



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta  
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# Vyšetření HPV jako součást prevence karcinomu děložního hrdla

Vypracoval: Petra Petříková  
Vedoucí práce: prim. MUDr. Heinigeová Blanka

České Budějovice 2014

## **Abstrakt**

Pohlavně přenosné infekce HPV (human papillomavirus), neboli infekce lidským papilomavirem, mají rozhodující význam v etiologii karcinomu děložního hrdla.

Každý rok se v České republice objeví více než 1000 nových případů karcinomu děložního hrdla a kolem 400 žen na toto onemocnění zemře (Dušek et al. 2012).

Výskyt karcinomu děložního hrdla patří v České republice vzhledem k nefungujícímu screeningovému vyšetření mezi nejvyšší v Evropě. Vrcholy výskytu ve věkové kategorii jsou dva: mezi 35.-39. a 60.-65. rokem věku. Záchyt onemocnění v časném I. stádiu dlouhodobě představuje 40 % všech případů karcinomů děložního hrdla. Tato alarmující čísla jsou důsledkem pozdní diagnostiky: absence screeningu, nekvalitní cytologické laboratoře, nedostatečné provádění HPV testu (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Lidské papilomaviry jsou nejčastější pohlavně přenášenou infekcí na světě. U žen je celoživotní riziko infekce 80 % (Laco 2012). Vysoce rizikové genotypy (high risk HR – HPV 16, HPV 18) byly zařazeny mezi karcinogeny. Žena, která je HR HPV pozitivní má 100-400krát vyšší riziko vzniku karcinomu děložního hrdla než žena HR HPV negativní (Turyna, Sláma et al. 2010).

V první části mé práce se teoreticky zabývám historií, strukturou a rozdělením lidských papilomavirů.

V další části popisují cesty přenosu lidských papilomavirů a inkubační dobu tohoto agens. Inkubační doba i replikační cyklus viru jsou závislé na míře infekce a stavu imunitního systému. Zvýšený výskyt papilomavirových infekcí nacházíme u osob s porušenou složkou buněčné imunity (Fait et al. 2009).

Dále uvádím diagnostické postupy a testy, prokazujícími HPV infekci včetně jejích klinických projevů. Přetrvávající HPV infekce, společně s dalšími faktory (kouření, imunodeficience, nedostatek vitamínů, stres, vaginální infekce a hormonální vlivy), zvyšuje pravděpodobnost vzniku karcinomu děložního hrdla (Heinzelmann-Schwarz et al. 2014). Zde také zmiňuji histopatologickou klasifikaci, prognózu a léčbu těchto nádorů.

Epidemiologická situace výskytu karcinomu děložního hrdla v České republice zatím není tak příznivá jako v jiných vyspělých zemích s efektivnějším screeningem. Pro srovnání uvádím postavení České republiky, co se týče incidence a mortality v celosvětovém měřítku.

Poté se zaměřuji na důležitost primární prevence, zejména očkování. Od 1. dubna 2012 se mohou 13leté dívky v České republice nechat očkovat proti rakovině děložního hrdla z prostředků veřejného zdravotního pojištění. I když zájem rodičů od zavedení plošné vakcinace výrazně vzrostl, zůstává očkování proti karcinomu děložního hrdla stále mediálně i společensky diskutovaným tématem.

Do sekundární prevence zařazuji preventivní prohlídky, kolposkopii, onkologickou cytologii, sérologické metody a HPV test.

Cílem mé práce je zdůraznit velký význam vyšetření lidských papilomavirů – HPV testu u rizikové skupiny žen nad 35 let v rámci preventivních prohlídek. V současné době se však toto vyšetření provádí pouze u žen s již abnormálním cytologickým nálezem.

Moje práce shrnuje kvantitativní nálezy vyšetření HPV, na základě stanovení nukleové kyseliny lidských papilomavirů, hybridizační metodou se zesíleným signálem za použití chemiluminiscenční detekce. K detekci HPV byly použity soupravy *hc2 High-Risk HPV DNA Test* a *hc2 HPV DNA Test* od firmy QIAGEN.

Práce zahrnuje výsledky vyšetření vysokorizikových typů lidských papilomavirů (HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) u 767 žen v období od 1. 1. 2010 do 31. 12. 2013, provedených na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. Tato skupina žen s již pozitivním cytologickým nálezem byla rozdělena do šesti věkových kategorií, aby se zviditelnily rizikové skupiny žen nad 35 let a nad 65 let. Protože i já jsem v rizikové skupině nad 35 let, snažila jsem se touto prací potvrdit hypotézu, zda příčinou těchto cytologických změn u žen ve věku nad 35 let mohou být právě nebezpečné typy lidských papilomavirů.

Na závěr, po analýze dosažených výsledků, jsem se snažila navrhnout řešení, které by se dalo využít v praxi.

**Klíčová slova:** lidské papilomaviry, karcinom děložního hrdla, sexuálně přenosné agens, prevence, HPV test

## **Abstract**

Sexually transmitted HPV infection (human papillomavirus), or infection with human papillomavirus, is a decisive factor in cervix carcinoma etiology.

Every year more than 1000 new cases of cervix carcinoma occur in the Czech Republic; more than 400 women die of this disease (Dušek et al. 2012).

In the Czech Republic, the frequency of cervix carcinoma occurrence belongs to the highest in Europe. The occurrence displays two peaks relating to the age of patients: between 35 – 39 years and between 60 – 65 years of age. Diagnosing the disease in the early 1st stage represents, in a long term perspective, 40% of all cervix carcinoma cases. These alarming numbers are the result of late diagnostics: absent screening, poor quality diagnostic laboratories, insufficient application of HPV tests (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Human papillomaviruses are considered to be the most frequent sexually transmitted infection worldwide. In women, the life-long risk of infection is 80% (Laco 2012). High-risk genotypes (high-risk HR – HPV 16, HPV 18) were classified among carcinogens. The risk of cervix carcinoma in a woman who is HR HPV positive is 100 to 400 times higher compared to a woman who is HR HPV negative (Turyna, Sláma et al. 2010).

The first part of my thesis contains a brief theoretical overview of HPV history, structure and classification.

The next part deals with the ways of HPV transmission and the incubation period of the pathogenic agent in question. The incubation period as well as the replication cycle of the virus depend on the extent of infection and on the status of the immune system. Increased occurrence of papillomavirus infection is found in persons with a damaged component of cell immunity (Fait et al. 2009).

In the further part of the thesis I focused on the diagnostic procedures and tests proving HPV infection including its clinical manifestations. Continued HPV infection, together with other relevant factors (smoking, immunodeficiency, lack of vitamins, stress, vaginal infection and hormone influence), increases the probability of cervix

carcinoma occurrence (Heinzelmann-Schwarz et al. 2014). Here I also mention the histopathological classification, prognosis and treatment of these tumors.

Considering the occurrence of cervix carcinoma, the situation in the CR is not as favorable as in other advanced countries where the screening is more effective. For comparison, the incidence and mortality in the CR are presented within global scale.

Further on I attempted to stress the importance of primary prevention, mainly vaccination. Since April 1 2012, the girls in the CR who are 13 years of age can get vaccinated against cervix carcinoma, the vaccination being covered from public health insurance. Though the parents' interest has been considerably increasing, the vaccination against cervix carcinoma still remains a widely discussed topic both in media and in social discussions.

The parts of secondary prevention mentioned in the thesis are preventive examinations, colposcopy, oncological cytology, serological methods and HPV test.

The aim of my thesis is to emphasize the importance of testing for human papilloma virus – HPV tests carried out in high risk group of women aged over 35 years within the system of preventive examinations. However, nowadays these examinations are accomplished just in women with an abnormal cytological finding.

My thesis summarizes the quantitative findings as regards HPV tests done on the basis of determining the nucleic acid of human papillomaviruses by hybridization method with enhanced signal using chemiluminescence detection. The detection of HPV was achieved with the use of the sets hc2 High-Risk HPV DNA Test and hc 2 HPV DNA Test from QIAGEN company.

The thesis includes results of the tests for high-risk types of human papillomaviruses (HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) found in 767 women over the period from January 1 2010 to December 31 2013. The tests were carried out at the Medical Microbiology Ward of the Hospital Jindřichův Hradec, a joint-stock company. The group of women with already positive cytological finding was divided into six age categories to highlight the high-risk groups of women over 35 and over 65. As I myself belong to the high-risk group over 35, my intention was to prove the

hypothesis that the cause of the cytological changes in women over 35 can be attributed to the dangerous types of human papillomavirus.

Finally, after carrying out the analysis of the obtained results, I attempted to propose a solution which could be used in practice.

**Keywords:** human papillomavirus, cervical cancer, sexually transmitted agents, prevention, HPV test

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)



### **Poděkování**

Děkuji tímto prim. MUDr. Blance Heinigeové, MUDr. Denise Veselé a vedoucí laborantce Mileně Petrové (OLM Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.), za cenné rady a podněty při zpracovávání mé odborné písemné práce. Dále děkuji Mgr. Dvořáčkové Olze za pomoc při statistické úpravě práce a v neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a trpělivost.

