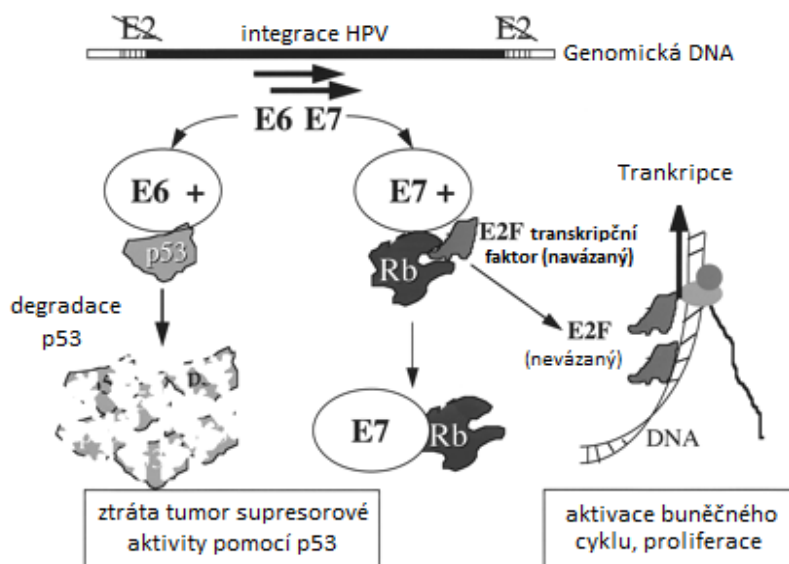
Během životního cyklu viru se na jeho amplifikaci podílí i protein E5. E5 stabilizuje receptor epidermálního růstového faktoru (EGF) a zesiluje aktivitu mitogen aktivované proteinové kinázy (MAP), která fosforyluje vazebné místo a exportní signály u proteinu E1, nezbytného pro amplifikaci viru (Egawa *et al.*, 2015).

Ve vrchních vrstvách epitelu dochází k zabalení virových částic do kapsid, tvořených majoritním proteinem L1 a minoritním proteinem L2. K maturaci viru dochází v supraficiálních keratinocytech, ve kterých mitochondrie ztratily funkci oxidativní fosforylace, což vede místo redukce k oxidaci buněčného prostředí. Takovéto prostředí je vhodné pro tvorbu disulfidických vazeb mezi kapsomerami, a pomáhá tak k lepší sestavě virových částic (Doorbar *et al.*, 2015). V buňce se také kumuluje protein E4, který je důležitý pro vypuštění viru z buňky a jeho přenos. U HR-HPV typů E4 vytváří amyloidní fibrily, které narušují keratinovou strukturu buněk epitelu, a tím napomáhají vypuštění viru (Egawa *et al.*, 2015).

Infekce HPV viry sice způsobuje nesmrtelnost bazálních buněk a jejich dělení, ale pouhou infekcí nedochází ve většině případů k maligní transformaci (Gao a Smith, 2016). Pro to, aby došlo k neoplastickým změnám cervixu, musí vysoká exprese virálních onkogenů v epitelu přetrvávat (Williams *et al.*, 2011). Ve většině případů je vysoká exprese virálních onkogenů spojována s integrací HPV DNA do lidského genomu.

V benigních lézích, způsobených HPV infekcí, se virová DNA v jádru hostitelské buňky nachází v epizomální formě. Naopak u maligních lézí, je HPV DNA většinou integrovaná do genomu hostitelské buňky (Leto *et al.*, 2011). V důsledku integrace virové DNA dochází k její fragmentaci (Gao a Smith, 2016). K fragmentaci virové DNA dochází

zejména v genech pro E1, E2 nebo pro kapsidové proteiny L1 a L2. Nejčastěji dochází k fragmentaci v oblasti genu *E2*. Jednou z funkcí E2 proteinu je regulace transkripce *E6* a *E7* genů. Při narušení funkce E2 proteinu dochází k nadměrné, neregulované expresi *E6* a *E7* genů, které mohou vést k buněčné transformaci (viz Obr. 6) (Gao a Smith, 2016).



Obr. 6: Vliv nadměrné exprese produktů genů *E6* a *E7*, při integraci HR-HPV viru, na regulaci buněčného cyklu (zdroj: El Mzibri *et al.*, 2012, upraveno).

Pro integraci HPV do lidského genomu jsou důležité nejen změny v genomu viru, ale i infikované buňky. HPV DNA se integruje do lidského genomu ve fragilních místech (tzv. fragile sites), která se vyznačují častými delecemi a chromozomovými přestavbami (Groves a Coleman, 2015; Burd, 2016). Integrací viru do těchto oblastí může dojít k ovlivnění exprese okolních genů, a tím ke zvýšení rizika vzniku cervikálního karcinomu (Yu *et al.*, 2005). Na vzniku karcinomu se mohou podílet také dlouhodobé záněty, vyvolávající tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) poškozující DNA, do které se virus integruje (Williams *et al.*, 2011). Až 92 % HPV18, 83 % HPV45, 57 % HPV16, 37 % HPV33 a 14 % HPV31 pozitivních cervikálních karcinomů je spojených s integrací viru do genomu (Li *et al.*, 2011; Groves a Coleman, 2015).

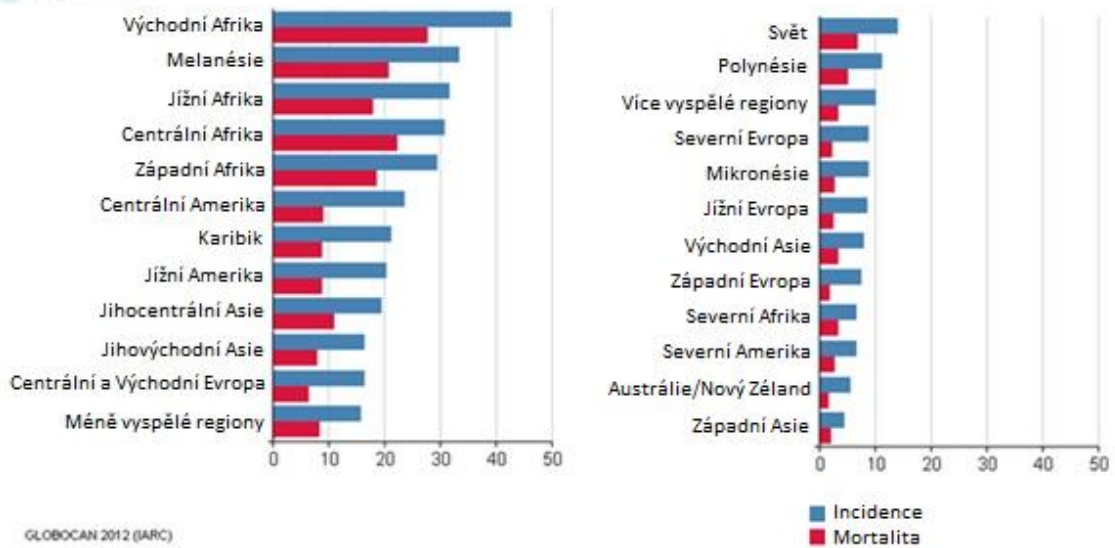
4. Cervikální karcinom

Spojitost mezi HR-HPV a cervikálním karcinomem (CC) byla poprvé odhalena na začátku osmdesátých let dvacátého století německým virologem Haroldem zur Hausenem. Od té doby byl vliv HR-HPV infekce na vznik CC důkladně prozkoumán. V roce 1996 byla infekce HR-HPV detekována u 99,7 % případů CC na celém světě. Vzhledem k tak vysoké prevalenci, byla infekce HR-HPV uznána jako důležitý faktor pro vznik cervikálního karcinomu (Walboomers *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2011).

Nejčastějšími typy CC jsou cervikální karcinom dlaždicových buněk (69 % případů) a adenokarcinom, který vzniká v cylindrickém (sloupcovém) epitelu (25 % případů) (Sellors a Sankaranarayanan, 2003; Mui *et al.*, 2017). Ostatní karcinomy cervixu (adenomy, leiomyomy, leiomyosarkomy a smíšené mezodermální karcinomy) jsou velmi vzácné. Dříve se CC dlaždicových buněk a adenokarcinom vyskytoval v poměru 9:1, incidence adenokarcinomu však celosvětově přibývá. Na nárustu počtu případů adenokarcinomu se z největší pravděpodobností podílí nejen zvýšení frekvence jeho výskytu, ale zároveň snížení počtu případů CC dlaždicových buněk vlivem včasné detekce pomocí screeningových metod (Roztočil *et al.*, 2011). Na rozdíl od CC dlaždicových buněk, u adenokarcinomu spojitost infekce HR-HPV s tímto onemocněním klesá se zvyšujícím se věkem pacientky. HPV infekce je detekována v 89 % případů adenokarcinomu u žen mladších 40 let, ale jen ve 43 % cervikálních adenokarcinomů u žen starších 60 let (Burd, 2003; Longworth a Laimins, 2004; Gomez a Santos, 2007).

Cervikální karcinom je ve světě čtvrtým nejčastějším karcinomem u žen. Osmdesát pět procent všech cervikálních karcinomů je diagnostikováno v rozvojových zemích. Incidence CC je v rozvojových zemích (17,8 %) téměř dvojnásobná, než ve vyspělých zemích (9,0 %) (Harari *et al.*, 2014). Každý rok je ve světě nově diagnostikováno 528 tisíc případů cervikálního karcinomu a přibližně 266 tisíc žen na toto onemocnění ročně zemře (viz Obr. 7) (Groves a Coleman, 2015).

V České republice se incidence CC pohybuje již několik let okolo 20/100 000 žen. Každoročně je v České republice diagnostikováno přibližně 1000 nových případů cervikálního karcinomu a zhruba 400 žen na toho onemocnění zemře (Roztočil *et al.*, 2011).



Obr. 7: Světová incidence a mortalita cervikálního karcinomu v roce 2012 (počet onemocnění na 100 000 žen) (zdroj: IARC GLOBOCAN, 2012, upraveno).

Se vznikem CC je asociováno více než 15 typů HPV. U 70 % případů invazivních cervikálních karcinomů jsou detekovány HPV16 a 18, u další 20 % je prokázána přítomnost HPV31, 33, 35, 45, 52 a 58 (Jaisamrarn *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2018). HPV16 se nachází v 59,3 % CC dlaždicových buněk a 36,3 % adinokarcinomů. HPV18 se častěji nachází v adenokarcinomech (36,8 % případů) než v CC dlaždicových buněk (13,2 % případů) (Mui *et al.*, 2017).

Infekce HR-HPV je sice nezbytná, ale zároveň nedostatečná příčina vzniku cervikálního karcinomu (Schiffman *et al.*, 2011). Mezi faktory přispívající ke vzniku cervikálního karcinomu patří časný začátek sexuálního života, vysoký počet sexuálních partnerů v průběhu života, současná infekce jinou sexuálně přenosnou chorobou, infekce HIV, vysoký počet porodů či potratů (opakované lacerace či chronické zánětlivé změny v oblasti junkce), dědičnost, dlouhodobé používání orálních kontraceptiv a kouření. Vliv na prevalenci má i nízký socioekonomický status (Longworth a Laimins, 2004; Fernandes a de Medeiros Fernandes, 2012; Mui *et al.*, 2017).

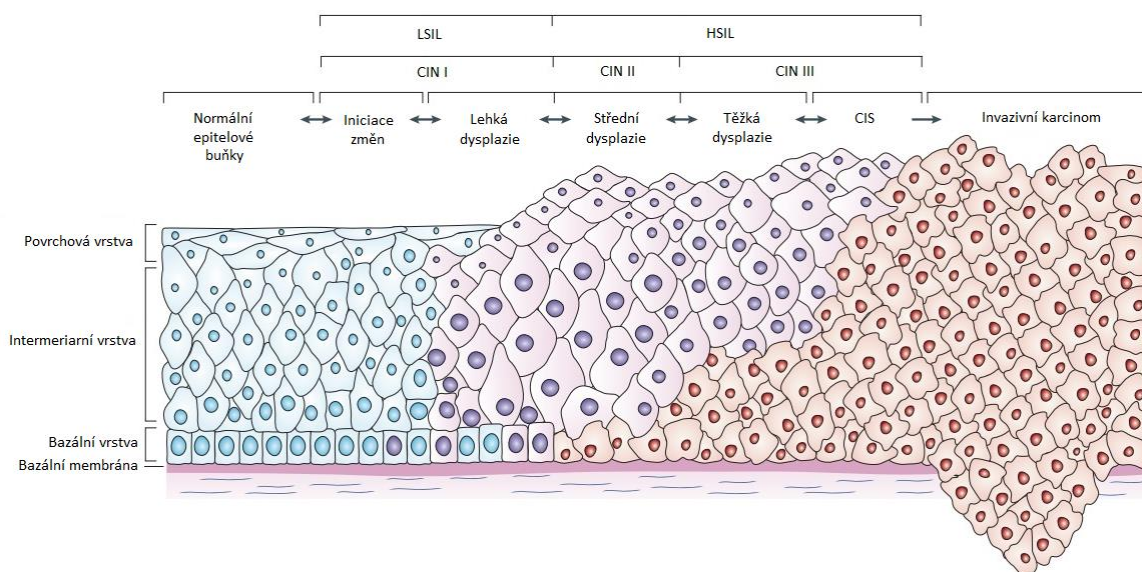
4.1. Cervikální léze

Pouze 10 - 15 % infekcí HR-HPV viry tvoří perzistentní infekce. Tyto infekce zvyšují pravděpodobnost vzniku cervikálního karcinomu. Vzniku invazivních cervikálních karcinomů předcházejí dlouhodobě přetrvávající prekancerózní léze. Progrese prekancerózních lézí do invazivního karcinomu může trvat i více než 10 let (Grce *et al.*, 2012; Vink *et al.*, 2013).