## Obsah

Úvod.....	13
1. Teoretická část.....	14
1.1 Lidské papilomaviry.....	14
1.1.1 Historie lidských papilomavirů.....	14
1.1.2 Struktura papilomaviru.....	15
1.1.3 Rozdělení papilomavirů.....	15
1.1.4 Přenos HPV.....	16
1.1.5 Infekční cyklus papilomavirů.....	16
1.1.6 Replikační cyklus papilomavirů.....	17
1.1.7 Imunita při infekci HPV.....	18
1.1.8 Osud papilomavirové infekce.....	19
1.2 Diagnostika papilomavirové infekce.....	20
1.2.1 Kolposkopie.....	20
1.2.2 Cytologická diagnostika.....	21
1.2.3 Histologická diagnostika.....	24
1.2.4 Sérologické metody.....	25
1.2.5 Imunohistochemické metody.....	25
1.2.6 SCCA.....	27
1.2.7 HPV test.....	27
1.3 Klinické projevy HPV infekce.....	28
1.3.1 Genitální bradavice.....	28
1.3.2 Cervikální dysplázie.....	29
1.4 Maligní epitelové nádory hrdla děložního.....	29
1.4.1 Rizikové faktory vzniku karcinomu děložního hrdla.....	29
1.4.2 Anatomie hrdla děložního.....	30
1.4.3 Histopatologická klasifikace karcinomu děložního hrdla.....	31
1.4.4 Prognóza karcinomu děložního hrdla.....	32
1.5 Léčba.....	34
1.5.1 Léčba prekanceróz.....	34
1.5.2 Léčba karcinomu děložního hrdla.....	35
1.6 Epidemiologie.....	36
1.6.1 Epidemiologická situace ve světě.....	36
1.6.2 Současná situace v ČR.....	38
1.7 Prevence karcinomu děložního hrdla.....	42

1.7.1	Primární prevence .....	42
1.7.2	Sekundární prevence .....	44
2.	Cíl práce a hypotézy .....	46
2.1	Cíl práce .....	46
2.2	Hypotézy .....	46
3.	Metodika výzkumu.....	47
3.1	HPV test .....	47
3.1.1	Odběr a uchování vzorků .....	47
3.1.2	Použití HPV testu .....	48
3.1.3	Princip metody .....	49
3.1.4	Činidla a pomůcky .....	49
3.1.5	Laboratorní materiály a pomůcky: .....	50
3.1.6	Pracovní postup.....	50
3.1.7	Interpretace výsledků .....	53
3.1.8	Systém externího hodnocení kvality .....	55
4.	Výsledky .....	56
5.	Diskuze.....	59
6.	Závěr .....	62
7.	Seznam informačních zdrojů.....	63
8.	Přílohy.....	68

### **Seznam použitých zkratek:**

CO – cut-off, hraniční hodnota  
CV – variační koeficient  
DML – Digene mikrodestičkový luminometr  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
EGW – genitální bradavice  
EHK – externí hodnocení kvality  
Gy - Gray, jednotka absorbované dávky záření  
HG – high grade, vysoký stupeň  
HIV – human imunodeficiency virus  
HPV – human papillomavirus, lidský papilomavirus  
HR – high risk, vysoké riziko  
HRC – high risk kalibrátor  
HSIL – těžké intraepiteliální léze  
HSP – protein teplotního šoku  
IL – interleukin  
INF – interferon  
KDH – karcinom děložního hrdla  
LCR – nekódující oblast papilomaviru  
LEEP – loop elektrochirurgická excize  
LG – low grade, nízký stupeň  
LR – low risk, nízké riziko  
LRC – low risk kalibrátor  
LSIL – lehké intraepiteliální léze  
MB – molekulární biologie  
ml – mililitr  
μl – mikrolitr  
NC – negativní kalibrátor  
nm – nanometr  
NRL – Národní referenční laboratoř  
pg – pikogram  
Pap – technika vyvinutá Papanicolauem  
QC – kontrola kvality  
RNA – ribonukleová kyselina  
RLU – relativní světelná jednotka  
STM – speciální transportní médium  
TNF – tumor nekrotizující faktor  
VLP - virus-like partikule

## Úvod

Lidské papilomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Infikují dlaždicové epitelu kůže a sliznic živočichů včetně člověka. Podle onkogenního potenciálu se dělí na nízkorizikové typy (low risk, LR – HPV 6, 11), způsobující genitální bradavice a vysokorizikové (high risk, HR – HPV 16, 18) spojené s vysokým rizikem výskytu rakoviny. V současné době je známo 300 genotypů papilomavirů, z nichž více než 100 infikuje člověka.

Genitální oblast infikuje asi 40 různých genotypů HPV. Infekce genitálními typy je u více než 80 % žen bez příznaků a dá se detekovat jen za použití molekulárně biologických metod. U zbývajících žen se patrné léze objeví 1-6 měsíců po infekci. Během pomnožování viru se aktivuje buňkami zprostředkovaná imunitní odpověď. Zhruba u poloviny infikovaných se v průměru po 9 měsících objeví protilátky proti proteinům virové kapsidy. Dlouho perzistující infekce HR HPV ve spojení s přítomností velkého množství viru, výrazně zvyšuje riziko vzniku prekancerózních lézí. Pravděpodobně nejdůležitější příčinou trvání virové infekce a vzniku maligních lézí je neschopnost imunitního systému se s virovou infekcí vyrovnat (Vonka, Hamšíková 2006).

Mezi nejčastější nádory děložního hrdla patří maligní epitelové nádory, z nichž dlaždicobuněčný karcinom tvoří 60-80 % všech karcinomů v této oblasti. Tento karcinom vzniká v souvislosti s HPV infekcí. 10-15 % představují adenokarcinomy různého typu a zbylou část tvoří vzácné nádory. Nejvíce nádorů vzniká v místě transformační zóny děložního hrdla. (Cibula, Petruželka et al. 2009)

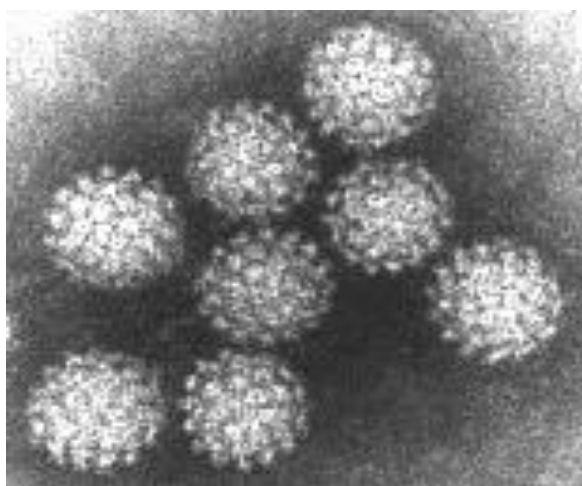
Protože u žen nad 35 let s HPV infekcí je až 400x větší riziko vzniku karcinomu děložního hrdla, snažila jsem se v mém sledovaném souboru žen tuto věkovou skupinu zviditelnit a zjistit, zda jsou příčinou cytologických změn děložního hrdla právě nebezpečné typy HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Lidské papilomaviry

### 1.1.1 Historie lidských papilomavirů

Lidské papilomaviry provázejí člověka od jeho vzniku jako živočišného druhu. Společný předek celosvětově nejrozšířenějšího typu HPV 16 se zřejmě objevil před více než 200 000 lety v Africe. Klinické projevy papilomavirové infekce, genitální bradavice, byly známy již v dobách Hippokratových (400 let př. n. l.). Jejich název – condyloma – je řeckého původu a znamená zduření okolo anu. Výskyt genitálních bradavic byl spojován se sexuální promiskuitou a homosexualitou. Až do 80. let 20. století byly tedy papilomaviry považovány za neškodné původce benigních lézí člověka. Bouřlivý výzkum začal počátkem 80. let 20. století nálezem genetické informace dvou nových HPV typů (16 a 18) v buňkách karcinomu děložního hrdla. Typy HPV16 a HPV 18 se podařily izolovat profesoru zur Hausenovi a jeho spolupracovníkům v roce 1983. Od tohoto objevu se vědecká společnost začala věnovat shromažďování důkazů o vztahu HPV a karcinomu děložního hrdla a případné přípravě vakcíny, proti vzniku KDH. Profesor zur Hausen dostal v roce 2008 Nobelovu cenu za objev HPV jako etiologického faktoru karcinomu děložního hrdla (Fait et al. 2009).



Obrázek 1: Lidský papilomavirus v elektronovém mikroskopu

Zdroj: <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html>

### 1.1.2 Struktura papilomaviru

Papilomaviry společně s polyomaviry a adenoviry tvoří skupinu nádorových virů, od roku 2000 pak samostatnou čeleď *Papillomaviridae*. Nemají lipoproteinový obal, jsou to tzv. nahé viry, což jim poskytuje větší rezistenci, ale menší antigenicitu. Dvacetistěnná kapsida papilomaviru o velikosti 55 nm, tvořená dvěma kapsidovými proteiny L1 a L2, obsahuje dvouvláknitou kruhovou molekulu DNA, tvořenou 8000 páry bází. Kromě dvou kapsidových proteinů kóduje papilomavírová DNA ještě 6 časných proteinů E1, E2, E4, E5, E6, E7, z nichž pro zvrát infikované buňky v nádorovou jsou důležité dva onkoproteiny vysokorizikových typů E6 a E7 (Fait et al. 2009). Mezi L1 a E6 leží úseky nazývané long control region (LCR), neboli nekódující oblast, kde jsou uloženy sekvence nutné pro infekční cyklus viru (Freitag 1998).