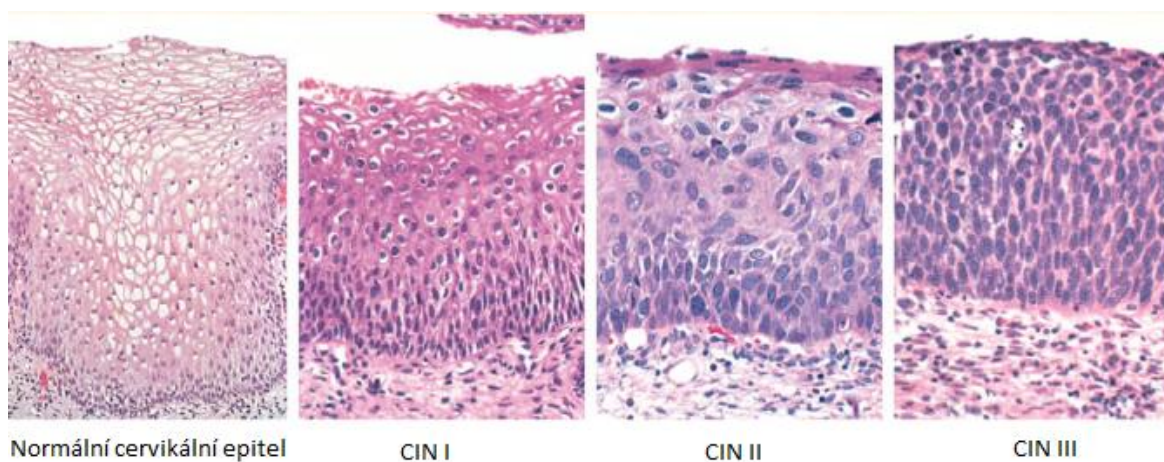
V roce 1968 byl zaveden hodnotící systém pro histologické vyšetření cervikálních lézí a s ním termín cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN). Cervikální intraepiteliální neoplazie jsou premaligní transformace, vyznačující se abnormálním růstem (dysplazií) dlaždicových buněk cervixu. Prekancerózní změny cervixu jsou charakterizované zvýšenou mitotickou aktivitou buněk, atypickými cytologickými znaky buněk (změnou velikosti, tvaru a charakteristických znaků jádra) a jejich abnormálním uspořádáním (Sellors a Sankaranarayanan, 2003; Denny, 2009; Voltaggio *et al.*, 2016). CIN se dělí se do tří kategorií – CIN1, CIN2 a CIN3 (Kumar *et al.*, 2007). CIN1 odpovídá lehké dysplazii s atypickými změnami v dolní třetině epitelu. CIN2 se shoduje se středně těžkou dysplazií a se změnami dosahujícími dvou třetin epitelu a CIN3 odpovídá těžké dysplazii nebo karcinomu *in situ* (viz Obr. 9). CIN3 a karcinom *in situ* (CIS) se vyznačují ztrátou vrstev, aneuploidií jader, atypickými mitózami a nediferencovaným epitelem v celé šíři, bez toho aniž by došlo k porušení bazální membrány (Mishra *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Adekunle, 2012)

V roce 1991 byl zaveden hodnotící systém pro cytologické vyšetření cervikálních stěrů, tzv. systém Bethesda (TBS). Systém Bethesda používá dichotomický (dvoustupňový) dělicí systém, skládající se z dlaždicových intraepiteliálních lézí nízkého stupně (low-grade squamous intraepithelial lesion - LSIL) a dlaždicových intraepiteliálních lézí vysokého stupně (high-grade squamous intraepithelial lesion - HSIL). TBS systém spojuje ploché kondylomata a lehké cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN1) společně do kategorie LSIL, mezitím co HSIL zahrnuje více rozvinuté CIN, jako jsou CIN2 a CIN3/CIS (viz Obr. 8). Bethesda systém byl reevalován a upraven v roce 2001 (Altobelli *et al.*, 2015).

U lehké dysplazie a cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN1) dochází často ke spontánní regresi (60 % případů). Přibližně u 10-16 % CIN1 dochází k progresi na CIN3. U CIN2 a CIN3 dochází ke spontánní regresi pouze u 38 - 40 % a u 12 - 36 % dochází k progresi v CC (Marshall, 2003; Grce *et al.*, 2012; Vargas-Hernandes *et al.*, 2015; Motamedi *et al.*, 2015).



Obr. 8: Schéma vzniku prekarcerózních a karcerózních změn cervikálního epitelu a jejich rozdělení podle jednotlivých hodnotících systémů (Kelloff a Sigman 2007, upraveno).



Obr. 9: Porovnání cervikálního epitelu bez atypie spolu s CIN1 (atypické změny v dolní třetině epitelu), CIN2 (změny ve dvou třetinách epitelu) a CIN3 (atypie v celé šíři epitelu), barvení buněk hematoxylinem a eosinem (HE) (zdroj: Kumar *et al.*, 2009, upraveno)

4.2. Prevence

Prevence vzniku cervikálního karcinomu se dělí na primární (zamezení vzniku infekce) a sekundární (včasný záchyt nemoci a její léčba) (Scarinci *et al.*, 2010). Mezi primární prevenci patří zejména očkování proti HPV virům, ale také bezpečný sex či úplná sexuální abstinence (Shepherd *et al.*, 2000).

4.2.1. Vakcinace

HPV vakcíny, byly v Evropě zavedeny v roce 2007. Vakcíny jsou určeny pro dívky a chlapce ve věku 9 - 26 let a jsou aplikovány většinou kolem 11 až 12 roku, před zahájením pohlavního života. V současné době jsou na trhu tři vakcíny – Cervarix, Silgard (Gardasil) a Gardasil9 (Markowitz *et al.*, 2014; Mui *et al.*, 2017).

Vakcína Cervarix je bivaletní vakcína, působící preventivně pouze proti HPV typům 16 a 18. Vakcína je vhodná pro dívky a ženy ve věku 10 až 25 let. Aplikuje se ve třech dávkách. Spolu s vakcínou Silgard jsou na českém trhu od roku 2007 (Dilley *et al.*, 2018).

Vakcína Silgard (ve světě známá pod názvem Gardasil) je čtyřvalentní vakcína, která slouží jako prevence proti HPV6, 11, 16 a 18. Vakcína chrání proti dysplazii děložního hrdla a zevního genitálu, ale slouží také jako prevence vzniku anogenitálních bradavic (špičatých kondylomat), nejčastěji způsobovaných HPV6 a 11. Očkování je vhodné pro dívky a chlapce ve věku 9 až 15 let a pro ženy od 16 do 26 let. Vakcína se aplikuje ve třech dávkách v průběhu jednoho roku (Achapong *et al.*, 2018).

Gardasil 9 je na českém trhu od roku 2016. Jedná se o jedinou vakcínu, působící preventivně proti devíti HPV typům (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58). Vakcinace je vhodná pro dívky a chlapce ve věku 11 a 12 let. U dívek je Gardasil 9 určen k ochraně před cervikálním karcinomem, karcinomem vulvy, vagíny, análu a anogenitálními bradavicemi. U chlapců je vakcína vhodná pro ochranu před karcinomem análu a anogenitálními bradavicemi. Gardasil 9 se aplikuje ve dvou dávkách (vakcinace před 15 rokem) či třech dávkách (vakcinace po 15 roku věku) (Fardows *et al.*, 2016).

Vakcína Cervarix chrání před HPV16 a 18 představuje 70% ochranu před vznikem CC. Vakcína Silgard (Gardasil) navíc poskytuje ochranu před HPV6 a 11, které způsobují až 90 % anogenitálních bradavic. Devítivalentní Gardasil9 představuje největší potenciál při prevenci HPV infekce, jelikož oproti bivalentní vakcíně Cervarix a čtyřvalentní vakcíně Silgard (Gardasil), obsahuje L1 kapsidové proteiny dalších pěti typů HPV, které způsobují 10 % HPV asociovaných anogenitálních invazivních karcinomů (14 % u žen a 4 % u mužů), 15 % případů CC a 25 % případů CIN2 (Mui *et al.*, 2017).

Všechny vakcíny obsahují syntetické rekombinantní proteiny L1 (majoritní kapsidový protein), které jsou samovolně složeny do ikosaherdální virus-připomínající částice (virus-like particles – VLPs). Tyto částice bez virového genomu nejsou schopny vyvolat HPV infekci, jsou však vysoce imunogenní a stimulují tvorbu neutralizujících protilátek, tvořených B-lymfocyty. Mezi nevýhody vakcín založených na L1 proteinu patří produkce pouze HPV-typ specifické imunitní reakce. Vakcíny založené na minoritním kapsidovém proteinu L2 by mohly pokrýt širší škálu HPV typů, díky homologii, která se u L2 vyskytuje napříč HPV typy. Vakcíny obsahující L1/L2 a samotné L2 jsou zatím testovány na zvířecích modelech (IARC, 2007; Petry, 2014; Dochez *et al.*, 2014).

4.3. Screening a HPV detekce

Diagnostiku HPV infekcí je možné provádět pomocí přímých a nepřímých metod. Mezi nepřímé diagnostické metody patří cytologické, kolposkopické, histologické a sérologické vyšetření. Tyto metody zakládají potvrzení přítomnosti HPV infekce na průkazu charakteristických změn postižených tkání či buněk. Přímá diagnostika je založena na průkazu přítomnosti HPV částic nebo HPV DNA v postižených buňkách.

V současné době stále převládají cytologická vyšetření jako základní screeningová metoda. K vyšetření se používá Papanicolaou (Pap) test, pomocí kterého se hodnotí kvalita buněk, získaných stěrem ze zevní části děložního čípku (exocervixu) a z vnitřního kanálu děložního hrdla (endocervixu). Získané buňky jsou rozetřeny na podložní sklíčko, fixovány alkoholem a poté barveny. Nálezy jsou hodnoceny pomocí Bethesda hodnotícího systému (viz kapitola 4.1. Cervikální léze). V případě abnormálního nálezu je pacientka dále pozorována nebo poslána na kolposkopii (Burd, 2003; Mishra *et al.*, 2011).

Při kolposkopickém vyšetření se pomocí binokulárního kolposkopu pozoruje zvětšeně děložní hrdlo, pochva a zevní rodidla. Rozlišujeme základní kolposkopii, při které je vyšetřovaná oblast pozorována bez podání roztoku. Při rozšířené kolposkopii je na pozorované místo nanesen nejčastěji 5% roztok kyseliny octové, která zvýrazňuje případné změny. V případě kolposkopického nálezu pacientka poté podstupuje biopsii (Manisha *et al.*, 2017).

Cytologická vyšetření mají řadu nevýhod. Hlavní nevýhodou je potřeba odebrání vysoce kvalitního vzorku. Morfologické změny, které jsou ve vzorku hodnoceny, jsou subjektivně hodnoceny cytologem a v rámci zpracování vzorku může dojít k chybě u některého z opakujících se úkonů (Cuzick *et al.*, 2006).

V současné době vykazují screeningové metody založené na přímém průkazu přítomnosti HPV vyšší efektivitu než cytologická vyšetření (Arbyn *et al.*, 2015). V porovnání s cytologickým vyšetřením, prokazují molekulární metody při detekci CIN2 a CIN3 větší senzitivitu a reproduktibilitu (Isidean a Franco, 2014; Lorenzi *et al.*, 2015). Metody založené na přímé detekci HPV ve vzorku, mohou být také využity k detekci přítomnosti HPV DNA u vzorků získaných samoodběrem (Uijterwaal *et al.*, 2014). HPV DNA testování je doporučováno u žen starších 30 let, prozatím však není součástí roční preventivní prohlídky u gynekologa. Vyšetření se dělá pouze u pacientek s cytologickým nálezem (na doporučení gynekologa) nebo na vyžádání pacientkou (samoplátce) (HPVINFORM, 2018).

Jelikož HPV viry není možno množit v tkáňových kulturách, je jejich přesné určení závislé na molekulárně biologických metodách. V současné době jsou dostupné testy založené na hybridizačních metodách studia nukleových kyselin, signál amplifikujících metodách a amplifikačních metodách (Abreu *et al.*, 2012).

Mezi hybridizační metody detekce HPV patří Southernův blotting, *in situ* hybridizace a dot-blot hybridizace. Tyto metody využívají radioaktivně značené sondy pro detekci HPV infekce v cervikálních stěrech. K obecným nevýhodám těchto metod patří nízká senzitivita, nutnost relativně velkého množství purifikované DNA a časová náročnost (Zaravinos *et al.*, 2009; Leto *et al.*, 2011; Abreu *et al.*, 2012).

Mezi signál amplifikující metody patří např. metody Hybrid Capture 2 (Qiagen, Gaithersburg, MD) a Cervista HPV HR Test (Hologic Inc., Madison, WI, USA). Hybrid capture 2 (hc2) je jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci HPV DNA a spočívá v hybridizaci HPV DNA a RNA prób, sloužících k detekci 13 HR-HPV typů (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68) a následné detekci prób na základě chemiluminiscence (Villa a Denny, 2006). Cervista HPV HR Test na rozdíl od Hybrid Capture 2 detekuje navíc HPV66 a k detekci využívá amplifikaci signálu pomocí Invader technologie (Boers *et al.*, 2014).

Metody založené na PCR (polymerázové řetězové reakci) využívají amplifikace HPV DNA a poté detekce přítomnosti konkrétního typu pomocí HPV-typ specifické próby. Primery mohou být navrženy pro konkrétní HPV typ, častěji se ale používají komerční primery zahrnující více HPV typů najednou. V diagnostických screeningových testech se nejčastěji využívají degenerované primery (MY09/11, CPI/II), mismatched primery s určitou mírou nekomplementarity (GP5+/6+) nebo částečně se překrývající primery (PGMY) (Brink *et al.*, 2007). Tyto primery jsou často navrhovány do oblastí genu *L1*,

kteřá je vysoce konzervovaná napřič HPV typy. V současné době existuje nejméne 193 molekulárních detekčních metod, pouze 69 je analyticky nebo klinicky evaluováno. Několik z těchto testů bylo validováno pro Evropský trh pomocí Meijerový kritérií (Burd, 2016). Mezi testy validované pomocí Meijerova protokolu patří i HPV detekční testy Cobas[®] 4800 HPV Test a PapilloCheck[®] HPV-Screening test, jejichž senzitivita a specificita detekce genotypu HPV68 byla předmětem studia této bakalářské práce.

5. Experimentální část

Molekulární metody v současnosti hrají důležitou roli při detekci infekce HPV viry. Hlavními parametry pro úspěšnost detekce HPV infekce je senzitivita a specificita použité metody. Jednou z možných detekčních metod je multiplex real-time PCR, která umožňuje využít v rámci jedné reakce více než jednoho páru primerů, které se váží k různým úsekům templátové DNA, a tím dávají vzniku více různých produktů, které poté analyzujeme (Markoulatos *et al.*, 2002).