E1 - replikace

E2 - replikace a regulace transkripce

E4 - maturace virových částic

E5 - buněčná proliferace

stimulace účinků různých růstových faktorů lidského těla

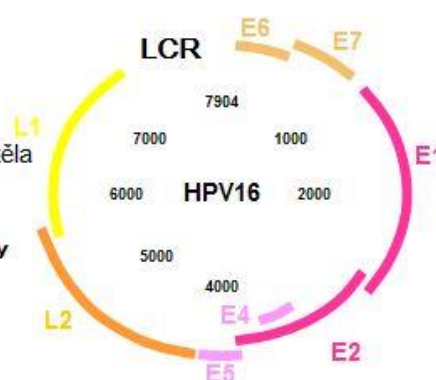
E6 - degradace genu p53

E7 - degradace pRb

} transformace nakažené buňky

L1 - hlavní bílkovina kapsidy

L2 - menší bílkovina kapsidy



Obrázek 2: Schéma vysokorizikového typu lidského papilomaviru: HPV16

Zdroj: [www.hpv16a18.cz/pro-lekare/o-hpv/](http://www.hpv16a18.cz/pro-lekare/o-hpv/)

### 1.1.3 Rozdělení papilomavirů

Papilomaviry jsou druhově specifické, nejsou přenosné na jiný živočišný druh a infikují epitelální buňky slizniční nebo kožní tkáně. Podle schopnosti vyvolat rakovinné bujení je dělíme na nízkorizikové (low-risk, LR) a vysokorizikové (high-risk, HR). V současné době známe asi 300 typů papilomavirů, z nichž zhruba 120 infikuje

člověka. Genitální oblast člověka infikuje asi 40 typů papilomavirů s různým onkogenním potenciálem (tabulka 1).

Typy papilomavirů rozlišujeme na základě sekvence genomu hlavního kapsidového proteinu L1 (Fait et al. 2009).

*Tabulka 1: Onkogenní potenciál genitálních typů papilomavirů (Fait et al. 2009)*

HR typy – vysokorizikové typy HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Pravděpodobně HR typy HPV	26, 53, 66
LR typy – nízkorizikové typy HPV	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, cand89
Typy s neurčitým rizikem	34, 57, 83

Onkogenní lidské papilomaviry jsou také spojovány se spinocelulárními karcinomy hlavy a krku. Zatímco incidence karcinomu hltanu a hrtanu klesá, je pozorován významný nárůst karcinomu orofaryngu (Wittekindt et al. 2012).

Celkem 99,7 % případů karcinomu děložního hrdla je HPV HR pozitivních. Přibližně na 70 % případů se podílí HPV HR 16 a 18. Zbytek tvoří karcinomy způsobené HPV 31, 33, 45, 52 a 58 (Cibula, Petruželka et al. 2009).

#### *1.1.4 Přenos HPV*

Lidské papilomaviry se přenášejí především pohlavním stykem. V dnešní době jsou papilomaviry nejčastější sexuálně přenosné agens. V průběhu života se až 80 % sexuálně aktivních osob setká alespoň s jedním typem HPV. Hlavně u mladých žen je většina papilomavirových infekcí klinicky zcela bezpříznaková a detekovatelná v buňkách stěru z děložního hrdla pouze metodami molekulární biologie.

#### *1.1.5 Infekční cyklus papilomavirů*

Papilomaviry se dokonale přizpůsobily jim vnímavé tkáni, dokonale rozlišují epitelální buňky. Infekční cyklus začíná navázáním infekčních virů na nezralé buňky v bazální vrstvě epitelu a jejich pohlcením. Viry do nich pronikají přes mikroskopická poranění sliznice, ale některé typy infikují buňky v místech, kde je přístup k nezralým



buňkám usnadněn, například mezi cylindrickým a dlaždicovým epitelem (děložní hrdlo, anus).

Přestože jsou papilomavirové infekce velice časté, většina z nich spontánně vymizí. Podle rozsáhlých studií lze pouze u malé části HPV DNA pozitivních žen v následných vzorcích detekovat stejný typ viru. Není ale jasné, zda se organismus zbaví viru úplně, nebo zda virus zůstává v latentní formě v bazálních buňkách. Je prokázáno, že nebezpečí vzniku cervikální neoplazie je úměrné délce infekce (počtu následujících HPV DNA pozitivních vzorků). Vysokorizikové typy zůstávají v organismu déle (průměrně 15 měsíců) než typy nízkorizikové (průměrně 11 měsíců). Doba přežívání viru v makroorganismu je závislá na síle infekce. Když je virová nálož nízká, zbaví se napadený organismus infekce rychleji (Fait et al. 2009).

#### *1.1.6 Replikační cyklus papilomavirů*

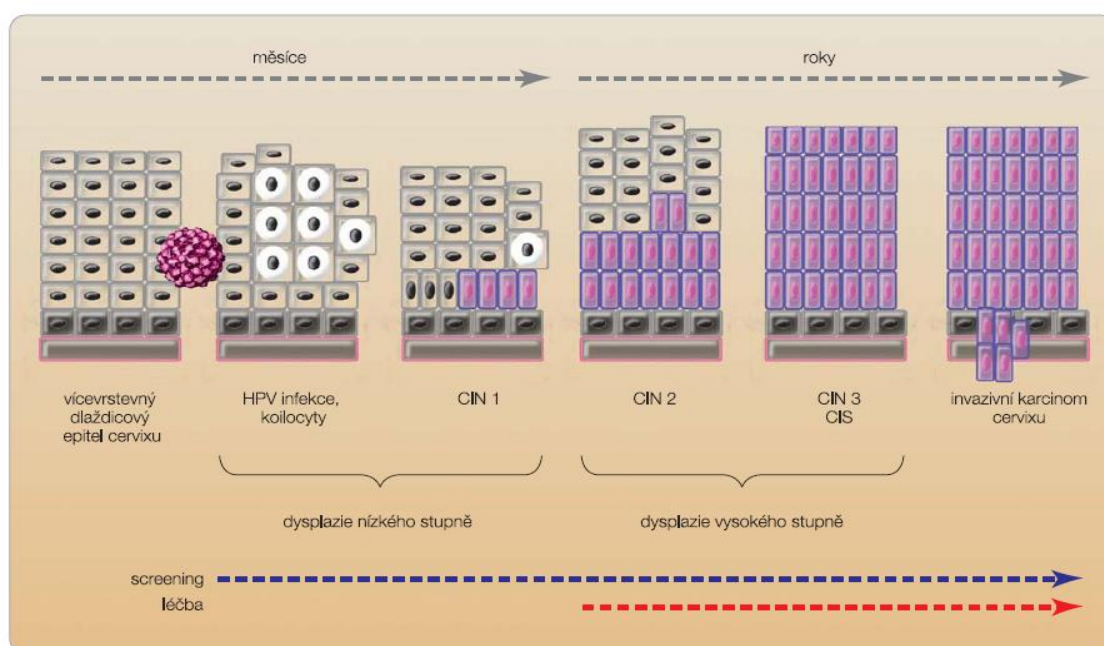
Replikační cyklus papilomaviru pak probíhá v jádře infikované buňky. Nediferencovaná buňka se dělí, což vede ke ztluštění tkáně – bradavicím. Dělení buněk je podmíněno virovými proteiny, avšak exprese proteinů je nízká a vede k úniku infekce imunologickému systému infikovaného organismu. V buňkách se sice množí virová DNA, ale počet kopií zůstává nízký. Jakmile se buňka přesune do suprabazální vrstvy, přestává se dělit a začíná proces diferenciaci. Tady se nejprve namnoží virová DNA na tisíce kopií na buňku, přestávají se tvořit časné proteiny a začínají se tvořit proteiny kapsidové.

Abnormální nálezy a lehké skvamózní intraepiteliální léze (low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) na děložním hrdle souvisí s nízkou i vysokorizikovými typy HPV. Dělicí se buňky dosahují maximálně jedné třetiny epiteliální vrstvy. V horních vrstvách jsou buňky v různém stadiu diferenciaci. Stejně jako u bezpříznakové infekce, velká část těchto nálezů regreduje a virus pravděpodobně vymizí. Latentní infekci definovanou přítomností genetické informace viru v bazálních epiteliálních buňkách nelze vyloučit.

Pokud infekce vysokorizikovými typy přetrvává dlouho, mohou se vyvinout těžké intraepiteliální léze (high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL). HSIL jsou

charakterizované replikací nezralých epiteliálních buněk v celé vrstvě epitelu, které už se dále nediferencují a jsou považovány za prekursor karcinomu děložního hrdla. Jedná se o high-grade cervikální intraepiteliální neoplazie – CIN2, CIN3 a *carcinoma in situ* – CIS (Fait et al. 2009).

Cytopatogenní efekt HPV se kromě výše uvedených buněčných změn projevuje ještě přítomností buněk s perinukleárním projasněním tzv. *koilocyty* (Cibula, Petruželka et al. 2009).



**Obr. 1** Vývoj infekce lidskými papilomaviry (human papillomavirus – HPV).

Prostřednictvím mikrotraumat proniká HPV do bazálních vrstev stratifikovaného epitelu cervixu. Prvím projevem infekce je produkce koilocytů. S persistencí infekce a postupnou integrací virové DNA do genomu buněk dochází k progresi změn až do prolomení bazální membrány a invaze nádorových buněk do stromatu cervixu. Rozvoj změn až do stadia invazivního nádoru je dlouhodobý a v optimálním případě by měl být včas odhalen ve stadiu dysplastických změn efektivně fungujícím screeningovým programem.