Cílem této práce bylo potvrdit přítomnost infekce HPV68 ve vzorcích cervikálních a cervikovaginálních stěrů pomocí navržené multiplex real-time PCR. U těchto vzorků bylo zároveň potřeba objasnit příčinu rozdílnosti výsledků získaných pomocí dalších dvou detekčních systémů: Cobas[®] 4800 HPV Testu (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) a PapilloCheck[®] HPV-Screening testu (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Německo). Cobas[®] 4800 HPV Test je schopný ve vzorku přímo genotypizovat pouze HPV16 a HPV18. Dalších 12 HR-HPV detekuje hromadně, jako tzv. infekci dalšími vysoce rizikovými genotypy, zahrnující i HPV68. Na rozdíl od systému Cobas[®] 4800 HPV Test, je PapilloCheck[®] HPV-Screening test schopen HPV68 genotypizovat ve vzorku přímo (Abreu *et al.*, 2012). Všechny testované vzorky cervikálních a cervikovaginálních stěrů, byly pomocí systému PapilloCheck[®] HPV-Screening vyhodnoceny jako HPV68 pozitivní, zatímco u některých vzorků Cobas[®] 4800 HPV Test nedetekoval infekci dalšími vysoce rizikovými genotypy. Pro ověření správnosti získaných dat, byly oba testy u vzorků s neshodnými výsledky zopakovány, výsledek obou metod byl však stejný.

Jako možné příčiny, způsobující neshody výsledků, získaných pomocí těchto dvou certifikovaných, *in vitro* diagnostických metod (tzv. CE-IVD), byly prověřeny vlivy rozdílného množství virální nálože (VL), formy HPV infekce a subtypu HPV68. V případě nízké virální nálože, mohla být HPV infekce pod detekčním limitem systému Cobas[®] 4800, ale stále nad detekčním limitem systému PapilloCheck[®]. U systému PapilloCheck[®] je pro HPV68 uveden limit detekce 30 kopií/PCR reakci. Cobas[®] 4800 uvádí pro HPV68 limit detekce 450 kopií/ml stabilizačního média PreserveCyt, které je ekvivalentní s použitým médiem cobas[®] PCR Cell Collection Media, Roche (PapilloCheck[®] und PapilloCheck[®] high-risk – Instructions For Use, 2011; Rao *et al.*, 2013).

U některých pacientek mohlo také dojít k integraci HPV do lidského genomu a díky tomu k fragmentaci genů detekovaných některými HPV detekčními metodami. Obě studované CE-IVD metody využívají PCR amplifikace a detekce konkrétního úseku

HPV DNA. Systém PapilloCheck® HPV-Screening test detekuje 350 bp dlouhý úsek genu *E1*, zatímco systém Cobas® 4800 HPV Test detekuje 200 bp fragment genu *L1* (Preisler *et al.*, 2013; Vieira a Almeida, 2013).

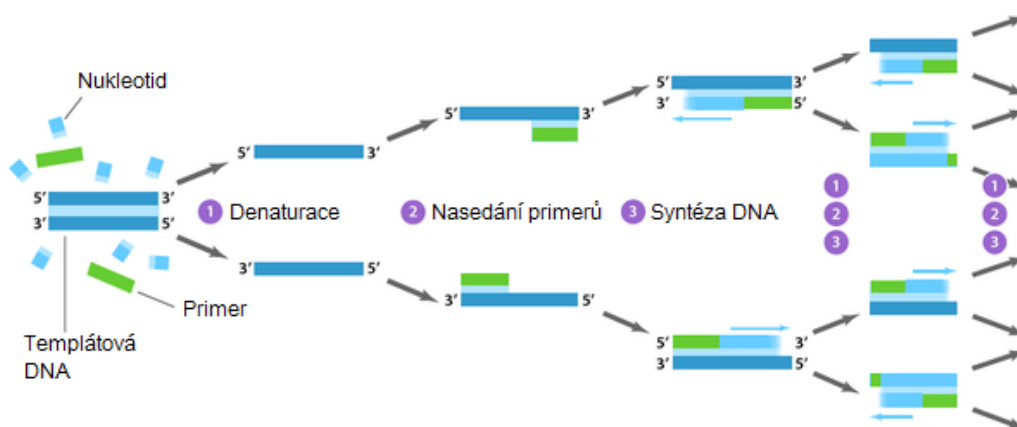
Další možnou příčinou neshody výsledků mohla být rozdílná citlivost daných metod pro subtypy HPV68, HPV68a a HPV68b. Nižší citlivost pro HPV68a, než pro HPV68b, byla popsána např. u PGMY primerů, cílených na *L1* gen, používaných k detekci HPV v řadě CE-IVD detekčních souprav (Estrade a Sahli, 2014).

Pro validaci přítomnosti infekce genotypem HPV68, určení virální nálože a formy HPV infekce, byla navržena kvantitativní multiplex real-time PCR. Cílovými geny pro kvantitativní multiplex real-time PCR, byly oblasti genů *E2* a *E6*, spolu s genem pro GAPDH. Gen pro GAPDH (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) se řadí mezi tzv. housekeepingové geny, které jsou exprimované ve všech lidských buňkách, proto se často využívá při studiu genetické exprese (Barber *et al.*, 2005). Při multiplex real-time PCR sloužil gen pro GAPDH jako interní kontrola amplifikace.

Oblasti genů *E2* a *E6* byly zvoleny kvůli úloze těchto genů při integraci HPV do lidského genomu, studované u prevalentnějších genotypů. V důsledku integrace může docházet k fragmentaci DNA HPV viru, a to nejčastěji v tzv. pantové oblasti (hinge region) genu *E2*, případně v oblasti genu *E1*, *L1* nebo *L2*. Delece těchto oblastí byla pozorována např. u genotypu HPV16, kdy ve studii týmu Arias-Pulido *et al.* z roku 2006 docházelo v rámci integrace k fragmentaci až u 78 % studovaných vzorků. Integrace HPV do genomu představuje zvýšené riziko vzniku cervikálního karcinomu. Při ztrátě funkce genu *E2* dochází k nadměrné expresi genu *E6*. Produkt genu *E6* se u vysoce rizikových HPV typů váže na tumor supresorový protein, který degraduje a tím způsobí deregulaci buněčného cyklu, vedoucí k maligním změnám (IARC, 2007). Genotyp HPV16 se nejčastěji vyskytuje v integrované formě a jeho přítomnost byla potvrzena v 57 % případů CC (Li *et al.*, 2011). Integrace u genotypu HPV68 je vzhledem k jeho nízkému výskytu v CC téměř neprozkoumaná.

Integrace HPV do lidského genomu a její vliv na vznik neoplastických změn cervixu je předmětem mnoha studií. Z tohoto důvodu byl do bakalářské práce zahrnut i vzorek DNA izolované z cervikálního karcinomu, pozitivního na přítomnost HPV68. U všech vzorků bylo pomocí poměru počtu kopií *E2/E6* zjištěno, zda se jedná o epizomální či integrovanou formu infekce, případně o formu smíšenou. Detekce genu *E6*, k jehož fragmentaci dochází v důsledku integrace pouze v minimálním množství, byla dále u vzorků využita ke kvantifikaci virální nálože, definované jako počet kopií genu *E6/ng* DNA.

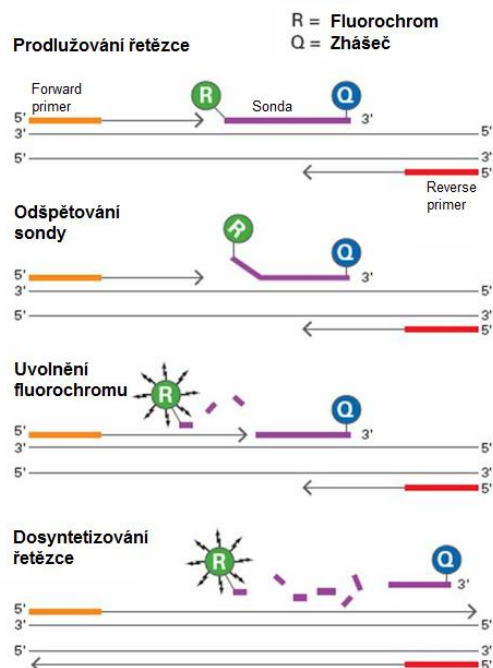
Multiplex real-time PCR se, stejně jako klasická PCR reakce, skládá z 3 opakujících se fází (viz Obr. 10): denaturace, nasedání primerů (annealing) a prodloužení řetězce (elongace). Při denuraci dochází k oddělení dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové, vlivem rozrušení vodíkových můstků, které vlákna spojují. K denuraci dochází při teplotách kolem 90 – 95 °C. Po denuraci se reakční směs s DNA ochladí na 50 – 75 °C. Snížení teploty umožní nasedání primerů, které ohraničují cílové místo amplifikace. Poté, při 72 - 78 °C, dochází k prodloužení primerů působením termostabilní polymerázy ve směru 5' – 3' (viz Obr. 10). Tyto 3 fáze se opakují 20 - 30 krát, což má za následek vznik několika miliónů až miliardy kopií amplifikovaného úseku (Mackay *et al.*, 2002; Arney *et al.*, 2010).



Obr. 10: Schéma průběhu PCR reakce

(zdroj: https://qph.ec.quoracdn.net/main_qimg701d1c1f8a9cf96c8ab15697d3a3d51f, staženo a upraveno: 14. 11. 2017).

Kvantifikace v průběhu real-time PCR probíhá na základě zaznamenání fluorescence generované, buď díky zabudování fluorescenčního substrátu do dvouřetězcového PCR produktu v průběhu reakce, nebo díky využití sekvenčně specifických fluorescenčně značených prób. Při multiplex real-time PCR byly použity duálně značené hydrolyzační TaqMan próby. Tento typ prób na 5' konci nese fluorofor a na 3' konci je navázána molekula zhášeče, která v blízkosti fluoroforu blokuje jeho fluorescenci. Během real-time PCR se próba specificky váže do oblasti PCR produktu mezi forward a reverse primery. Termostabilní *Taq* polymeráza svou exonukleázovou aktivitou navázanou TaqMan próbu rozštěpí, dochází k separaci molekuly fluorochromu od zhášeče, a tím k emisi fluorescence (viz Obr. 11). Se zvyšováním počtu kopií cílového úseku dochází k postupnému zvyšování fluorescenčního signálu, který je softwarově zaznamenáván (LabGuide, 2017).



Obr. 11: Schéma hydrolyzy TaqMan próby. (zdroj: <http://1.bp.blogspot.com/-y2ZyenfQow0/UZpShbDEJQI/AAAAAAAAAB-8/jxO4F5M7e2I/s640/TaqMan+GX+cartoon.jpg>; staženo a upraveno: 14. 11. 2017).

K rozlišení přítomnosti subtypů HPV68a a HPV68b ve zkoumaných vzorcích, byla zvolena touchdown PCR s následnou analýzou křivek tání, tzv. high resolution melting (HRM). Primery pro detekci subtypů byly navrženy do oblasti genu *E6*, která u subtypů vykazovala variabilitu ve 4 bp. Tato oblast byla nejprve amplifikována pomocí touchdown PCR, která se využívá k zvýšení specificity PCR produktů. Zvýšené specificity je docíleno pomocí vyšší hybridizační teploty na počátku amplifikace, která zabrání nespecifickému nasedávání primerů na templátovou DNA. Tento postup vede sice k nižšímu počtu, ale zato vysoce specifických produktů. V dalších cyklech se teplota hybridizace snižuje, dochází tak k častějšímu nasedání primerů, a tedy vzniku dostatečného množství produktů (Korbie a Mattick, 2008). U získaných produktů byla dále provedena analýza křivek tání (HRM), která je založena na denuraci DNA, tedy přeměně dvouvláknové DNA na jednovláknovou, působením postupně se zvyšující teploty. Rozdíly v sekcenci DNA zapříčiňují rozdílné teploty, při kterých molekuly DNA denaturují. Postupnou přeměnou dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové, se uvolňuje fluorescenční barvivo, jehož intenzita je zaznamenána přístrojem s fluorescenčním detektorem. Výsledkem je tzv. křivka tání, která popisuje závislost intenzity fluorescence na teplotě.

5.1. Materiál, pomůcky a přístrojové vybavení

5.1.1. Použité chemikálie

DEPC ošetřená voda (Sigma-Aldrich, USA); Thermo-Start PCR pufr 10x (Thermo Fisher Scientific, USA); MgCl₂ (25 mM, Thermo Fisher Scientific, USA); Thermo-Start *Taq* DNA polymeráza (5 U/μl, Thermo Fisher Scientific, USA); dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM, Promega, USA); EvaGreen[®] 20x ve vodě (Biotium, USA); HotStarTaq[®] Plus Master Mix 2x (QUIAGEN, Nizozemsko); DNA-ExitusPlus[™] (PanReac AppliChem, Německo).

Souprava Qubit[™] dsDNA HS Assay: Molecular probes Qubit[®] dsDNA HS pufr (Life technologies, USA); barvivo Qubit[™] dsDNA HS Reagent 200x koncentrát v DMSO (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA).

Souprava Agilent DNA 1000 Reagents: barvivo - DNA Dye Concentrate, hmotnostní standard - DNA 1000 Ladder, markery - DNA 1000 Markers, gelová matrix - DNA 1000 Gel Matrix, filtry - Spin Filters (Agilent Technologies, Německo).

Primery pro gen *GAPDH* (Generi Biotech, Česká republika); primery pro oblast genů *E2* a *E6* (Generi Biotech, Česká republika); duálně značené TaqMan próby (Generi Biotech, Česká republika) – pro *E2* (FAM-BHQ1), pro *E6* (HEX-BHQ2), pro *GAPDH* (Cy5-BHQ2); primery pro HRM pro gen *E6* HPV68a a HPV68b (Generi Biotech, Česká republika), 600 bp dlouhé syntetické úseky oblasti genu *E6* HPV68a a HPV68b (Invitrogen, USA).

5.1.2. Příprava roztoků

Směs dNTP (10 mM) byla připravena smícháním 10 μl zásobního roztoku (100 mM) jednotlivých deoxynukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) v 60 μl DEPC vody.