*koilocyty* – keratinocyty s perinukleárním halo, projev cytopatického efektu infekce HPV na dlaždicové buňky cervixu; CIN – dysplazie cervixu (cervikální intraepiteliální neoplazie); CIS – carcinoma in situ

### Obrázek 3: Vývoj infekce lidskými papilomaviry

Zdroj: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Bivalentni-vakcina-proti-infekci-lidskými-papilomaviry/6-I-is.magarticle.aspx>

#### 1.1.7 Imunita při infekci HPV

Infekční viriony se kompletují v horních vrstvách sliznice a uvolňují se z odumírajících buněk. Infekce je lokální bez virémie, je omezená na epiteliální vrstvu, není doprovázena zánětem, který by imunitní systém varoval. Inkubační doba má

rozpětí od týdnů po měsíce, přibližně stejná doba uplyne od infekce k indukci specifické imunitní reakce. Nejprve (měsíce až rok od infekce) se aktivuje buněčná část CD4+ T lymfocytů. U osob s poruchami buněčné imunity (např. pacienti po transplantacích, HIV pozitivní osoby) nacházíme zvýšenou frekvenci HPV infekcí. Protilátky proti kapsidovému proteinu L1, které zatím nejsme schopni detekovat u všech infikovaných, se objevují obvykle 8-16 měsíců po infekci, ovšem jejich hladiny jsou nízké a nejsou schopné zabránit reinfekci stejným virem. V organismu mohou přetrvávat dlouhodobě (Fait et al. 2009).

HPV unikají kontrole imunitního systému narušením signální dráhy spojené s interferony (INF), které stimulují za normálních okolností antivirovou aktivitu imunitního systému. V průběhu HPV infekce se snižuje počet Th1- lymfocytů, které produkují imunostimulační cytokiny (IL-2, TNF- $\alpha$ ). Počet Th2- lymfocytů, tvořících cytokiny tlumící imunitní odpověď (IL-10), naopak stoupá.

Klinický průběh infekce HPV je v důsledku odlišnosti imunitního systému každého jednotlivce rozdílný. Byla zkoumána souvislost HPV infekce s různými haplotypy HLA systému. Výsledky dosud publikovaných studií jsou rozporuplné z důvodu odlišné prevalence haplotypů HLA a různé prevalence infekce HPV v různých populacích. Jako rizikové haplotypy se jeví např. HLA-A2, HLA-B7, HLA-B44, HLA-DQ3, naopak haplotyp HLA DRB1\*1301 by mohl do jisté míry před HPV infekcí chránit (Laco 2012).

#### *1.1.8 Osud papilomavirové infekce*

Osud papilomavirové infekce může být trojí:

- perzistence (stálost, odolnost)
- regrese (útlum)
- progrese (šíření)

41 % všech stupňů skvamózní intraepiteliální neoplázie perzistuje, zhruba 33 % regreduje a 25 % progreduje. Z progredujících lézí se v 10 % rozvine carcinoma in situ a v 1 % invazivní karcinom děložního hrdla.

Rozhodující úlohu v regresi nálezu má buněčná imunita. Spontánní remise provázejí primární infekce, u perzistujících infekcí vzrůstá počet různých stupňů prekanceróz. K perzistenci viru přispívá snížený počet Langerhansových buněk v infikovaném epitelu, jejichž úkolem je prezentovat antigeny jiným buňkám imunitního systému.

Inkubační doba pro vznik karcinomu je odhadována na 20 a více let, u imunosuprese je kratší (Freitag 1998).

## ***1.2 Diagnostika papilomavirové infekce***

Z nepřímých metod lze papilomavirovou infekci prokázat kolposkopií a onkologickou cytologií. K určení diagnózy nám pomůže i histologický obraz a sérologické metody. Mezi přímé metody patří imunohistochemický, imunocytochemický průkaz kapsidového antigenu L1 a dnes dominující hybridizace virové DNA (Freitag 1998).

### ***1.2.1 Kolposkopie***

Kolposkopie je technika využívající přímého obrazu pomocí binokulárního zvětšovacího systému. K popisu a hodnocení kolposkopického nálezu se užívá kolposkopická nomenklatura a kolposkopické znaky. Rozšířená kolposkopie využívá ke zvýraznění změn 3% nebo 5% roztok kyseliny octové, Lugolův roztok nebo 1% roztok toluidinové modři. Sledovány jsou abnormality cévní a epitelové. Použití barevného zeleného filtru usnadňuje pozorování cévních změn. K vizualizaci cervikálního kanálu je zapotřebí vatová štětička, střední zahnutý peán nebo Koganova zrcadla (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Úloha kolposkopického vyšetření děložního hrdla:

- Zhodnocení léze.
- Odhad stupně závažnosti léze.
- Posouzení velikosti léze.
- Určení suspektních míst k odběru biopsie (Turyna, Sláma et al. 2010).

Kolposkopická klasifikace:

Normální nálezy – originální dlaždicový epitel, cylindrický epitel, transformační zóna.

Abnormální nálezy – plochý, sněhově bílý acetopozitivní epitel, sytý bílý acetopozitivní epitel nerovného povrchu, jemná mozaika, hrubá mozaika, jemné nebo hrubé puntíčkování, částečně jódpozitivní světle žlutá zóna, jódnegativní sytě žlutá zóna, atypické cévy.

Nedostatečné kolposkopické nálezy – těžký zánět, atrofie, poranění, děložní hrdlo není viditelné.

Různé změny – kondylomata, keratóza, eroze, zánět atrofie, polypy (Cibula, Petruželka et al. 2009).

### *1.2.2 Cytologická diagnostika*

Stěr z děložního hrdla pro onkologickou cytologii je metoda vyvinutá Papanicolauem v první polovině 20. století. Je základem většiny screeningových testů, které mají identifikovat přednádorové stavy a umožnit tak včasné sledování nebo léčbu s dobrou prognózou (Fait et al. 2009). Nejnovější komplexní hodnocení nátěru je systém hodnocení Bethesda, který rozlišuje: nízký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze (low-grade SIL) a vysoký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze (high-grade SIL) (Freitag 1998).

Bethesda systém hodnocení: v roce 1988 se v Bethesdě (Maryland) sešli významní cytologové a odborníci v gynekologické praxi, aby vypracovali systém hodnocení cervikovaginálních stěrů do všech detailů. Je zde kladen důraz především na dokonalé vyplnění průvodky k cytologickému stěru, které usnadní cytologovi rozhodování. Cytologický závěr musí být přesný a umožní odpovídající péči o pacientku (Kobilková et al. 2006).

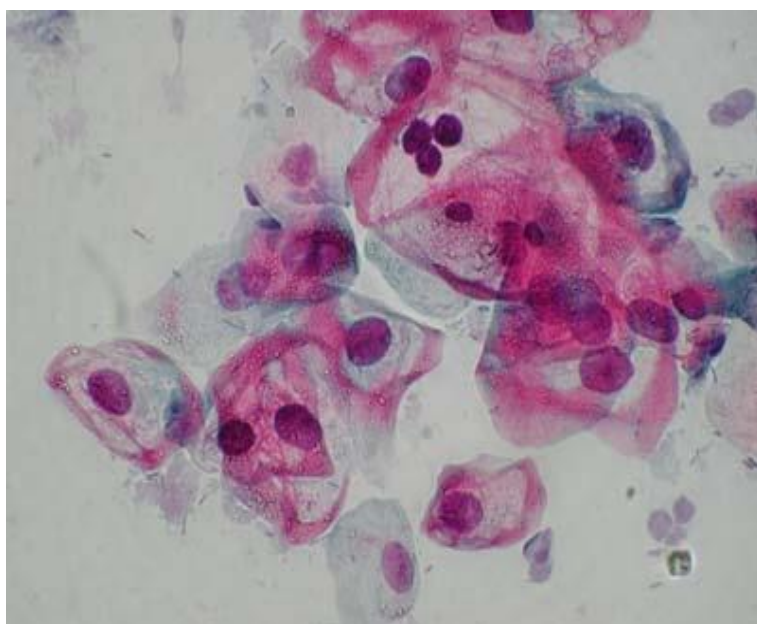
Cytologická diagnostika se zakládá na hodnocení dlaždicových, cylindrických a žlázových buněk. Hodnotí se shluky buněk, struktura jader, buněčná cytoplazma a pozadí preparátu. Cytolog rozliší benigní změny buněk a abnormální změny dlaždicového a žlázového epitelu. Dále se cytolog slovně vyjádří ke kvalitě preparátu, k úrovni proliferace dlaždicových epitelů, k přítomnosti zánětlivých elementů

a k mikrobiálnímu pozadí. Na závěr cytolog přidá diagnostický souhrn nejvýznamnějších změn a doporučí další diagnostiku nebo interval dalšího cytologického odběru (Roztočil et al. 2011).

V cytologii je specifickým projevem HPV infekce vznik koilocytu a dyskeratocytu.

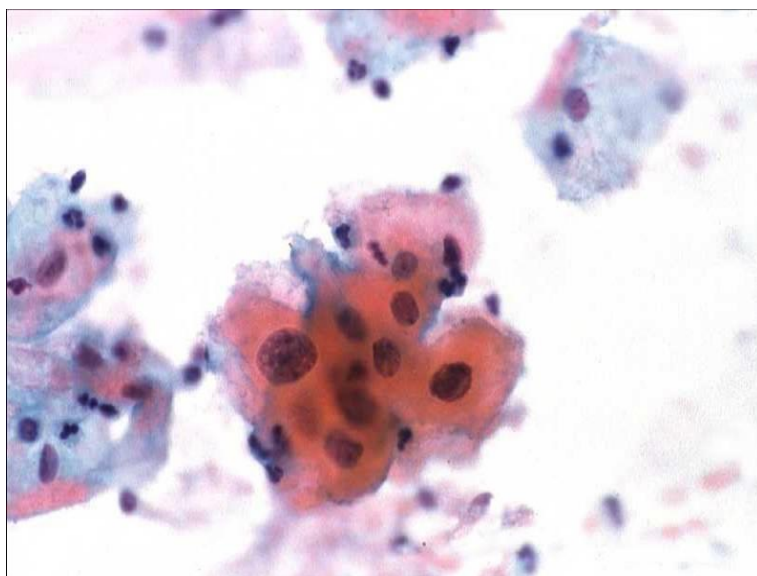
Koilocyt je buňka s větším, hyperchromním měchýřkovitým jádrem obklopeným vakuolizací cytoplazmy, tzv. perinukleárním haló (obrázek 4). V jádře bývají eosinofilní inkluze, cytoplazma má většinou červenofialové zbarvení.

Dyskeratocyt je malá keratinizovaná buňka s hyperchromním jádrem a žlutou nebo oranžovou cytoplasmou (obrázek 5). Dyskeratocyt je často přítomný ve shlucích (Freitag 1998).



*Obrázek 4:* Typické koilocyty

Zdroj: <http://www.cervix.sk/cytologia/obr-LSIL.php>



Obrázek 5: Keratocyty

Zdroj: <http://www.eurocytology.eu/static/eurocytology/pol/cervical/mod5img21.html>

Mezi abnormální změny dlaždicového epitelu patří:

- *low grade SIL* – nízký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze, jedná se o prekancerózu lehkého stupně. Buňky mají 3-6krát větší jádra na úkor cytoplazmy. Obraz odpovídá histologickému obrazu CIN1.
- *high grade SIL* – vysoký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze, je již těžší stupeň prekancerózy. Objevuje se vysoký poměr jádra vzhledem k cytoplazmě, variabilita a větší barvitelnost jader, degenerace jádra. Cytologické stěry obsahují velké množství buněk, odloučené buňky jsou nahrazovány jinými. Cytolog doporučuje ověřit nález histologicky. Obraz odpovídá histologickému obrazu CIN2 a CIN3.
- *invazivní karcinom dlaždicového epitelu děložního čípku* – ke změnám buněčného jádra a jeho membrány se přidávají změny na buněčném pozadí. Mezi buňkami jsou leukocyty a erytrocyty. Cytologická kritéria jsou: změny na buňkách jako u *high grade SIL*, nádorové pozadí charakterizující invazi, nejasné hranice cytoplazmy, shluky buněk – clustery (Roztočil et al. 2011).

Efektivita screeningu pomocí stěru onkologické cytologie se pohybuje kolem 60 %, je ovlivněna intervalem mezi jednotlivými odběry, kvalitou cytologických laboratoří

a pokrytím populace. Nevýhodou je vysoká falešná negativita výsledků vyšetřovaných pacientů s buněčnými abnormalitami cervikálního a análního kanálu (Fait et al. 2009).

### 1.2.3 Histologická diagnostika

Histologická diagnostika informuje o stavbě tkání, buněk a principech jejich uspořádání. K rozvoji této diagnostiky výraznou měrou přispěly histochemické, imunocytochemické, imunohistochemické a hybridizační metody. Zásadní zlom v 70. letech minulého století přinesla hybridomová konstrukce monoklonálních protilátek (1984 Nobelova cena pro Köhlera a Milsteina), umožňující imunolokalizaci epitopů sledovaných antigenů (Vajner et al. 2010).

V nejasných případech lze v diagnóze cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) použít imunohistochemické metody. Vyšetřuje se marker buněčné proliferace – protein Ki-67, pomocí kombinace protilátek. Protein p16 je inhibitor cyklin dependentní kinázy a je průkazný v buňkách infikovaných high risk genotypy (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Na histologické úrovni je cervikální intraepiteliální neoplazie – CIN, charakterizována poruchou maturace s rozšířením bazální epiteliální zóny a jadernými abnormalitami. Jedná se o jaderné pleomorfie, hyperchromazie, nepravidelnosti jaderné membrány a o atypické mitózy. Histologicky rozlišujeme tři stupně:

- CIN1: mírná dysplazie
- CIN2: střední dysplazie
- CIN3: těžká dysplazie a carcinoma *in situ*

CIN1 je charakterizována přítomností změn v dolní 1/3 epitelu, kde jsou poruchy maturace s jadernými atypii a zvýšenou mitotickou aktivitou. V horních 2/3 epitelu nacházíme četné koilocyty a mírné jaderné atypie.

CIN2 je na histologické úrovni charakterizována maturací horní 1/3 epitelu. V dolních 2/3 jsou poruchy maturace s buňkami s jadernými atypii, četnějšími (atypickými) mitózami a zvětšeným nukleocytoplazmatickým poměrem.

CIN3 zahrnuje i carcinoma *in situ* (výrazná porucha maturace s jadernými poruchami těžkého stupně). Histologicky jsou u CIN3 známky poruchy maturace



v celém epitelu nebo je maturace jen ve vrchních vrstvách. Jsou zde výrazné jaderné atypie s četnými a atypickými mitózami (Cibula, Petruželka et al. 2009).

#### 1.2.4 Sérologické metody

Sérologické metody patří k nepřímým metodám. Využívá se zde detekce neutralizačních protilátek, které vykazují částečnou typovou specifitu. Určité obtíže však představuje příprava antigenů a interpretace nálezů. Pozitivní titry protilátek ukazují na dříve prodělanou HPV infekci, negativní protilátky infekci nevyklučují. Protilátky nejsou zřejmě celoživotní. Pokrok lze očekávat od syntézy virus-like partikulí (VLP) a jejich využití jako antigenů pro sérologické metody. Protilátky proti E6 a E7 proteinům HPV 16 by mohly být nadějnými ukazateli cervikálního karcinomu (Freitag 1998).

Epidemiologické studie vysoce séropozitivních žen anti-HPV 16/18 (po přirozené infekci) vykazují snížené riziko HPV 16 a HPV 18 infekce u těchto žen (Safaeian et al. 2010).

#### 1.2.5 Imunohistochemické metody

Imunohistochemická vyšetření sledují telomerázové aktivity a detekují proteiny (p16, Ki-67, buněčné onkogeny MYC, cykliny, survivin, laminin 3) pomocí specifických protilátek (Halada, Špaček 2011).

#### **Markery proliferace:**

*Ki67* je protein, který je silně exprimován u CIN jako následek zvýšené proliferace epitelových buněk. Má význam pro odlišení normálních a LG lézí.

*MYC* je buněčný onkogen, jehož hladiny stoupají v závislosti na stupni CIN, zvýšená exprese je u KDH.

*Cykliny* jsou nalézány u všech stupňů CIN ve vyšších hladinách.

*Telomerázová aktivita* je zvýšená u HG prekanceróz.

Aktivita *komplexu replikačních proteinů MCM5 a CDC6* je prokázána u dysplastických změn.

### **Markery jaderných abnormalit:**

*Aneuploidita* (zvýšení nebo snížení počtu chromosomů) zjištěna ve spojitosti s pokročilým stadiem dysplastických změn.

*Chromosomální dysbalance*, nejdůležitější je získání chromosomu 3q, který má spojitost s progresí CIN 3 do invazivního karcinomu.

### **Jiné buněčné markery:**

Chybění *p53* a *pRB* je nespecifickou změnou řady malignit.

*Proteiny teplotního šoku* (*heat shock proteins – HSP*), zvýšená exprese HSP 40, HSP 60, HSP 70 byla popsána v souvislosti s narůstajícím stupněm CIN.

*Survivin* je časným ukazatelem karcinogeneze a jeho hladina je přímo úměrná závažnosti CIN.

*Metylace* je modifikace genové exprese, která vede k inaktivaci tumor supresorových genů u KDH.

*CA9/MN antigen* je transmembránový protein, který se tvoří při nižší tenzi kyslíku a je prokazován u všech stupňů CIN (v přítomnosti atypických buněk).

*p16* je tumor supresorový inhibitor kináz, který je zvýšeně exprimován v návaznosti na deregulovanou produkci papilomavirového onkoproteinu E7. Průkaz p16 je patrný u všech CIN 3, většiny CIN 2 a jen malé části CIN 1. Pro vyšetření p16 jsou aktuálně dostupné ELISA testy, které poskytují jednoznačné výsledky. Výhodou je vysoký potenciál k automatizaci.

*ProEx C* je skupina monoklonálních protilátek proti proteinům asociovaným s indukcí S fáze buněčného cyklu (topoizomeráza IIA). Stanovení ve studiích vykazuje vyšší prediktivní hodnotu pro průkaz CIN 3 než p16 (Turyna, Sláma et al. 2010).