5.1.3. Biologický materiál

Plazmid – genomová DNA HPV68 klonována ve vektoru pBScript, klonovací místo EcoRI, pozice 674 bp (Karolinska Institutet, Švédsko); DNA izolovaná z T-lymfoblastické leukémické buněčné linie CEM (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.1.4. Pomůcky

Eppendorf Research Plus pipety a Eppendorf Duafilter PCR clean/sterile dualfilter špičky (Eppendorf, Německo); 1,5 ml mikrozkuhavky (Scientific Specialties, USA); 2 ml mikrozkuhavka (Scientific Specialties, USA); průhledná 96 x 0,1 ml PCR destička (BIOplastic, Nizozemsko); AD-plate bílá 96 x 0,3 ml PCR destička Cobas (Roche

Diagnostics GmbH, Německo); Opti-Seal Optical Disposable Adhesive fólie (BIOplastic, Nizozemsko); 3M™ PA-1 stěrka pro uhlazení fólie (3M, USA); chlazený stojan na PCR destičku; chlazený stojan na mikrozkušavky; stojan na PCR destičku; stojan na mikrozkušavky; EU SFGC 8 x 0,1 ml průhledné PCR stripy (BIOplastic, Nizozemsko); 8 x 0,2 ml telkostěnné průhledné PCR zkumavky (Axygen, USA); zkumavky Qubit™ Assay Tubes pro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA); DNA čip (Agilent Technologies, Německo); stanice pro Agilent čip - Chip Priming Station (Agilent Technologies, Německo); čistič elektrod - Electrode Cleaner (Agilent Technologies, Německo); rukavice SemperCare® (Sempermed, Rakousko)

5.1.5. Přístroje

Laminární boxy: Mars Safety Classe 2 Flow-box (ScanLaf, LaboGene, Dánsko)
HeraSafe KS Flow-box (Thermo Fisher Scientific, USA)

Centrifugy, vortexy: Combi-Spin FVL-2400N centrifuga a vortex (BioSan, Lotyšsko)
Eppendorf Centrifuge 5430 (Eppendorf, Německo)
PV1 vortex-mixer (Grant Instruments, Velká Británie)
Mini Spin Eppendorf centrifuga (Eppendorf, Německo)
VX-200 Lab Vortexer vortex mixer (Labnet International, USA)
GmCLab® minicentrifuga (Gilson, USA)
IKA® MS 3 vortexer (Sigma-Aldrich, USA)
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA)

Fluorometr: Qubit 2.0® (Invitrogen by Life technologies, USA)

Termocyklér: Cobas® z 480 (Roche Diagnostics GmbH, Německo)

Analyzátor čipu: 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Německo)

5.1.6. Software

LightCycler® 480 Software; Agilent 2100 Expert Software; MS Excel

5.2. Vzorčky cervikálních a cervikovaginálních stěrů

Pro analýzu bylo vybráno 43 vzorků DNA izolovaných z 38 cervikálních stěrů, 4 cervikovaginálních stěrů, a 1 cervikálního karcinomu. Cervikální stěry byly odebrány pacientkám při pravidelné gynekologické prohlídce, cervikovaginální stěry byly získány domácím samoodběrem pomocí sady Evalyn® Brush (Rovers Medical Devices,

Nizozemsko) a vzorek cervikálního karcinomu byl poskytnut Bankou biologického materiálu Masarykova onkologického ústavu (Bank of Biological Material at Masaryk Memorial Cancer Institute) v Brně. DNA z cervikálních a cervikovaginálních stěrů byla izolována pomocí automatického izolátoru Cobas[®] x 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo). Genomová DNA z cervikálního karcinomu byla izolována pomocí sady Cobas[®] DNA Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).

U všech vzorků byla pomocí PapilloCheck[®] HPV-Screening testu prokázána přítomnost DNA HPV68.

5.3. Pracovní postup

Tato bakalářská práce byla provedena podle návrhu studie schváleného Etickou Komisí Lékařské fakulty a Zubního lékařství Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci, v souladu s Helsinskou deklarací. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas s využitím jejich biologického materiálu pro výzkumné účely. Při manipulaci se vzorky a reagensy byla, stejně jako při jejich skladování, dodržována pravidla práce v pre-PCR, PCR a post-PCR laboratoři. Příprava reakčních směsí a práce se vzorky probíhaly ve sterilních laminárních boxech určených výhradně pro danou část postupu. Vzorky i veškeré reagensy použité pro přípravu reakčních směsí byly před použitím a po použití uskladněny při -20 °C. Během přípravy reakčních směsí byla použita *Taq* termostabilní polymeráza po celou dobu chlazená v chladícím stojanu. Všechny vzorky, reagensy a reakční směsi, byly před použitím pulzně zvortexovány a stočeny na stolní centrifuze s vortexem.

5.4. Kvantifikace virální nálože a určení formy HPV infekce

5.4.1. Návrh primerů a prób pro multiplex real-time PCR

DNA sekvence obou subtypů HPV68 byly před navržením specifických primerů a prób získány z online sekvenčních databází. DNA sekvence pro subtyp HPV68a byla získána z databáze PaVE – Papilloma virus genome database (https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database/locus_view/fetch?id=HPV68REF&format=Locus%20view&hasStructure=none) a DNA sekvence pro subtyp HPV68b byla získána z databáze GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR751039.1>). Použité primery a próby byly navrženy pomocí programu PrimerQuest Tool (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), který byl

zároveň použit pro kontrolu tvorby sekundárních (vlásečkových) struktur (tzv. hairpins), včetně zjištění teploty tání těchto struktur. Specificita vybraných primerů byla ověřena programem BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Primery a próby byly navrženy do oblasti genů *E2* a *E6*, které se u obou subtypů HPV68 neliší a při amplifikaci metodou PCR vznikají u obou subtypů stejně velké PCR produkty. K detekci PCR produktů byly navrženy sekvenčně specifické TaqMan próby. Próba pro oblast genu *E2* byla značena pomocí fluorochromu FAM a zhášedce BHQ1, próba pro gen *E6* byla značena fluorochromem HEX a zhášedcem BHQ2. K detekci interní kontroly, genu pro GAPDH, byly použity sekvenčně specifické primery a próba značená fluochromem Cy5 a zhášedcem BHQ2. Z důvodu plánovaného patentování tohoto testu není možné sekvence primerů a proub uvést.

5.4.2. Měření koncentrace DNA na přístroji Qubit 2.0®

Koncentrace DNA byla ve vzorcích stanovena fluorometricky, pomocí fluorometru Qubit 2.0®. Nejprve byla provedena kalibrace přístroje dle návodu výrobce. Po kalibraci byla, pomocí sady Qubit dsDNA HS Assay, ve vzorcích změřena koncentrace dsDNA. K 199 μ l čerstvě namíchané barvicí směsi, připravené z fluorescenčního barviva Qubit dsDNA HS Reagent a Qubit dsDNA pufru (ředěno v poměru 1:199), byl přidán 1 μ l vzorku DNA. Po přidání vzorku byla mikrozkušavka zvortexována po dobu 3 sekund a 2 minuty ponechána stát při laboratorní teplotě. Následně byla pomocí přístroje Qubit 2.0® změřena koncentrace dsDNA v ng/ μ l. Tento postup byl proveden pro každý analyzovaný vzorek DNA. Koncentrace DNA byla u každého vzorku měřena ve 3 opakováních. Jejich průměrná hodnota je uvedena v příloze č. 1 - 3.

5.4.3. Testování navržených primerů

Funkčnost primerů navržených pro HPV68 geny *E2* a *E6* byla nejprve testována na třech HPV68 pozitivních vzorcích DNA a plazmidu obsahujícím genom HPV68 (pozitivní kontrola). Detekce přítomnosti HPV68 byla provedena pomocí metody real-time PCR za použití interkalačního barviva EvaGreen®.

Zásobní roztoky obou párů primerů o koncentraci 100 μ M, byly zředěny na koncentraci 2,5 μ M. Pro každý pár primerů byly, k 152 μ l DPEC vody, přidány 4 μ l roztoku forward primeru a 4 μ l roztoku reverse primeru. K otestování primerů určených k detekci *E2* a *E6* genů byly připraveny dvě reakční směsi dle tabulky č. 3.

Tab. 3: Soupis reagensií k přípravě real-time PCR reakčních směsí k ověření funkčnosti primerů navržených do oblasti genů *E2* a *E6* HPV68.

PCR reakční směs	Koncentrace reagensií v PCR reakci	Objem [μl/1 reakce]
Termo-Start PCR pufr (10x)	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
Roztok primerů pro gen <i>E2</i> nebo <i>E6</i> (2,5 μM)	200 nM	2
Thermo-Start <i>Taq</i> polymeráza (5 U/μl)	1 U	0,2
dNTP (10 mM)	200 μM	0,5
EvaGreen (20x)	0,5x	0,625
DPEC H ₂ O		14,175
Vzorek DNA		2
Celkový objem		25

Připravené reakční směsi byly nejdříve zvortexovány a stočeny, a poté rozpipetovány po 23 μl do PCR stripů. Do každé jamky byly poté přidány 2 μl vzorku DNA. Pro oba sety primerů byla, společně se třemi HPV68 pozitivními patientskými vzorky, testována také negativní kontrola (DEPC voda) a pozitivní kontrola (DNA plazmidu s genomem HPV68). V rámci reakce byly kontroly testovány v duplikátu a HPV68 pozitivní vzorky byly testovány v triplicátu. Po zcentrifugování byly PCR stripy vloženy do termocykléru Cobas[®] z 480 a následně byl spuštěn program pro real-time PCR (viz Tab. 4).

Tab. 4: Program real-time PCR k ověření funkčnosti primerů navržených pro geny *E2* a *E6* HPV68.

Real-time PCR program	Telota	Čas	Počet cyklů
Iniciační denaturační krok	95 °C	15 min	1
Denaturace	95 °C	15 s	45
Annealing a elongace	60 °C	60 s	
Chlazení	4 °C	∞	

Po skončení PCR reakce byla velikost PCR produktů ověřena pomocí Agilent čipu. Čip byl připraven podle návodu pro soupravu Agilent DNA 1000. Na připravený čip byl do jednotlivých jamek určených pro vzorky pipetován vždy 1 μl PCR produktu.

Velikost PCR produktů byla ověřena na pozitivní kontrole a jednom z testovaných HPV68 pozitivních patientských vzorků.

5.4.4. Testování prób

Po ověření funkčnosti obou setů primerů, byly objednány navržené próby, které byly následně pomocí multiplex real-time PCR spolu s oběma páry primerů pro geny *E2* i *E6* HPV68, testovány v jedné reakci. Směs primerů a prób byla připravena smícháním 300 μ l DPEC vody a zásobních roztoku primerů a prób: 4 μ l forward a 4 μ l reverse primerů pro gen *E2*, 4 μ l forward a 4 μ l reverse primerů pro gen *E6*, 2 μ l roztoku próby pro *E2* a 2 μ l roztoku próby pro *E6*. Zkumavka se směsí primerů a prób byla zvortexována a stočena. Reakční směs pro multiplex real-time PCR byla připravena podle tabulky č. 5.

Tab. 5: Soupis reagensí pro přípravu multiplex real-time PCR reakční směsi k ověření funkčnosti primerů a prób pro oblasti genů *E2* a *E6* HPV68.

PCR reakční směs	Koncentrace reagensí v PCR reakci	Objem [μ l/1 reakce]
Termo-Start PCR pufr (10x)	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
Roztok primerů a prób pro geny <i>E2</i> a <i>E6</i>	200 nM (primery); 100 nM (próby)	4
Thermo-Start <i>Taq</i> polymeráza (5 U/ μ l)	1 U	0,2
dNTP (10 mM)	200 μ M	0,5
DPEC H ₂ O		12,8
Vzorek DNA		2
Celkový objem		25

PCR reakční směs byla po zvortexování a stočení rozpipetována po 23 μ l do PCR stripů, do kterých byly následně přidány 2 μ l vzorku DNA. Pro testování primerů s próbami byly vybrány stejné HPV68 pozitivní vzorky a kontroly viz 5.4.3. Testování navržených primerů. V rámci reakce byly, stejně jako v předchozí reakci, kontroly testovány v duplikátu a HPV68 pozitivní vzorky byly testovány v triplikátu. Poté byly PCR stripy stočeny a vloženy do termocykléru Cobas[®] z 480 s připraveným programem pro multiplex real-time PCR (viz Tab. 4).

5.4.5. Určení limitu detekce

Pro určení citlivosti metody, tj. nejnižšího možného počtu virových kopií, detekovatelných pomocí multiplex real-time PCR, byly nejprve připraveny kalibrační řady pro gen *GAPDH* a geny *E2* a *E6*. Připravené kalibrační řady byly poté použity ke kvantifikaci virální nálože a určení formy infekce v patientských vzorcích.

Pro přípravu kalibrační řady pro gen *GAPDH*, byla použita DNA z T-lymfoblastické leukémické buněčné linie CEM, izolované pomocí sady MagCore[®] Cultured Cells DNA na přístroji MagCore[®] Automated Nucleic Acid Extractor (RBC Bioscience, Taiwan). Koncentrace DNA izolované z buněčné linie CEM byla změřena na fluorometru Qubit[®] 2.0. Naměřená koncentrace DNA (258 ng/μl) byla použita k výpočtu počtu kopií diploidního lidského genomu obsaženého v 1 μl genomické DNA. Jedna kopie diploidního genomu obsahovala 6,15 pg/μl, ve vzorku DNA z buněčné linie CEM bylo tedy $4,20 \times 10^4$ kopií diploidního genomu/μl. Jelikož se v diploidním genomu nachází gen pro *GAPDH* dvakrát, v 1 μl bylo tedy obsaženo $8,4 \times 10^4$ kopií genu pro *GAPDH*. Ze zásobního vzorku, byl nejprve připraven vzorek o koncentraci 2×10^4 kopií *GAPDH* a následným ředěním DPEC vodou, faktorem 10, byla připravena kalibrační řada s rozpětím 2×10^4 až 2×10^0 .

Pro přípravu kalibrační řady pro geny *E2* a *E6*, byla použita plazmidová DNA obsahující genom HPV68. Koncentrace DNA plasmidu byla rovněž změřena na fluorometru Qubit 2.0. Vzorek plazmidové DNA o koncentraci 101 ng/μl, odpovídal $8,7 \times 10^9$ kopiím plasmidu (10780 pb) v 1 μl. Z tohoto zásobního vzorku plasmidové DNA byl nejprve připraven vzorek o koncentraci 2×10^7 , z něhož byl připraven nevyšší bod kalibrační řady o koncentraci 2×10^5 , a poté byl připraven zbytek kalibrační řady, postupným ředěním DPEC vodou faktorem 10, až po nejnižší bod kalibrační řady 2×10^0 .

Kalibrační řady pro gen *GAPDH* a geny *E2/E6*, byly připraveny ve třech opakováních a každý bod kalibrační řady byl pomocí multiplex real-time PCR testován v duplikátu. Z těchto kalibračních řad byla pro gen *GAPDH* a geny *E2/E6* následně vybrána kalibrační řada s nejlineárnějším průběhem, která byla poté použita pro kvantifikaci počtu kopií *E2*, *E6* a *GAPDH* v patientských vzorcích.