Podle studie z Ostravské univerzity síla exprese proteinu p16 koreluje se stupněm dysplazie a detekce proteinu p53 se projevuje jako statisticky nevýznamná. Imunohistochemická vyšetření proliferčních markerů a p16 mohou upřesnit diagnostiku prekurzorových lézí. Vyšetření alespoň jednoho z proliferčních markerů a proteinu p16 může přispět k diagnostice drobných biopsií a především k hodnocení resekcčních okrajů konizátů, které mohou být obtížně hodnotitelné v základním histologickém barvení (Vaculová et al. 2007).

V další studii z roku 2014 se porovnávaly výsledky biomarkerů p16/Ki-67 s HPV testováním u žen s abnormálními cytologickými stěry. Výsledky hovoří o srovnatelné citlivosti obou testování, avšak vyšetření biomarkerů ukazuje na překvapivě výrazně lepší specifitu. Citlivost/specifita p16/Ki-67 byla 96,43 % / 60,92 %, high risk HPV 89,29 % / 14,94 %. Dále studie uvádí, že třídění CIN lézí pomocí biomarkerů přináší v testovaném souboru (515 žen) finanční úsporu 46 000 dolarů (Killeen et al. 2014).

#### 1.2.6 SCCA

Tumor marker SCCA (Squamous Cell Carcinoma Antigen) má prognostický význam u pacientek s operabilními stadii dlaždicobuněčného karcinomu děložního hrdla se zaměřením na nádorovou lymfadenopatii a recidivu základního onemocnění. SCCA je senzitivní marker recidivy onemocnění u pacientek s elevací markeru před primární operací. Nejčastěji recidivy manifestují po ukončení primární terapie během následujících dvou let. Sérová pozitivita markeru se vyskytuje u 80 % recidiv (Minář, Weinberger 2011).

#### 1.2.7 HPV test

V současné době je pro detekci HPV k dispozici řada metod, které lze rozdělit do dvou hlavních skupin: metody amplifikující cíl a metody amplifikující signál. Principem metod amplifikující cíl je nejprve namnožení virových nukleových kyselin, které jsou následně analyzovány a detekovány. K amplifikaci (namnožení) virové DNA se nejčastěji používá PCR (polymerázová řetězová reakce), k amplifikaci mRNA se používá PCR s reverzní transkriptázou (RT-PCR) nebo NASBA – metoda probíhající při konstantní teplotě (Laco 2012).

V lednu roku 2009 byl na evropský trh uveden test pro detekci vysoce rizikových HPV genotypů: Abott RealTime High Risk HPV test. Principem testu je polymerázová řetězová reakce (PCR) a test je určen k detekci HPV 16 a HPV 18 odděleně a dalších 12 HPV genotypů. Test se používá pro ověření stupně prekancerózy a v primárním screeningu KDH u žen starších 30 let (Poljak 2013).

Základním principem metod amplifikujících signál je hybridizace specifické sondy s virovou DNA, ať už v tekuté formě nebo tkáni (Laco 2012). Test je založen na přímé

hybridizaci se signálním amplifikačním krokem, při kterém je specifická HPV RNA proba hybridizována k HPV DNA a následně detekována protilátkami specifickými pro vytvořené hybridy RNA-DNA. HPV test je přínosný k hodnocení perzistence HPV infekce nebo reinfekce po zákroku na děložním hrdle. Detekce DNA HPV je v současnosti nejvíce používaným biomarkerem (Turyna, Sláma et al. 2010).

Zjistilo se také, že HPV testování párových vzorků moče by mohlo být užitečné pro screening cervikálních lézí (Ducancelle et al. 2014).

Studie z roku 2000 obsahuje srovnání detekce HPV (pomocí hybridizace in situ) a imunohistochemického průkazu papilomavirového proteinu E6. Výsledkem studie je, že imunohistologický průkaz proteinu E6 typů HPV 16 a HPV 18 je schůdný a vysoce specifický s použitou protilátkou. Senzitivita je však nízká a je nutné použít metodu s amplifikací signálu biotinylovaným tyramidem. Test je i přesto zajímavé použít jako částečnou náhradu náročných hybridizačních technik nebo jako prognostický ukazatel reakce nádoru na radioterpii a chemoterapii (Anton et al. 2000).

### ***1.3 Klinické projevy HPV infekce***

Klinické projevy HPV infekce můžeme rozdělit do tří skupin: latentní, subklinickou (subklinická papilomavirová infekce – SPI) a klinickou (manifestní) formu. Latentní formu prokážeme jen HPV testem, popřípadě průkazem protilátek proti lidskému papilomaviru. Subklinická převažující forma má projevy, které zjišťujeme kolposkopickým, cytologickým a histologickým vyšetřením.

#### ***1.3.1 Genitální bradavice***

Klinická manifestní forma HPV infekce (HPV 6, HPV 11) se projevuje zevními genitálními bradavicemi (external genital warts – EGW, u nás souborně nazývány kondylomata zevního genitálu) a maligními lézemi. Americká lékařská asociace rozdělila kondylomata na 4 typy: kondylomata accuminata, hladké papulární bradavice, keratotické bradavice, ploché bradavice.

Nejběžnějšími lokalizacemi bradavičnatých afekcí jsou kromě vulvy – vagina, děložní čípek, urethra, perianální oblast a anus. Špičaté a papilární kondylomata vulvy

se objevují solitárně i v trsech. Mají prstíkovitý vzhled a vrchol kopulovitého tvaru. Na test s kyselinou octovou reagují kondylomata zbledlím.

HPV typy 40, 42 a 43 jsou považovány za původce genitálních bradavic v menší míře.

Jediný maligní nádor, u kterého jsou téměř výhradně prokázány nízkorizikové (low-risk) typy HPV 6 a HPV 11 je Buschke-Löwensteinův tumor. Tento nádor může předcházet verukóznímu dlaždicobuněčnému karcinomu (Freitag 1998).

### *1.3.2 Cervikální dysplázie*

Klinický obraz cervikálních dysplazií bývá nenápadný. Projevuje se vodnatým zakrvavělým výtokem a krvácením po styku. Známkou pokročilého stadia onemocnění bývá bolest v malé pánvi, bolest v bedrech, měsnání moči v ledvinách v důsledku obstrukce ureterů, lymfedém dolních končetin.

K růstu karcinomu děložního hrdla dochází buď na povrchu čípku (exocervikální forma – častější) nebo v cervikálním kanále (endocervikální forma). Na povrchu čípku se tvoří křehké květákovité formy (směrem do pochvy), které při kontaktu krvácejí. Endocervikální forma roste dlouho bez příznaků, má invazivní charakter růstu.

Šíření karcinomu je kontinuální, postihuje parametrium (závěsný aparát dělohy), vaginální epitel, myometrium (střední vrstva) hrdla a těla děložního, lymfatické uzliny a okolní tkáň (Roztočil et al. 2011).

## **1.4 Maligní epitelové nádory hrdla děložního**

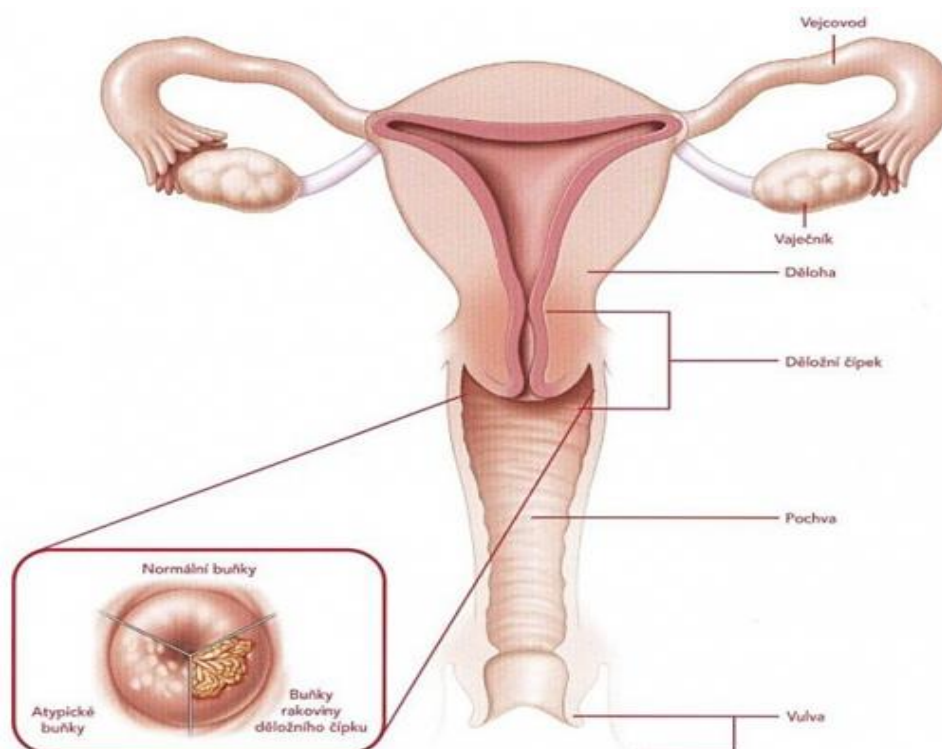
### *1.4.1 Rizikové faktory vzniku karcinomu děložního hrdla*

Mezi nejznámější rizikové faktory vzniku KDH patří:

- perzistující infekce HR HPV, jde o faktor etiopatogenetický,
- časná koitarche, rozumí se jí zahájení sexuálního života před 16. rokem věku,
- vyšší počet sexuálních partnerů, 10 a více partnerů: 2-3x vyšší riziko,
- promiskuitní mužský partner, anamnéza sexuálně přenosné nemoci,
- kouření včetně pasivního, porucha lokální imunity, platí pro spinocelulární karcinom,
- multiparita, vyšší riziko od 3 a více porodů,

- nízký věk prvního porodu,
- nízké socioekonomické postavení,
- HIV pozitivita, imunodeficience, imunosuprese,
- hormonální kontracepce, působí rizikově při současném vlivu dalších faktorů: HR HPV pozitivita, imunosuprese,
- další sexuálně přenosné infekce: chlamydie, herpes virus-2,
- dieta s nedostatkem betakarotenu a vitamínu C,
- rodinná anamnéza, při onemocnění matky či sestry,
- některé alely a haplotypy HLA systému,
- absence cytologického screeningu tj. sekundární prevence KDH (Cibula, Petruželka et al. 2009).

#### 1.4.2 Anatomie hrdla děložního



Obrázek 6: Anatomie ženského reprodukčního systému – lokalizace děložního čípku a znázornění jeho změn v důsledku KDH

Zdroj: <http://www.vecverejna-cz.eu/cs/o-rakovine-delozniho-cipku>

Hrdlo děložní (*cervix uteri*) je dolní část dělohy válcovitého tvaru. Délka děložního hrdla je průměrně 30-35 mm. Čípek děložní je část hrdla vyčnívající do pochvy, má přední a zadní pysk také označován jako ektocervix a exocervix. Trubicový kanál hrdla děložního má slizniční řasy uspořádané do tvaru palmových listů (Turyna, Sláma et al. 2010).

#### 1.4.3 Histopatologická klasifikace karcinomu děložního hrdla

Vznik karcinomu děložního hrdla je vícestupňový, komplexní proces. Vysokorizikové typy 16 a 18 mohou navodit nádorovou transformaci a klonální proliferaci buněk vedoucích ke vzniku karcinomu (Roztočil et al. 2011).

Nejčastějším maligním epitelovým nádorem hrdla děložního je *dlaždicobuněčný karcinom*. Představuje 60-80 % všech karcinomů v této oblasti. Dlaždicobuněčný karcinom etiologicky souvisí s HPV infekcí. Vzniká z prekursorových lézí, tj. high-grade cervikální intraepiteliální neoplazie – CIN2, CIN3 a *carcinoma in situ*.

Invazivní dlaždicobuněčný karcinom rozdělujeme na několik histologických typů. Nejběžnější rozlišení je na rohovějící a nerohovějící dlaždicobuněčný karcinom. Méně časté varianty bazaloidní, verukózní, kondylomatózní, papilární, lymphoepitheliomalike, skvamotranzicionální mají také prognostický význam.

*Rohovějící dlaždicobuněčný karcinom* je tvořen dlaždicovými různě diferencovanými buňkami s patrnými mezibuněčnými můstky a v cytoplazmě s keratohyalinními granuly. Typická je přítomnost tzv. keratinových perel, tj. vírovitě uspořádaných buněk s centrálně uloženým keratinem.

*Nerohovějící dlaždicobuněčný karcinom* je tvořen nádorovými buňkami podobného charakteru jako rohovějící karcinom, avšak nejsou přítomny buňky vzhledu keratinových perel.

U *bazaloidního dlaždicobuněčného karcinomu* se jedná o agresivní typ nádoru se špatnou prognózou. Histologicky je tvořen menšími nezralými buňkami s malým množstvím cytoplazmy s velkým nukleocytoplazmatickým poměrem.

*Verukózní dlaždicobuněčný karcinom* je dobře diferencovaný karcinom verukózního uspořádání, charakterizovaný expanzivním nikoliv infiltrativním růstem. Je zde

typická akantóza, hyperkeratóza a minimální přítomnost jaderných atypií a mitóz. Nádor nemetastazuje, ale může lokálně recidivovat. Tento nádor má prognózu velmi dobrou.

*Kondylomatózní dlaždicobuněčný karcinom* je charakterizován verukózním uspořádáním a perinukleárním projasněním buněk, připomínající koilocyty při HPV infekci. Jaderné atypie jsou v bazálních vrstvách. V oblasti spodiny nádoru jsou místa s tvorbou malých hnízd nádorových buněk s dyskeratózou a keratinizací.

*Papilární dlaždicobuněčný karcinom* je tvořen papilami krytými epitelem s rysy CIN. Nádorové buňky mají typická oválná hyperchromatická jádra s četnými mitózami a malé množství cytoplazmy. V nádoru je prokazatelná infekce HPV16.

*Lymphoepithelioma-like dlaždicobuněčný karcinom* se syncytiálními formacemi, což jsou skupiny buněk s neohrazenými okraji. Buňky mají vezikulární jádra s jádérky a eozinofilní cytoplazmu. Typickým nálezem je zánětlivá celulizace ve stromatu s převahou T lymfocytů.

*Skvamotranzicionální karcinom* je papilárně uspořádaný nádor, charakteristický přechodnými buňkami a může obsahovat i ložiska s dlaždicobuněčnou diferenciací. V nádoru je též prokazatelná infekce HPV16 (Cibula, Petruželka et al. 2009).

#### 1.4.4 Prognóza karcinomu děložního hrdla

Nejdůležitějším prognostickým faktorem je určení rozsahu nádoru (vyjádřený stagingem). Do stagingu není však plně zahrnuta velikost primárního nádoru a hloubka stromální invaze. Rovněž zde není zahrnuta extenze nádoru do děložního těla. Mezi další faktory patří postižení regionálních lymfatických uzlin (počet postižených uzlin, rozsah metastáz). Závažné je i postižení paraaortálních uzlin. Dalším důležitým faktorem je parametriální invaze na poševní stěnu (Cibula, Petruželka et al. 2009).



Tabulka 2: TNM a FIGO Klasifikace karcinomu děložního hrdla (Roztočil et al. 2011)

TNM		FIGO
Tis	Karcinom in situ	–
T1	Nádor je omezen na děložní hrdlo	I
T1a	Mikroinvazivní karcinom	IA
T1a1	Hloubka invaze < 3mm, horizontálně < 7 mm	IA1
T1a2	Hloubka invaze > 3mm a < 5 mm, horizontálně < 7 mm	IA2
T1b	Klinicky viditelná léze nebo léze větší než IA2	IB
T1b1	Klinicky viditelná léze < 4 cm	IB1
T1b2	Klinicky viditelná léze > 4 cm	IB2
T2	Nádor se šíří mimo cervix, ale nedosahuje k pánevní stěně a nešíří se do distální třetiny pochvy	II
T2a1	Nádor se šíří na proximální dvě třetiny pochvy – klinicky viditelná léze < 4 cm	IIA1
T2a2	Nádor se šíří na proximální dvě třetiny pochvy – klinicky viditelná léze > 4 cm	IIA2
T2b	Nádor se šíří do parametria, ale nedosahuje pánevní stěny	IIB
T3	Nádor se šíří k pánevní stěně a/nebo postihuje distální třetinu pochvy a/nebo způsobuje hydronefrózu nebo afunkční ledvinu	III
T3a	Nádor se šíří na distální třetinu pochvy, nedosahuje k pánevní stěně	IIIA
T3b	Nádor se šíří k pánevní stěně a/nebo způsobuje hydronefrózu nebo afunkční ledvinu	IIIB
T4	Šíření na sliznici močového měchýře nebo sliznici rekta nebo mimo malou pánev	IVA
N1	Postižení regionálních lymfatických uzlin	IIIB
M1	Vzdálené metastázy	IVB

Tabulka 3: 5leté přežití podle Annual report podle FIGO stadií (Freitag 2001):

IA1	95,1 %
IA2	94,9 %
IB	80,1 %
IIA	66,3%
IIB	63,5 %
IIIA	33,3 %
IIIB	38,7 %
IVA	17,1 %
IVB	9,4 %

Negativním prognostickým faktorem je invaze do lymfatických a krevních cév. Vzácné a nepříznivé je intraperitoneální šíření karcinomu.

U časných stádií je za předléčebný prognostický faktor považována hodnota SCCA markeru.

HIV pozitivita a imunosupresivní onemocnění nepochybně prognózu zhoršují.

Stále více se budou uplatňovat jako prognostické faktory molekulárněbiologické a molekulárněgenetické hodnoty (c-myc onkogen, mutace supresorového genu p53, cyklooxygenáza-2, DNA ploidy aj.).

Prognózu významně ovlivňují léčebné faktory – adekvátní radikální operační výkon nebo optimální radioterapie (Cibula, Petruželka et al. 2009).

## **1.5 Léčba**

### **1.5.1 Léčba prekanceróz**

Léčba prekanceróz děložního hrdla závisí na rozsahu, lokalizaci léze, na vzdálenosti od cervikálního kanálu a na histopatologickém nálezu.

Pro CIN II a CIN III se doporučuje neodkladně přistoupit k léčebnému zákroku.

CIN I se po určitou dobu sleduje, ale perzistence více než 1 rok vede k indikaci operačního zákroku.

U glandulárních lézí se indikuje konizace studeným nožem.

Léčba prekanceróz může být destrukční či ablativní. Destrukční techniky představuje kryoterapie a laserová valorizace děložního hrdla. Před tímto výkonem je nutné znát výsledek předchozí biopsie, resp. histopatologický nález.