5.4.6. Testování cross-reaktivity navrženého detekčního systému

Specifita navržených primerů a prób pro genotyp HPV68 byla experimentálně ověřena pomocí multiplex real-time PCR, při které bylo testováno 15 patientských vzorků, pozitivních na přítomnost DNA různých HPV genotypů, 5 HPV negativních vzorků a jeden HPV68 pozitivní vzorek (viz Tab. 6). Pomocí real-time PCR byla ověřena možná cross-

reakce navrženého detekčního systému s 6 LR-HPV (HPV6, 11, 40, 42, 43 a 44/55) a 17 HR-HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70, 73 a 82).

Tab. 6: Vzorky použité k vyloučení cross-reakce navrženého detekčního systému pro HPV68 s jinými HPV genotypy.

Číslo vzorku	HPV genotypy detekované pomocí systému PapilloCheck	Číslo vzorku	HPV genotypy detekované pomocí systému PapilloCheck
1	HPV82, 70, 42	10	HPV16, 18, 59, 51, 39
2	HPV58, 51, 40, 44/55	11	HPV58,73, 82
3	HPV39, 73	12	HPV73, 42, 44/55
4	HPV16, 18, 56, 42	13	HPV35, 6
5	HPV16, 31, 51, 70	14	HPV59, 66
6	HPV31,82	15	HPV43, 45, 31
7	HPV31, 51, 11	16-20	HPV negativní
8	HPV51, 53, 70, 42	21	HPV68
9	HPV33, 52, 51		

Pro testování cross-reaktivity byla nejprve připravena směs primerů s próbami pro geny *E2* a *E6* dle postupu uvedeného v 5.4.4. Testování prób. Poté byla připravena směs primerů s próbou pro gen *GAPDH*, smícháním 154 μ l DPEC vody s 2 μ l forward, 2 μ l reverse primerů a 2 μ l próby. Reakční směs byla připravena podle tabulky č. 7.

Tab. 7: Reagencie k přípravě reakční směsi pro multiplex real-time PCR k vyloučení cross-reakce navrženého systému s jinými HPV genotypy.

PCR reakční směs	Koncentrace reagensů v PCR reakci	Objem [μ l/1 reakce]
Termo-Start PCR pufr (10x)	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
Roztok primerů a prób pro geny <i>E2</i> a <i>E6</i>	200 nM (primery); 100 nM (próby)	4
Roztok primerů a prób pro <i>GAPDH</i>	100 nM	2
Thermo-Start <i>Taq</i> polymeráza (5U/ μ l)	1 U	0,2
dNTP (10mM)	200 μ M	0,5
DPEC H ₂ O		10,8
Vzorek DNA		2
Celkový objem		25

Připravená reakční směs byla zvortexována a stočena a poté po 23 μ l rozpipetována do 96 jamkové PCR destičky. Při testování DNA vzorků, byla spolu se vzorky testována také kalibrační řada pro geny *E2* a *E6* HPV68 o rozpětí 2×10^5 až 2×10^0 a kalibrační řada pro gen *GAPDH* s rozpětím 2×10^4 až 2×10^0 . Každý bod kalibrační řady byl testovaný v duplikátu. Každý patientský vzorek DNA byl testován v triplicátu. V rámci každého běhu byly testovány také 2 negativní kontroly (DEPC voda).

Po napipetování vzorků a kalibračních řad byla PCR destička zalepena adhezivní fólií, stočena a přenesená do nastaveného termocykléru Cobas[®] z 480. Vzorky a kalibrační řady byly testovány pomocí multiplex real-time PCR programu uvedeného v tabulce č. 4. Po skončení reakce byla vyhodnocena přítomnost HPV68.

5.4.7. Validace přítomnosti HPV68 v patientských vzorcích

Patientské vzorky DNA získané izolací z cervikálních, cervikovaginálních stěrů a cervikálního karcinomu, určené k validaci přítomnosti infekce HPV68, byly testovány pomocí metody kvantitativní multiplex real-time PCR. Při testování DNA vzorků byl pomocí kalibračních řad určen počet kopií genů *E2* a *E6* a počet kopií genu *GAPDH*, který sloužil jako interní kontrola amplifikace.

Příprava roztoků primerů s próbami, reakční směsi a samotný průběh multiplex real-time PCR probíhal podle postupu uvedeném v kapitole 5.4.6. Testování cross-reakivity navrženého detekčního systému. Po skončení multiplex real-time PCR byla u vzorků vyhodnocena přítomnost infekce HPV68, virální nálož a určena forma infekce. Virální nálož byla spočítána jako počet kopií genu *E6*/ng DNA v 1 μ l vzorku. Forma HPV genomu přítomného ve vzorku byla určena na základě poměru počtu kopií genů *E2/E6* a dělila se na epizomální ($E2/E6 > 0,8$), smíšenou ($0,8 \leq E2/E6 \leq 0,4$) a integrovanou ($E2/E6 \leq 0,4$).

U HPV68 pozitivních vzorků s virální náloží nižší, než bylo možno detekovat pomocí připravené kalibrační řady, byla multiplex PCR zopakována s 5 μ l vzorku/reakci.

5.5. Rozlišení subtypů HPV68 v patientských vzorcích

5.5.1. Návrh primerů pro HRM

Pro návrh primerů pro touchdown PCR s následnou analýzou křivek (HRM) byly použity DNA sekvence obou subtypů HPV68 z databáze GeneBank. Pro subtyp HPV68a byla použita sekvence DQ080079.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ080079>) a pro subtyp HPV68b byla zvolena sekvence FR751039.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR751039.1>). Použitý pár primerů byl navržen Zachary Dwigthem, MBA z Univerzity of Utah, Salt Lake City, USA.

Navržené primery se skládaly ze dvou forward primerů, specifických pro každý subtyp HPV68 a jednoho reverse primeru, společného pro oba subtypy viru. Primery byly navrženy pro oblast genu *E6*, která vykazuje značnou sekvenční variabilitu mezi HPV68a a HPV68b. Zvolená oblast genu *E6* se u subtypů lišila ve 4 bp. Vzniklý PCR produkt byl zároveň u HPV68b o 12 bp kratší než u HPV68a. Rozdíly v teplotě tání mezi zvolenými úseky jednotlivých subtypů, byly ověřeny pomocí online softwaru Umelt (<https://www.dn.a.utah.edu/umelt/um.php>). Teplota tání pro HPV68a byla 73 °C a pro HPV68b 69,3 °C.

5.5.2. Testování primerů

Schopnost navržených primerů pro oblast genu *E6* rozlišit subtypy HPV68a a HPV68b byla testována pomocí touchdown PCR s následnou analýzou křivek (dále pouze HRM), za použití interkalačního barviva EvaGreen®. K tomuto účelu byly firmou Invitrogen nasyntetizovány dva 600 bp dlouhé úseky dsDNA odpovídající oblasti genu *E6* HPV68a a HPV68b. Tyto syntetické úseky sloužily jako pozitivní kontrola, zároveň sloužily k určení citlivosti metody.

K otestování primerů byly, pro oba nasyntetizované úseky, nejprve připraveny kalibrační řady, o rozmezí 2×10^5 až 2×10^0 , postupně ředěné roztokem Tris/EDTA faktorem 10. Připravené kalibrační řady pro úsek HPV68a a HPV68b byly testovány s navrženými specifickými primery pomocí HRM. Zásobní roztoky primerů o koncentraci 100 μ M byly zředěny na koncentraci 12,5 μ M. K 100 μ l DPEC vody byly přidány 20 μ l roztoku forward primeru HPV68a, 20 μ l roztoku forward primeru HPV68b a 20 μ l roztoku reverse primeru. K otestování primerů, sloužících k rozlišení subtypů HPV68 pomocí HRM, byla připravena reakční směs dle tabulky č. 8.

Tab. 8: Reagencie pro přípravu reakční směsi k rozlišení subtypů HPV68 pomocí HRM.

PCR reakční směs	Koncentrace reagensů v PCR reakci	Objem [μ l/1 reakce]
HotStarTaq [®] Plus Master Mix (2x)		14,375
EvaGreen (20x)	0,5x	0,625
Roztok primerů pro gen <i>E6</i>	12,5 μ M	0,29
DPEC H ₂ O		7,7125
Vzorek DNA		2
Celkový objem		25

Připravená reakční směs byla zvortexována, stočena a poté po 23 μ l rozpipetována do 96 jamkové PCR destičky. Kalibrační řady pro oba subtypy byly připraveny ve dvou opakováních a každý bod kalibrační řady byl testován v duplikátu. V rámci běhu byly testovány také 2 negativní kontroly (DEPC voda).

Po napipetování kalibračních řad byla PCR destička zalepena adhezivní fólií, stočena a přenesená do nastaveného termocykléru Cobas[®] z 480. Kalibrační řady byly testovány pomocí HRM programu uvedeného v tabulce č. 9.

Tab. 9: Program HRM pro ověření funkčnosti primerů pro gen *E6*, sloužící k rozlišení subtypů HPV68.

HRM program		Teplota	Čas	Počet cyklů
Iniciační denaturační krok		95 °C	15 min	1
PCR amplifikace	Denaturace	95 °C	10 s	10
	Annealing	66 °C	20 s	
	Elongace	72 °C	20 s	
PCR amplifikace	Denaturace	95 °C	10 s	45
	Annealing	58 °C	20 s	
	Elongace	72 °C	20 s	
Denaturace		95 °C	1 min	1
Snížení teploty před meltingem		95 °C	10 s	1
		60 °C	45 s	
Melting		95 °C	∞	

Po skončení programu byla z těchto kalibračních řad pro každý subtyp vybrána kalibrační řada s nejlineárnějším průběhem, která byla poté použita pro rozlišení subtypu HPV68 v patientských vzorcích.

5.5.3. Testování subtypu HPV68 u patientských vzorků

Patientské vzorky byly testovány spolu s oběma kalibračními řadami pomocí HRM za použití interkalačního barviva EvaGreen[®]. Reakční směs byla připravena a rozpipetována podle kapitoly 5.5.2. Testování primerů. Obě kalibrační řady byly testovány v duplikátu, patientské vzorky byly testovány v triplikátu. V rámci reakce byly testovány také 2 negativní kontroly (DEPC voda). Po napipetování vzorků a kalibračních řad, byla PCR destička zalepena adhezivní fólií, stočena a přenesena do nastaveného termocykléru Cobas[®] z 480. Vzorky a kalibrační řady byly testovány pomocí HRM programu uvedeného v tabulce č. 9. Po skončení programu byla u jednotlivých vzorků vyhodnocena přítomnost konkrétního subtypu HPV68.

Po skončení HRM reakce byla velikost PCR produktů ověřena pomocí Agilent čipu. Čip byl připraven podle návodu pro soupravu Agilent DNA 1000. Na připravený čip byl do jednotlivých jamek určených pro vzorky pipetován vždy 1 μ l PCR produktu. Velikost PCR produktů byla ověřena na pozitivní kontrole a všech testovaných patientských vzorcích.

6. Výsledky

V průběhu experimentální části byla pomocí navržené kvantitativní multiplex real-time PCR validována přítomnost infekce HPV68 ve 43 vzorcích DNA izolovaných z 38 cervikálních stěrů, 4 cervikovaginálních stěrů a 1 vzorku cervikálního karcinomu. Výsledky získané pomocí kvantitativní multiplex real-time PCR byly porovnány s výsledky dvou CE-IVD detekčních metod - Cobas® 4800 HPV Testu a PapilloCheck® HPV-Screening testu. Všechny testované vzorky cervikálních a cervikovaginálních stěrů byly pomocí multiplex real-time PCR i pomocí systému PapilloCheck® HPV-Screening test vyhodnoceny jako HPV68 pozitivní.

U 20/42 vzorků (47,6 %) cervikálních a cervikovaginálních stěrů Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval infekci tzv. dalšími vysoce rizikovými genotypy, zahrnující HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, včetně 68. U zbylých 22/42 vzorků (52,4 %) byla Cobas® 4800 HPV Testem detekována infekce dalšími vysoce rizikovými genotypy, z toho u 13/22 vzorků detekoval systém PapilloCheck® HPV-Screening test genotyp HPV68, případně další HPV genotypy (HPV42, 53, 70, 73, 82), které však nejsou detekovatelné pomocí Cobas® 4800 HPV Testu a u 9/22 vzorků detekoval PapilloCheck® HPV-Screening test kromě HPV68 i přítomnost dalších HPV typů detekovatelných Cobas® 4800 HPV Testem (HPV31, 39, 52, 56, 66). U vzorku cervikálního karcinomu (CC) 1/43 (2,3 %) byla vzhledem ke způsobu izolace DNA, provedena genotypizace pouze pomocí PapilloCheck® HPV-Screening testu.

Pro porovnání schopnosti detekce HPV68 pomocí PapilloCheck® HPV-Screening testu a Cobas® 4800 HPV Testu, byly zahrnuty pouze genotypy detekovatelné Cobas® 4800 HPV Testem v rámci poolu tzv. dalších HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68), které jsou detekovatelné pomocí obou těchto metod. Studované vzorky byly rozděleny do tří skupin (viz Tab. 10). Skupina 1 obsahovala vzorky, u kterých Cobas® 4800 HPV Test detekoval tzv. další HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 (viz Příloha 1). Skupina 2 zahrnovala vzorky, u kterých Cobas® 4800 HPV Test detekoval tzv. další HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval přítomnost HPV68 a dalších genotypů z poolu tzv. dalších HR-HPV (viz Příloha 2). Skupina 3 zahrnovala zbytek vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval tzv. další HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 (viz Příloha 3). Vzorek cervikálního karcinomu (CC) byl hodnocen zvlášť.

Celkově bylo možné detekovat infekci pouze genotypem HPV68 u 34/43 vzorků (79,1 %) a infekci HPV68 s dalšími HR-HPV (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) u 9/43 vzorků (20,9 %).

Tab. 10: Rozdělení vzorků podle výsledků detekce použitých CE-IVD metod.

	Cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV-Screening test	Počet vzorků
Skupina 1	další HR-HPV +	HPV68 +	13
Skupina 2	další HR-HPV +	HPV68 a další z poolu HR-HPV +	9
Skupina 3	další HR-HPV -	HPV68 +	20
CC	-	HPV68 +	1

Pro porovnání schopnosti detekce HPV68, byly zahrnuty pouze genotypy detekované Cobas® 4800 HPV Test v rámci poolu tzv. další HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68), které jsou detekovatelné pomocí obou těchto metod. CC (cervikální karcinom); další HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68); další z poolu HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66).

Pro validaci přítomnosti infekce HPV68 pomocí kvantitativní multiplex real-time PCR, byly navrženy specifické primery a próby do oblasti genů *E2* a *E6*. K určení limitu detekce metody, byla z plazmidu obsahujícího genomovou DNA HPV68 připravena kalibrační řada, podle které bylo možno kvantifikovat počet kopií HPV genů v rozmezí 400 000 až 4 kopie. Následně byla vyloučena možná cross-reakce navrženého detekčního systému s 6 LR-HPV (HPV6, 11, 40, 42, 43 a 44/55) a 17 HR-HPV genotypy (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70, 73 a 82).

Na základě poměru počtu kopií *E2/E6* byla u 37/43 (86 %) vzorků určena epizomální forma HPV68, u 5/43 vzorků (11,6 %) smíšená forma a pouze u 1/43 vzorku (2,3 %) byla detekována integrovaná forma HPV68. Vliv formy HPV68 a množství virální nálože (VL) na progresi infekce byl porovnán s výsledky z klinických cytologických a histologických vyšetření. Výsledky z cytologických a histologických vyšetření byly dostupné pouze u 18/43 (41,9 %) vzorků.

U vzorků patřících do Skupiny 1, byla u 11/13 vzorků určena epizomální forma infekce a u 2/13 smíšená forma infekce (viz Tab. 11). Virální nálož se u vzorků pohybovala v rozmezí 18 – 57000 kopií HPV/ng. Průměrná hodnota virální nálože ve skupině byla 2 231 kopií HPV/ng. Všech 11/13 vzorků, u kterých byla detekována epizomální forma infekce, bylo bez atypie cervixu. U obou vzorků se smíšenou formou infekce byly

z cytologického a histologického vyšetření prokázány přednádorové změny nízkého stupně 1x LSIL s opakovaně diagnostikovaným ASC-US (VL = 18 kopií HPV/ng) a 1x CIN1 neoplazie spolu s fibrosarkomem dutiny břišní (VL = 23 kopií HPV/ng).

Ve Skupině 2, bylo 9 vzorků, z toho 8/9 vzorků vyhodnocených jako epizomální forma infekce a 1 vzorek se smíšenou formou infekce (viz Tab. 11). Virální nálož se v této skupině pohybovala v rozmezí 23 – 19 317 kopií HPV/ng. Průměrná hodnota virální nálože byla 3 116 kopií HPV/ng. U epizomální formy infekce bylo 5/9 vzorků bez atypie cervixu, u 2/9 vzorků byly diagnostikovány přednádorové změny nízkého stupně 2x LSIL (VL = 292 kopií HPV/ng a 12 133 kopií HPV/ng), a u jednoho vzorku byla pomocí sona zjištěna přednádorová změna vyššího stupně - CIN3 neoplazie (VL = 19 317 kopií HPV/ng). U vzorku se smíšenou formou infekce byly zjištěny pomocí cytologických a histologických vyšetření přednádorové změny nízkého stupně LSIL léze (VL = 23 kopií HPV/ng).

U vzorků Skupiny 3, byla u 17/20 vzorků určena epizomální forma infekce, u 2/20 vzorků smíšená forma infekce a u jednoho vzorku integrovaná forma infekce (viz Tab. 11). V této skupině vzorků se virální nálož pohybovala v rozmezí 18 – 109 500 kopií HPV/ng, průměrná hodnota virální nálože byla 21 629 kopií HPV/ng. U vzorků s epizomální formou infekce, byla virální nálož v rozmezí 135 – 109 500 kopií HPV/ng, u vzorků se smíšenou formou infekce byla virální nálož 18 kopií HPV/ng a 23 kopií HPV/ng, a u vzorku s integrovanou formou infekce byla virální nálož 23 kopií HPV/ng. U epizomální formy infekce bylo 7/17 vzorků bez atypie cervixu a u 10/17 vzorků byly zjištěny pomocí cytologických a histologických vyšetření 4 přednádorové změny nízkého stupně (2x perzistující LGL (VL = 503 kopií HPV/ng a 3 727 kopií HPV/ng), 1x LSIL (VL = 135 kopií HPV/ng), 1x CIN1 s perzistující kolposkopickou LGL (VL = 1 308 kopií HPV/ng)), 5 přednádorových změn vysokého stupně (1x CIN2 (VL = 4 730 kopií HPV/ng), 1x CIN2 s LSIL (VL = 109 500 kopií HPV/ng), 1x CIN2 s ASC-H (VL = 602 kopií HPV/ng), 2x CIN3 (VL = 2 250 kopií HPV/ng a 5 417 kopií HPV/ng)) a jedna nádorová změna - mikroinvasivní IA1 (VL = 37 683 kopií HPV/ng). U smíšené formy infekce, byl 1/2 vzorků bez atypie cervixu a u 1/2 byly diagnostikovány přednádorové změny nízkého i vyššího stupně - LSIL a CIN2 (VL = 23 kopií HPV/ng). Pouze jeden vzorek byl vyhodnocen jako integrovaná forma HPV infekce, u tohoto vzorku nebyly diagnostikovány žádné neoplastické změny. U vzorku cervikálního karcinomu byla určena epizomální forma infekce s virální náloží 8 167 kopií HPV/ng.

Tab. 11: Zastoupení jednotlivých forem infekce, rozdělených podle detekce HPV68 pomocí systémů PapilloCheck® HPV-Screening a Cobas® 4800 HPV Testu.

	Cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV Screening test	Forma infekce		
			E	S	I
Skupina 1	další HR-HPV +	HPV68 +	11	2	-
Skupina 2	další HR-HPV +	HPV68 a další z poolu HR-HPV +	8	1	-
Skupina 3	další HR-HPV -	HPV68 +	17	2	1
CC	-	HPV68 +	1	-	-

Pro porovnání schopnosti detekce HPV68, byly zahrnuty pouze genotypy detekované Cobas® 4800 HPV Test v rámci poolu tzv. další HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68), které jsou detekovatelné pomocí obou těchto metod. CC (cervikální karcinom); další HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68); další z poolu HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66).

Pro rozlišení přítomnosti subtypů HPV68a a HPV68b ve zkoumaných vzorcích, byla zvolena touchdown PCR s následnou HRM analýzou. Ze 43 vzorků byla u 31 (72,1 %) detekována přítomnost subtypu HPV68a a u 12 (27,9 %) přítomnost HPV68b. U vzorků Skupiny 1, bylo 5/13 vzorků HPV68a pozitivních a 8/13 vzorků HPV68b pozitivních. Ve skupině 2, bylo 5/9 vzorků vyhodnoceno jako HPV68a a 4/9 vzorků vyhodnoceno jako HPV68b. U Skupiny 3, byl u všech 20 vzorků přítomný subtyp HPV68a. Vzorek cervikálního karcinomu byl vyhodnocen jako HPV68a (viz Tab. 12).

Tab. 12: Zastoupení jednotlivých subtypů HPV68, rozdělených podle detekce HPV68 pomocí systémů PapilloCheck® HPV-Screening a Cobas® 4800 HPV Testu.

	Cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV Screening test	Subtypy	
			HPV68a	HPV68b
Skupina 1	další HR-HPV +	HPV68 +	5	8
Skupina 2	další HR-HPV +	HPV68 a další z poolu HR-HPV +	5	4
Skupina 3	další HR-HPV -	HPV68 +	20	-
CC	-	HPV68 +	1	-

Pro porovnání schopnosti detekce HPV68, byly zahrnuty pouze genotypy detekované Cobas® 4800 HPV Test v rámci poolu tzv. další HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68), které jsou detekovatelné pomocí obou těchto metod. CC (cervikální karcinom); další HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68); další z poolu HR-HPV (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66).

7. Diskuze

V souboru 38 patientských vzorků cervikálních stěrů, odebraných při pravidelné gynekologické prohlídce, 4 cervikovaginálních stěrů získaných pomocí samoodběrové sady Evalyn® Brush (Rovers Medical Devices, Nizozemsko) a vzorku cervikálního karcinomu, byla pomocí navržené kvantitativní multiplex real-time PCR a HPV DNA PapilloCheck® HPV-Screening testu potvrzena přítomnost infekce virem HPV68. Pouze ve 22/42 vzorků cervikálních a cervikovaginálních stěrů byla pomocí Cobas® 4800 HPV Testu detekovaná infekce dalšími HR-HPV, zahrnující i HPV68.

HPV DNA testy Cobas® 4800 HPV Test a PapilloCheck® HPV-Screening test patří mezi komerčně vyráběné *in vitro* diagnostické (CE-IVD) testy, které jsou validované podle tzv. Meijerova protokolu. Tento protokol stanoví podmínky, které by HPV detekční testy měly splnit proto, aby byly vhodné jako primární cervikální screeningové metody. Podle Meijerova protokolu by HPV screeningové testy měly ve srovnání s Hybrid Capture-2 nebo GP5+/6+ PCR enzymovou imunoesejí vykazovat >90% senzitivitu a >98% specificitu pro >CIN2 (Meijer *et al.*, 2009). PapilloCheck® HPV-Screening test vykazuje 95,8% senzitivitu a 96,7% specificitu a Cobas® 4800 HPV Test vykazuje 90% senzitivitu a 94,6% specificitu (Hesselink, 2010, Arbyn *et al.*, 2015). U systému PapilloCheck® je pro HPV68 uveden limit detekce 30 kopií/PCR reakci. Cobas® 4800 uvádí pro HPV68 limit detekce 450 kopií/ml stabilizačního média PreserveCyt, které je ekvivalentní s použitým médiem cobas® PCR Cell Collection Media, Roche (PapilloCheck® und PapilloCheck® high-risk – Instructions For Use, 2011; Rao *et al.*, 2013). Oba tyto testy jsou rutinně používány při HPV screeningu.

Cílem práce byl návrh detekční metody pro validaci přítomnosti HPV68 v případech, kdy se uvedené CE-IVD HPV DNA detekční metody Cobas® 4800 HPV Test a PapilloCheck® HPV-Screening test neshodují. Pro validaci byla navržena kvantitativní real-time PCR se senzitivitou 400 000 až 4 kopie HPV/ng. Navržená multiplex real-time PCR sloužila také k výpočtu virální nálože a určení formy infekce ve studovaných vzorcích. Spolu s metodou HRM, která byla použita k určení subtypu HPV68 v jednotlivých vzorcích, sloužily tyto metody k objasnění příčiny rozdílnosti výsledků získaných pomocí studovaných CE-IVD HPV DNA detekčních metod.

Po exkluzi genotypů, které nejsou detekovány Cobas® 4800 HPV Testem, byla pomocí PapilloCheck® HPV-Screening testu pozorována infekce pouze genotypem HPV68

(tzv. single-type infekce) u 34 vzorků cervikálních a cervikovaginálních stěrů, z nichž Cobas® 4800 HPV Test detekoval HPV68 pouze u 13/34 vzorků. U vzorků, u kterých byla detekována přítomnost HPV68 pomocí obou CE-IVD metod, i u vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval přítomnost dalších vysoce rizikových genotypů, bylo porovnáno průměrné množství virální nálože (VL). U vzorků, které Cobas® 4800 HPV Test vyhodnotil pozitivně, byla virální nálož nižší (VL = 2 231 kopií HPV/ng), než u negativně vyhodnocených vzorků (VL = 21 629 kopií HPV/ng). Vliv nízké virální nálože na detekci HPV68 prostřednictvím Cobas® 4800 HPV Testu byl vyloučen.

Další z možných důvodů, ovlivňujících detekci HPV68 Cobas® 4800 HPV Testem, byl navržen vliv formy infekce. Při integraci HPV do lidského genomu dochází k fragmentaci HPV genomu, nejčastěji v místech kódujících pro gen *E2*, méně často dochází k fragmentaci u genů *E1*, *L1* a *L2*. Fragmentace úseku pro *L1* byla pozorována u HPV typů 16 a 58 (Wang *et al.*, 2013). Cobas® 4800 HPV Test využívá k detekci HPV typů amplifikaci 200 bází dlouhého úseku genu *L1*. U testovaných vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval přítomnost dalších vysoce rizikových typů, byla u 17/20 vzorků určena epizomální forma infekce, u 2/20 vzorků smíšená forma infekce, a u jednoho vzorku integrovaná forma infekce. S ohledem na přítomnost integrované formy pouze u jednoho vzorku nelze vliv fragmentace úseku *L1* objektivně hodnotit. Vliv formy infekce HPV68 byl také, spolu s množstvím virální nálože (VL), studován v souvislosti s progresí infekce. Tyto údaje byly porovnány s výsledky z klinických cytologických a histologických vyšetření. Vzhledem k malému množství dostupných klinických dat (pouze u 18/43 vzorků), nebyla forma infekce a VL nekonec zohledňována.

Posledním ze sledovaných vlivů, byl vliv přítomnosti konkrétního subtypu na detekci HPV68. Při rozlišení přítomnosti subtypů HPV68a a HPV68b ve všech zkoumaných vzorcích, bylo pomocí HRM 31/43 (72,1 %) vzorků vyhodnocených pozitivně na přítomnost subtypu HPV68a a 12/43 (27,9 %) na přítomnost HPV68b. U vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval přítomnost infekce dalšími vysoce rizikovými genotypy, bylo všech 20 vzorků vyhodnoceno jako subtyp HPV68a. Cobas® 4800 HPV Test tedy nedetekoval 20/31 (64,5 %) HPV68a infekcí. Nižší citlivost pro HPV68a, byla popsána také např. u PGMY primerů, cílených na *L1* gen, používaných k detekci HPV v řadě CE-IVD souprav (Estrade a Sahli, 2014).

8. Závěr

Infekce vysoce rizikovými HPV viry patří k jedné z nejběžnějších sexuálně přenosných infekcí u mužů a žen po celém světě. Během života se s infekcí alespoň jedním HPV typem setká přibližně 80 % sexuálně aktivní populace. Ve většině případů dochází ke spontánní regresi infekce. Při perzistující infekci vysoce rizikovými HPV viry však může dojít ke vzniku premaligních a maligních změn anogenitálního traktu, u žen především v oblasti děložního čípku. I přes dostupnost HPV vakcín a screeningových programů, zůstává cervikální karcinom celosvětově u žen čtvrtým nejčastějším karcinomem (Groves a Comelan, 2015).

Pomocí nově navržené detekční metody pro HPV68, založené na multiplex real-time PCR byla v této práci potvrzena přítomnost infekce genotypem HPV68 ve 42 cervikálních a cervikovaginálních stěrech, a ve vzorku cervikálního karcinomu. Výsledky získané pomocí multiplex real-time PCR vykazovaly 100% shodu s výsledky detekce pomocí PapilloCheck[®] HPV-Screening testu. Výsledky Cobas[®] 4800 HPV Testu se s výsledky PapilloCheck[®] HPV-Screening testu shodovaly pouze v 52,3 %. Jako důvod této nezhody byla identifikovaná nízká senzitivita Cobas[®] 4800 HPV Testu vůči subtypu HPV68a. Subtypy HPV68a a HPV68b vykazují 7% sekvenční variabilitu. Variabilita v oblasti kódující pro gen *L1*, který Cobas[®] 4800 HPV Test využívá k detekci přítomnosti HPV, může způsobovat nižší senzitivitu používaných primerů či prób vůči HPV68a, a vést k falešně negativním výsledkům (Longuet *et al.*, 1996; Estrade a Sahli, 2014). Cobas[®] 4800 HPV Test je rutinně používanou screeningovou metodou, využívanou v mnoha klinických laboratořích, prevalence HPV68 ve světě může být tedy mnohem vyšší. Úprava detekčního systému by sice mohla vést ke zvýšení senzitivity vůči HPV68a, zvyšování senzitivity, ale zároveň vede ke snižování specifity (Meijer, 2009). Úprava systému by nebyla nutná v případě, kdy by nově navržená multiplex real-time PCR sloužila k dodatečné validaci přítomnosti HPV68.

Studovaný genotyp HPV68 byl roku 2012 WHO klasifikován jako pravděpodobně „probably“ kancerogenní. I přes to, že byla týmem Halec *et al.* v roce 2014 potvrzena onkogenita genotypu HPV68, jeho zařazení do nových screeningových testů nebo vakcín je zatím nepravděpodobné. V současné době se odhaduje přítomnost HPV68 pouze u 1 % cervikálních karcinomů. Pokud by bylo prokázáno, že je prevalence HPV68 výrazně podhodnocena, mohlo by v budoucnu dojít k přehodnocení HR-HPV systému.

9. Seznam literatury

Abreu, A. L., Souza, R. P., Gimenes, F., & Consolaro, M. E. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology journal*, 9(1), 262.

Adekunle, O. O. (2012). Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) (Squamous Dysplasia). In *Intraepithelial Neoplasia*. InTech.

Achampong, Y., Kokka, F., Doufekas, K., & Olaitan, A. (2018). Prevention of Cervical Cancer. *Journal of Cancer Therapy*, 9(01), 79.

Altobelli, E., & Lattanzi, A. (2015). Cervical carcinoma in the European Union: an update on disease burden, screening program state of activation, and coverage as of March 2014. *International Journal of Gynecological Cancer*, 25(3), 474-483.

Arbyn, M., Tommasino, M., Depuydt, C. and Dillner, J. (2014), Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer?. *J. Pathol.*, 234: 431-435.

Arbyn, M., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Berkhof, J., Cuschieri, K., Kocjan, B. J., & Poljak, M. (2015). Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(9), 817-826.

Arias-Pulido, H., Peyton, C. L., Joste, N. E., Vargas, H., & Wheeler, C. M. (2006). Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of clinical microbiology*, 44(5), 1755-1762.

Arney, A., & Bennett, K. M. (2010). Molecular diagnostics of human papillomavirus. *Laboratory Medicine*, 41(9), 523-530.

Artaza-Irigaray, C., Flores-Miramontes, M. G., Olszewski, D., Magaña-Torres, M. T., López-Cardona, M. G., Leal-Herrera, Y. A., ... & Aguilar-Lemarroy, A. (2017). Genetic variability in E6, E7 and L1 genes of Human Papillomavirus 62 and its prevalence in Mexico. *Infectious agents and cancer*, 12(1), 15.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*, 21(3), 389-395.

- Baseman, J. G., & Koutsky L. A.** (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32, S16-S24.
- Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E.-M.** (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*, 401(1), 70–79.
- Boers, A., Slagter-Menkema, L., Van Hemel, B. M., Belinson, J. L., Ruitenbeek, T., Buikema, H. J., ... & Wisman, G. B. A.** (2014). Comparing the Cervista HPV HR test and Hybrid Capture 2 assay in a Dutch screening population: improved specificity of the Cervista HPV HR test by changing the cut-off. *PloS one*, 9(7), e101930.
- Bofill-Mas, S.** (2016). Polyomavirus. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogens Project. <http://www.waterpathogens.org> (J.S Meschke, and R. Girones (eds) Part 3 Viruses) <http://www.waterpathogens.org/book/polyomavirus> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
- Brianti, P., De Flammis, E., & Mercuri, S. R.** (2017). Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol*, 40, 80-85.
- Brink, A. A., Snijders, P. J., & Meijer, C. J.** (2007). HPV detection methods. *Disease markers*, 23(4), 273-281.
- Burd, E. M.** (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17.
- Burd, E. M.** (2016). Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), 291–319.
- Bzhalava, D., Eklund, C., & Dillner, J.** (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341-344.
- Calleja-Macias, I. E., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, A.-L., Chung, L.-P., Collins, R. J., ... Bernard, H.-U.** (2005). Papillomavirus Subtypes Are Natural and Old Taxa: Phylogeny of Human Papillomavirus Types 44 and 55 and 68a and -b. *Journal of Virology*, 79(10), 6565–6569.
- Cardoso, J. C., Calonje E.** (2011). Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 20(3): 145-54.

- Conway, M. J., & Meyers, C.** (2009). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *Journal of Dental Research*, 88(4), 307–317.
- Cuzick, J., Clavel, C., Petry, K. U., Meijer, C. J., Hoyer, H., Ratnam, S., ... & Iftner, T.** (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*, 119(5), 1095-1101.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H.** (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.
- Denny, L. A.** (2009). Cervical intraepithelial neoplasia. *Southern African Journal of Gynaecological Oncology*, 1:1, 5-8.
- Dilley, S., Miller, K., & Huh, W.** (2018). HPV vaccination. *Gynecologic oncology*, 148(1), 3-4.
- Dochez, C., Bogers, J. J., Verhelst, R., & Rees, H.** (2014). HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine*, 32(14), 1595-1601.
- Doorbar, J.** (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525-541.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I.** (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25(Suppl Suppl 1), 2–23.
- Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J.** (2015). Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*, 7(7), 3863-3890.
- El Mzibri, M., Attaleb, M., El Hassani, R. A., Khyatti, M., Benbacer, L., Ennaji, M. M., & Amrani, M.** (2012). Evaluation of p53, p16INK4a and E-Cadherin status as biomarkers for cervical cancer diagnosis. In *Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention*. InTech.
- Estrade, C., & Sahli, R.** (2014). Updating the PGMY primers and probes for improved detection of HPV68a: validation of version 2 of the PGMY-CHUV assay. *Journal of clinical microbiology*, 52(11), 4033-4035.

- Fardows, J., Nehar, N., Laskar, N., & Joly, S. N.** (2016). Human Papilloma Virus Vaccine: Future of Cervical Cancer Prevention. *Journal of Enam Medical College*, 6(3), 157-160.
- Fernandes, J. V., & de Medeiros Fernandes, T. A. A.** (2012). Human papillomavirus: biology and pathogenesis. In *Human Papillomavirus and Related Diseases-From Bench to Bedside-A Clinical Perspective*. InTech.
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L....& Franceschi, S.** (2012). Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30, F12-F23.
- Franco, E. L., Villa, L. L., Sobrinho, J. P., Prado, J. M., Rousseau, M. C., Désy, M., & Rohan, T. E.** (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *The Journal of infectious diseases*, 180(5), 1415-1423.
- Gao, G., & Smith, D. I.** (2016). Human papillomavirus and the development of different cancers. *Cytogenetic and genome research*, 150(3-4), 185-193.
- Ghosh, S. K., Choudhury, B., Hansa, J., Mondal, R., Singh, M., Duttagupta, S., ... & Ghosh, P. R.** (2011). Human papillomavirus testing for suspected cervical cancer patients from Southern Assam by fast-PCR. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(3), 749-51.
- Gomez, D. T., & Santos, J. L.** (2007). Human papillomavirus infection and cervical cancer: pathogenesis and epidemiology. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 1, 680-8.
- Grce, M., Sabol, I., & Milutin Gašperov, N.** (2012). Burden and prevention of HPV related diseases: Situation in Croatia. *Periodicum biologorum*, 114(2), 175-186.
- Greiner Bio-One. GmbH.** (2011). PapilloCheck® high-risk Instructions For Use. BQ-O65-01. Germany (<http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/English%20files%20for%20the%20UK%20website/Instructions%20for%20use%20files/IFU%20Papillocheck%20HR.pdf>, zobrazeno 18. 3. 2017)
- Groves, I. J. and Coleman, N.** (2015), Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J. Pathol.*, 235: 527-538.

Halec, G., Alemany, L., Lloveras, B., Schmitt, M., Alejo, M., Bosch, F. X., Tous, S., ... & Pawlita, M. (2014), Pathogenic role of the eight probably/possibly carcinogenic HPV types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82 in cervical cancer. *J. Pathol.*, 234: 441-451.

Harari, A., Chen, Z., & Burk, R. D. (2014). HPV Genomics: *Past, Present and Future*. *Current Problems in Dermatology*, 45, 1–18.

He, Y., Wu, Y. M., Wang, T., Song, F., Wang, Y., Zhao, Q., ... & Zhang, W. Y. (2012). Clinical study on cervical intraepithelial neoplasia with high-risk HPV infection among pregnant women. *Zhonghua fu chan ke za zhi*, 47(8), 598-602.

Hesselink, A. T., Heideman, D. A. M., Berkhof, J., Topal, F., Pol, R. P., Meijer, C. J. L. M., & Snijders, P. J. F. (2010). Comparison of the clinical performance of PapilloCheck human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. *Journal of clinical microbiology*, 48(3), 797-801.

HPVINFO (2018). Diagnóza HPV (<http://hpvinfo.cz/diagnoza-hpv>, zobrazeno 3. 4. 2018)

Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Anastos, K., Segondy, M., ... Burk, R. D. (2013). Evolution and Taxonomic Classification of *Alphapapillomavirus* 7 Complete Genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70. *PLoS ONE*, 8(8), e72565.

IARC (2007). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World health organization. International agency for research on cancer. Volume 90.

IARC (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: A Review of Human Carcinogens: Biological Agents Vol. 100B.

IARC. GLOBOCAN (2012). Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. (http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_site_sel.aspx; <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>, staženo 2. 3. 2018).

Isidean, S. D., & Franco, E. L. (2014). Embracing a new era in cervical cancer screening. *Lancet (London, England)*, 383(9916), 493.

Jaisamrarn, U., Castellsagué, X., Garland, S. M., Naud, P., Palmroth, J., Del Rosario-Raymundo, M. R., ... & Teixeira, J. C. (2013). Natural history of progression of HPV

infection to cervical lesion or clearance: analysis of the control arm of the large, randomised PATRICIA study. *PLoS One*, 8(11), e79260.

Kelloff, G. J., & Sigman, C. C. (2007). Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer-preventive drug development. *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 508.

Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452.

Kumar, V; Abbas, A K.; Fausto, N; & Mitchell, R N. (2007). Robbins Basic Pathology (8th ed.). Saunders Elsevier. pp. 718–721. ISBN 978-1-4160-2973-1. Cervical Dysplasia: Overview, Risk Factors.

Kumar, P. J., & Clark, M. L. (2009). *Kumar & Clark's clinical medicine* (7th ed.). Edinburgh: Saunders/Elsevier.

LabGuide. (2017). TaqMan sondy (<http://labguide.cz/taqman-sondy/>, zobrazeno 14. 11. 2017).

Lee, S. J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2016). Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of gynecologic oncology*, 27(5).

Leto, M. D. G. P., Júnior, S., Porro, A. M., & Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais brasileiros de dermatologia*, 86(2), 306-317.

Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J., & Clifford, G. M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International journal of cancer*, 128(4), 927-935.

Longuet, M., Beaudenon, S., & Orth, G. (1996). Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(3), 738–744.

Longworth, M. S., & Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 362–372.

- Lorenzi, A. T., Syrjänen, K. J., & Longatto-Filho, A.** (2015). Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. *Virology journal*, 12(1), 112.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A.** (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.
- Manisha, S., Bagde, N., & Shrivastava, D.** (2017). Visual inspection of cervix with acetic acid: An alternative to cytology and colposcopy in early screening of cervical cancer in low-resource setup. *Journal of Datta Meghe Institute of Medical Sciences University*, 12(1), 32.
- Markoulatos, P., Sifakas, N., & Moncany, M.** (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*, 16(1), 47-51.
- Markowitz, L. E., Dunne, E. F., Saraiya, M., Chesson, H. W., Curtis, C. R., Gee, J., ... & Unger, E. R.** (2014). Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*, 63(5), 1-30.
- Marshall, K.** (2003). Cervical dysplasia: early intervention.(Cervical Dysplasia). *Alternative medicine review*, 8(2), 156-171.
- McBride, A. A., & Warburton, A.** (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens*, 13(4), e1006211.
- Meijer, C. J., Berkhof, J., Castle, P. E., Hesselink, A. T., Franco, E. L., Ronco, G., ... & Heideman, D. A.** (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *International journal of cancer*, 124(3), 516-520.
- Mishra, G. A., Pimple, S. A., & Shastri, S. S.** (2011). An overview of prevention and early detection of cervical cancers. *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 32(3), 125.
- Mistry, N., Wibom, C., & Evander, M.** (2008). Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. *Virology journal*, 5(1), 118.

- Motamedi, M., Böhmer, G., Neumann, H. H., & von Wasielewski, R.** (2015). CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases. *BMC infectious diseases*, 15(1), 541.
- Mui, U. N.; Haley, C. T.; Tyring, S. K.** (2017). Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *J. Clin. Med.* 6, no. 12: 111.
- Panatto, D., Amicizia, D., Trucchi, C., Casabona, F., Lai, P. L., Bonanni, P., ... & Coppola, R. C.** (2012). Sexual behaviour and risk factors for the acquisition of human papillomavirus infections in young people in Italy: suggestions for future vaccination policies. *BMC public health*, 12(1), 623.
- Petry, K. U.** (2014). HPV and cervical cancer. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74:sup244, 59-62.
- Preisler, S., Rebolj, M., Untermann, A., Ejegod, D. M., Lynge, E., Rygaard, C., & Bonde, J.** (2013). Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche cobas HPV real-time PCR assay. *PLoS One*, 8(3), e59765.
- Rao, A., Young, S., Erlich, H., Boyle, S., Krevolin, M., Sun, R., ... & Behrens, C.** (2013). Development and characterization of the cobas human papillomavirus test. *Journal of clinical microbiology*, 51(5), 1478-1484.
- Reuter, S., Delius, H., Kahn, T., Hofmann, B., zur Hausen, H., & Schwarz, E.** (1991). Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME180. *Journal of Virology*, 65(10), 5564–5568.
- Roztočil, A., & Bartoš, P.** (2011). *Moderní gynekologie*. Grada. p336-340.
- Scarinci, I. C., Garcia, F. A. R., Kobetz, E., Partridge, E. E., Brandt, H. M., Bell, M. C., ... Castle, P. E.** (2010). Cervical Cancer Prevention: New Tools and Old Barriers. *Cancer*, 116(11), 2531–2542.
- Sellers, J.W. & Sankaranarayanan, R.** (2003). Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: A beginner's manual. IARC Press, Lyon.

Shepherd, J., Peersman, G., Weston, R., & Napuli, I. (2000). Cervical cancer and sexual lifestyle: a systematic review of health education interventions targeted at women. *Health Education Research*, (6) 681–694.

Schéma hydrolýzy TaqMan próby (<http://1.bp.blogspot.com/y2ZyenfQow0/UZpShbDEJQI/AAAAAAAAAB-8/jxO4F5M7e2I/s640/TaqMan+GX+cartoon.jpg>; staženo a upraveno 14. 11. 2017).

Schéma průběhu PCR reakce (https://qph.ec.quoracdn.net/main_qimg701d1c1f8a9cf96c8ab15697d3a3d51f, staženo a upraveno 14. 11. 2017).

Schiffman, M., Clifford, G., & Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious agents and cancer*, 4(1), 8.

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(5), 368-383.

Schiller, J. T., & Müller, M. (2015). Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet Oncology*, 16(5), e217-e225.

Tulay, P., & Serakinci, N. (2016). The role of human papillomaviruses in cancer progression. *Journal Of Cancer Metastasis And Treatment*, 2(6), 201-13.

Uijterwaal, M. H., Verhoef, V. M., Snijders, P. J., & Meijer, C. J. (2014). Arguments in favor of HPV testing for cervical screening and post-treatment CIN2+ monitoring.

Vargas-Hernández, V. M., Vargas-Aguilar, V. M., & Tovar-Rodríguez, J. M. (2015). Primary cervical cancer screening. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 83(5), 448-453.

Vieira, L., & Almeida, A. (2013). The cytology and DNA detection by the PapilloCheck® test in the diagnosis of human papillomavirus infection. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(1), 61-67.

Villa, L. L., Denny, L. (2006). CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 94, S71-S80.

- Vink, M. A., Bogaards, J. A., van Kemenade, F. J., de Melker, H. E., Meijer, C. J., & Berkhof, J.** (2013). Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *American journal of epidemiology*, *178*(7), 1161-1169.
- Voltaggio, L., Cimino-Mathews, A., Bishop, J. A., Argani, P., Cuda, J. D., Epstein, J. I., ... & Vang, R.** (2016). Current concepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia: A review by organ system. *CA: a cancer journal for clinicians*, *66*(5), 408-436.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., ... & Muñoz, N.** (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, *189*(1), 12-19.
- Wang, L., Dai, S. Z., Chu, H. J., Cui, H. F., & Xu, X. Y.** (2013). Integration sites and genotype distributions of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *14*(6), 3837-3841.
- Williams, V. M., Filippova, M., Soto, U., & Duerksen-Hughes, P. J.** (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virology*, *6*(1), 45-57.
- Wu, C., Zhu, X., Kang, Y., Cao, Y., Lu, P., Zhou, W., ... & Song, Y.** (2018). Epidemiology of Humanpapilloma virus infection among women in Fujian, China. *BMC public health*, *18*(1), 95.
- Yu, T., Ferber, M. J., Cheung, T. H., Chung, T. K. H., Wong, Y. F., & Smith, D. I.** (2005). The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genetics*, *158*(1), 27-34.
- Zaravinos, A., Bizakis, J., & Spandidos, D. A.** (2009), Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 1-7 in human nasal polyposis. *J. Med. Virol.*, *81*: 1613-1619.
- zur Hausen H.** (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, *384*(2): 260-5.

10. Přílohy

Příloha 1: Souhrnná tabulka výsledků vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test detekoval infekci dalšími HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 (Skupina 1).

Příloha 2: Souhrnná tabulka výsledků vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test detekoval infekci dalšími HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 a další genotypy z poolu HR-HPV (Skupina 2).

Příloha 3: Souhrnná tabulka výsledků vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval infekci dalšími HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 (Skupina 3), spolu s výsledky vzorku cervikálního karcinomu (CC).

Příloha 1: Souhrnná tabulka výsledků vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test detekoval infekci dalšími HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 (Skupina 1).

Číslo vzorku	Původ vzorku	cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV-Screening test	Subtyp HPV68	Koncentrace DNA (ng/ul)	Počet kopií genu <i>GAPDH</i> (kopie/ul DNA)	Počet kopií genu <i>E2</i> (kopie/ul DNA)	Počet kopií genu <i>E6</i> (kopie/ul DNA)	Poměr E2/E6	Forma HPV infekce (I/S/E)	Virální nálož (kopie E6/ng DNA)	Výsledek cytologického nebo histologického vyšetření
1	CVS	HPV18 + další HR-HPV	HPV68	A	1,23	3,17x10 ³	2,71x10 ⁴	1,21x10 ⁴	2,24	E	9837	
2	CS	další HR-HPV	HPV68	B	0,37	5,50x10 ²	2,11x10 ³	8,59x10 ²	2,46	E	429	
3	CS	další HR-HPV	HPV68	A	0,10	5,53x10 ¹	3,51x10 ²	1,68x10 ²	2,09	E	84	
4	CS	další HR-HPV	HPV68, 53	B	0,50	1,56x10 ³	3,82x10 ⁴	1,74x10 ⁴	2,20	E	8683	
5	CVS	další HR-HPV	HPV68	A	0,49	8,15x10 ²	5,64x10 ²	1,78x10 ²	3,16	E	89	
6	CS	další HR-HPV	HPV68	B	1,01	1,56x10 ³	1,73x10 ³	5,67x10 ²	3,04	E	284	
7	CS	HPV16+18+ další HR-HPV	HPV16, 18, 68	B	1,33	3,47x10 ²	1,96x10 ¹	3,67x10 ¹	0,53	S	18	LSIL, Perzistující ASC-US
8	CS	další HR-HPV	HPV68	B	26,60	9,33x10 ³	2,66x10 ⁴	1,25x10 ⁴	2,15	E	6235	
9	CS	další HR-HPV	HPV68	B	1,02	3,36x10 ²	5,16x10 ²	3,04x10 ²	2,11	E	152	
10	CS	další HR-HPV	HPV68, 70	A	4,51	2,40x10 ⁴	3,89x10 ⁴	1,86x10 ⁴	2,12	E	9300	
11	CS	další HR-HPV	HPV68, 82	B	18,23	1,01x10 ⁴	2,19x10 ⁵	1,14x10 ⁵	1,92	E	57000	
12	CS	další HR-HPV	HPV68, 73, 82	B	4,44	1,72x10 ³	4,41x10 ³	2,22x10 ³	1,99	E	1108	
13	CS	HPV16+ další HR-HPV	HPV16, 68, 42	A	2,54	1,06x10 ³	3,01x10 ¹	4,67x10 ¹	0,64	S	23	CIN1, fibrosarkom duť. břišní

CS - cervikální stěr; CVS - cervikovaginální stěr; CC - cervikální karcinom; další HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68); E (epizomální), S (smíšená), I (integrovaná) forma infekce; LSIL - dlaždicové intraepiteliální léze nízkého stupně; ASC-US - atypické skvamózní buňky neurčeného významu; CIN1 – lehká intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu

Příloha 2: Souhrnná tabulka výsledků vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test detekoval infekci dalšími HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 a další genotypy z poolu HR-HPV (Skupina 2).

Číslo vzorku	Původ vzorku	cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV-Screening test	Subtyp HPV68	Koncentrace DNA (ng/ul)	Počet kopií genu <i>GAPDH</i> (kopie/ul DNA)	Počet kopií genu <i>E2</i> (kopie/ul DNA)	Počet kopií genu <i>E6</i> (kopie/ul DNA)	Poměr E2/E6	Forma HPV infekce (I/S/E)	Virální nálož (kopie E6/ng DNA)	Výsledek cytologického nebo histologického vyšetření
1	CS	další HR-HPV	HPV56, 68, 70	A	0,18	1,37x10 ²	1,30x10 ³	5,84x10 ²	2,22	E	292	LSIL
2	CS	další HR-HPV	HPV52, 68	B	0,43	6,25x10 ²	7,88x10 ²	2,81x10 ²	2,80	E	141	
3	CS	další HR-HPV	HPV52, 68	B	0,83	2,22x10 ³	5,46x10 ⁴	2,43x10 ⁴	2,25	E	12133	LSIL
4	CS	další HR-HPV	HPV39, 68, 70	A	7,94	3,36x10 ³	1,58x10 ⁴	7,84x10 ³	2,01	E	3922	
5	CS	další HR-HPV	HPV31, 56, 68	A	2,40	8,32x10 ¹	1,52x10 ²	4,67x10 ¹	1,08	E	23	
6	CS	další HR-HPV	HPV31, 68, 42	A	110,60	2,83x10 ⁴	7,98x10 ⁴	3,92x10 ⁴	2,04	E	19600	
7	CS	další HR-HPV	HPV56, 68	A	46,86	1,06x10 ⁴	2,60x10 ⁴	1,36x10 ⁴	1,91	E	6817	
8	CS	HPV16+ další HR-HPV	HPV16, 56, 68	B	2,19	8,21x10 ²	8,21x10 ²	4,67x10 ¹	0,64	S	23	LSIL
9	CS	další HR-HPV	HPV39, 68, 66, 70	B	2,55	2,21x10 ³	8,53x10 ⁴	3,86x10 ⁴	2,21	E	19317	CIN3 in sono

CS - cervikální stěr; CVS - cervikovaginální stěr; CC - cervikální karcinom; další HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68); E (epizomální), S (smíšená), I (integrována) forma infekce; LSIL - dlaždicové intraepiteliální léze nízkého stupně; CIN3 - těžká intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu

Příloha 3: Souhrnná tabulka výsledků vzorků, u kterých Cobas® 4800 HPV Test nedetekoval infekci dalšími HR-HPV a systém PapilloCheck® HPV-Screening detekoval HPV68 (Skupina 3), spolu s výsledky vzorku cervikálního karcinomu (CC).

Číslo vzorku	Původ vzorku	cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV-Screening test	Subtyp HPV68	Koncentrace DNA (ng/ul)	Počet kopií genu <i>GAPDH</i> (kopie/ul DNA)	Počet kopií genu <i>E2</i> (kopie/ul DNA)	Počet kopií genu <i>E6</i> (kopie/ul DNA)	Poměr E2/E6	Forma HPV infekce (I/S/E)	Virální nálož (kopie E6/ng DNA)	Výsledek cytologického nebo histologického vyšetření
1	CS	N	HPV68	A	0,20	3,15x10 ²	1,05x10 ³	4,85x10 ²	2,16	E	242	
2	CS	N	HPV68, 70	A	0,34	1,32x10 ⁴	4,72x10 ⁵	2,19x10 ⁵	2,16	E	109500	LSIL, CIN2
3	CS	N	HPV68	A	2,00	5,51x10 ³	4,04x10 ⁴	1,73x10 ⁴	2,34	E	8633	
4	CS	N	HPV68	A	1,22	5,48x10 ³	1,63x10 ⁵	7,72x10 ⁴	2,11	E	38617	
5	CS	N	HPV68	A	0,52	9,57x10 ²	4,85x10 ³	1,95x10 ³	2,49	E	973	
6	CS	HPV16	HPV16, 68	A	0,66	1,19x10 ³	3,20x10 ³	1,20x10 ³	2,66	E	602	ASC-H, CIN2
7	CS	N	HPV68, 42	A	0,30	8,61x10 ²	2,85x10 ⁴	1,08x10 ⁴	2,63	E	5417	CIN3
8	CS	N	HPV68	A	111,00	4,00x10 ⁴	1,42x10 ⁴	7,45x10 ³	1,91	E	3727	Perzistující LGL
9	CS	N	HPV68	A	25,60	7,32x10 ³	2,13x10 ¹	3,67x10 ¹	0,58	S	18	
10	CS	N	HPV68,42	A	3,81	1,32x10 ³	5,05x10 ³	2,62x10 ³	1,93	E	1308	CIN1, Perzistující LGL
11	CS	N	HPV68	A	4,05	3,83x10 ³	1,51x10 ⁵	7,54x10 ⁴	2,01	E	37683	IA1- Mikroinvazivní
12	CS	N	HPV68, 59	A	2,21	1,80x10 ³	7,98x10 ⁴	4,11x10 ⁴	1,94	E	20550	
13	CVS	N	HPV68	A	10,16	9,11x10 ³	3,04x10 ⁵	1,56x10 ⁵	1,95	E	78000	
14	CS	N	HPV68	A	1,02	3,19x10 ²	2,18x10 ³	1,01x10 ³	2,17	E	503	Perzistující LGL
15	CS	N	HPV68	A	3,47	1,76x10 ³	1,26x10 ⁴	4,50x10 ³	2,80	E	2250	CIN3
16	CS	N	HPV68	A	2,87	1,05x10 ³	3,01x10 ¹	4,67x10 ¹	0,21	I	23	
17	CS	N	HPV68, 42	A	2,41	1,44x10 ²	7,54x10 ²	2,71x10 ²	2,78	E	135	LSIL
18	CS	N	HPV68, 44/55	A	2,40	1,30x10 ³	2,12x10 ⁴	9,46x10 ³	2,24	E	4730	CIN2
19	CVS	N	HPV68	A	2,60	4,95x10 ³	2,57x10 ⁵	1,26x10 ⁵	2,04	E	63000	
20	CS	N	HPV68	A	2,48	2,02x10 ³	3,01x10 ¹	4,67x10 ¹	0,64	S	23	LSIL, CIN2
CC	CC	-	HPV68	A	12,80	1,90x10 ⁴	6,51x10 ⁴	1,63x10 ⁴	3,99	E	8167	CC

CS - cervikální stěr; CVS - cervikovaginální stěr; CC - cervikální karcinom; N - nedetekováno; další HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68); E (epizomální), S (smíšená), I (integrovaná) forma infekce; LSIL – dlaždicové intraepiteliální léze nízkého stupně; LGL - léze nízkého stupně; ASC-H - atypické skvamózní buňky, nelze vyloučit dlaždicové intraepiteliální léze vysokého stupně; CIN1 - lehká intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu; CIN2 - středně těžká intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu; CIN3 - těžká intraepiteliální neoplazie cervikálního epitelu; IA1 - mikroinvazivní typ nádorů s invazí do hloubky 3 mm