Excizní metody představují elektrochirurgické metody, laserová konizace a konizace studeným nožem. Výkony, které zasahují do endocervikálních lézí, jsou doplněny endocervikální kyretáží (Roztočil et al. 2011).

Loop elektrochirurgická excize (LEEP) je převládající léčba cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN 2, CIN 3) ve Spojených státech. Ženy, které měly po LEEP pozitivní výsledek HPV testu (zejména HPV 16), měly vysoké riziko následné CIN 2, CIN 3. HPV detekce samostatná nebo v kombinaci s cytologií tak může být užitečná ve strategii postupů po LEEP (Kreimer et al. 2006).

### *1.5.2 Léčba karcinomu děložního hrdla*

Léčba karcinomu děložního hrdla zahrnuje tři léčebné postupy – samostatně nebo kombinovaně: operační léčbu, radioterapii a chemoterapii.

Operační léčbu volí lékař dle rozsahu onemocnění a dle přání nemocné zachovat fertilitu. Pacientky se v celkově dobrém stavu s KDH (v časném stadiu) operují. Výhodou je zachování funkce vaječnicků, pacientka je bez nepříznivých účinků radioterapie a lze získat přesné informace o rozsahu onemocnění na základě histopatologického vyšetření.

Výhodou radioterapie je léčebný efekt i u pokročilého cervikálního karcinomu. Zde je již technicky nemožné radikálně operovat. Operační léčba a radioterapie zvyšuje četnost komplikací a vedlejších účinků radioterapie.

Kurativní radioterapie kombinuje zevní ozařování malé pánve do výše obratle L4/5 (v případě postižení uzlin i výše) s brachyradioterapií (vnitřní ozáření). Dávka z brachyradioterapie je aplikována pomocí tříkanálových aplikátorů (Fletcherův a Heschkeho), které mají dva kanály v poševních klenbách a jeden v děloze. Aplikátor

se zavádí v celkové anestezii. V poslední době se v brachyradioterapii začíná prosazovat 3D plánování pomocí počítačové tomografie.

Při paliativní radioterapii se provádějí většinou zkrácené režimy s cílem ulevit od potíží, nejčastěji od krvácení. U pokročilých stádií karcinomu lze pacientkám podat na oblast pánve i jednorázovou dávku 8-10 Gy.

Chemoterapie se užívá v rámci primární chemoradioterapie. Podává se jednou týdně a používaným cytostatikem je cisplatina. V léčbě recidiv a metastáz lze použít i kombinovanou chemoterapii: cisplatina a ifosfamid (Roztočil et al. 2011).

Léčba pokročilého nádoru jakékoliv lokalizace je po vyčerpání lokální léčby vždy paliativním postupem. V tomto kroku jsou zkoumána různá léčebná schémata u všech nádorových lokalit a za pokrok je považován významný rozdíl v míře léčebné odpovědi. Většinou tento rozdíl však nemá vliv na délce přežívání nemocných.

Postavení kombinace cisplatina a topotekan v léčbě pokročilého, perzistujícího karcinomu hrdla děložního je zcela jiné. Jedná se o účinnou léčebnou kombinaci se zvládnutelnou toxicitou (i u nemocných předléčených jak radioterapií, tak chemoterapií), která jako vůbec první dokázala prodloužit život nemocných s KDH ve srovnání se standardní platinovou chemoterapií (Fínek 2008), graf 1 v příloze 1.

## **1.6 Epidemiologie**

Genitální typy HPV se šíří především pohlavním stykem, ale nelze vyloučit ani přenos z matky na novorozence. Ve vyspělých zemích jsou papilomaviry nejčastějším přenosným virovým agens. 80 % sexuálně aktivních osob je v průběhu života nakaženo alespoň jedním typem HPV (Hamšíková 2007).

### *1.6.1 Epidemiologická situace ve světě*

Karcinom děložního hrdla je světově druhým nejčastějším zhoubným nádorem. V Evropě je ročně kolem 34 000 nových případů karcinomu děložního hrdla a více než 16 000 úmrtí na toto onemocnění (Halada, Špaček 2011).

Ročně je celosvětově postiženo karcinomem hrdla děložního na 530 000 žen, kolem 275 000 žen na toto onemocnění umírá; zhruba 88 % všech případů připadá na rozvojové země.

Epidemiologický obraz KDH ve světě je skutečně viditelně ovlivněn nasazením screeningu v konkrétních zemích, tabulka 4 (obrázek 7, obrázek 8 v příloze 2). V rozvojových zemích, kde plošné programy prevence neexistují, nacházíme velmi vysoké hodnoty incidence (výskytu nově hlášených případů za určité časové období) i mortality (úmrtnosti). Naopak země s fungujícím screeningem (např. Finsko, Lucembursko, USA, Francie) vykazují incidenci pod 10/100 000 žen. Česká republika bohužel stále patří mezi státy s nedostatečně funkčním screeningovým programem. Podobně je na tom v Evropě například Slovensko nebo Polsko (Dušek et al. 2012).

*Tabulka 4: Epidemiologie karcinomu děložního hrdla v mezinárodním měřítku.*

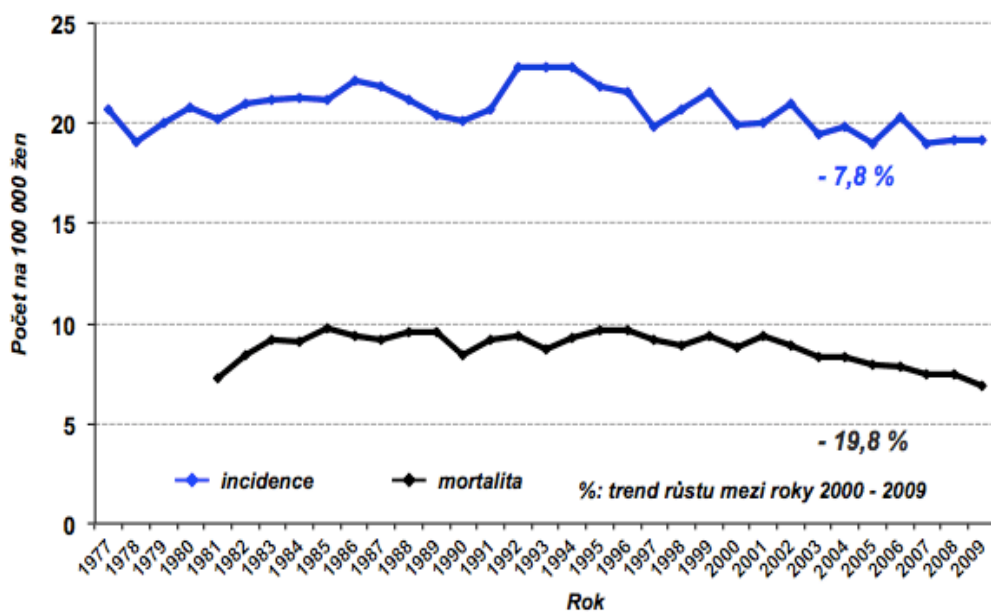
<b>Mezinárodní srovnání – incidence</b>
Nejvyšší incidence celosvětově – ASR (World) > 50/100 000 žen: Guinea, Zambie, Komory, Tanzanie, Malawi, Mosambik, Svazijsko
Nejvyšší incidence v Evropě – ASR (World) > 18/100 000 žen: Rumunsko, Makedonie, Bulharsko, Litva, Srbsko
Nejnižší incidence v Evropě – ASR (World) < 10/100 000 žen: Malta, Švýcarsko, Řecko, Finsko, Kypr, Rakousko, Španělsko, Lucembursko, Itálie, Nizozemsko, Německo, Francie, Albánie, Velká Británie, Švédsko, Belgie, Island, Bosna a Hercegovina, Norsko
<b>Pozice ČR ve světě / v Evropě – 106. / 11.</b>

<b>Mezinárodní srovnání – mortalita</b>
Nejvyšší mortalita celosvětově – ASR (World) > 30/100 000 žen: Guinea, Komory, Zambie, Malawi, Tanzanie, Burundi, Uganda, Mosambik, Zimbabwe, Sierra Leone, Svazijsko, Libérie
Nejvyšší mortalita v Evropě – ASR (World) > 6,0/100 000 žen: Rumunsko, Makedonie, Srbsko, Litva, Moldavsko, Lotyšsko, Bulharsko, Estonsko
Nejnižší mortalita v Evropě – ASR (World) < 3/100 000 žen: Island, Švýcarsko, Finsko, Itálie, Řecko, Kypr, Francie, Švédsko, Španělsko, Malta, Nizozemsko, Lucembursko, Velká Británie, Rakousko, Norsko, Německo, Dánsko, Belgie, Slovinsko, Albánie
<b>Pozice ČR ve světě / v Evropě – 131. / 17.</b>

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>

#### 1.6.2 *Současná situace v ČR*

V roce 2000 byla hrubá incidence 20,0/100 000 žen, v roce 2005 bylo nahlášeno 19,1/100 000 žen. Absolutní počet ročně nově hlášených onemocnění tak nadále přesahuje 1 000. Data Národního onkologického registru ukazují za poslední časové období 2005–2009 mírně klesající trend mortality KDH (graf 2, tabulka 5).



Graf 2: Trend vývoje incidence a mortality ZN děložního hrdla u žen v České republice od roku 1977.

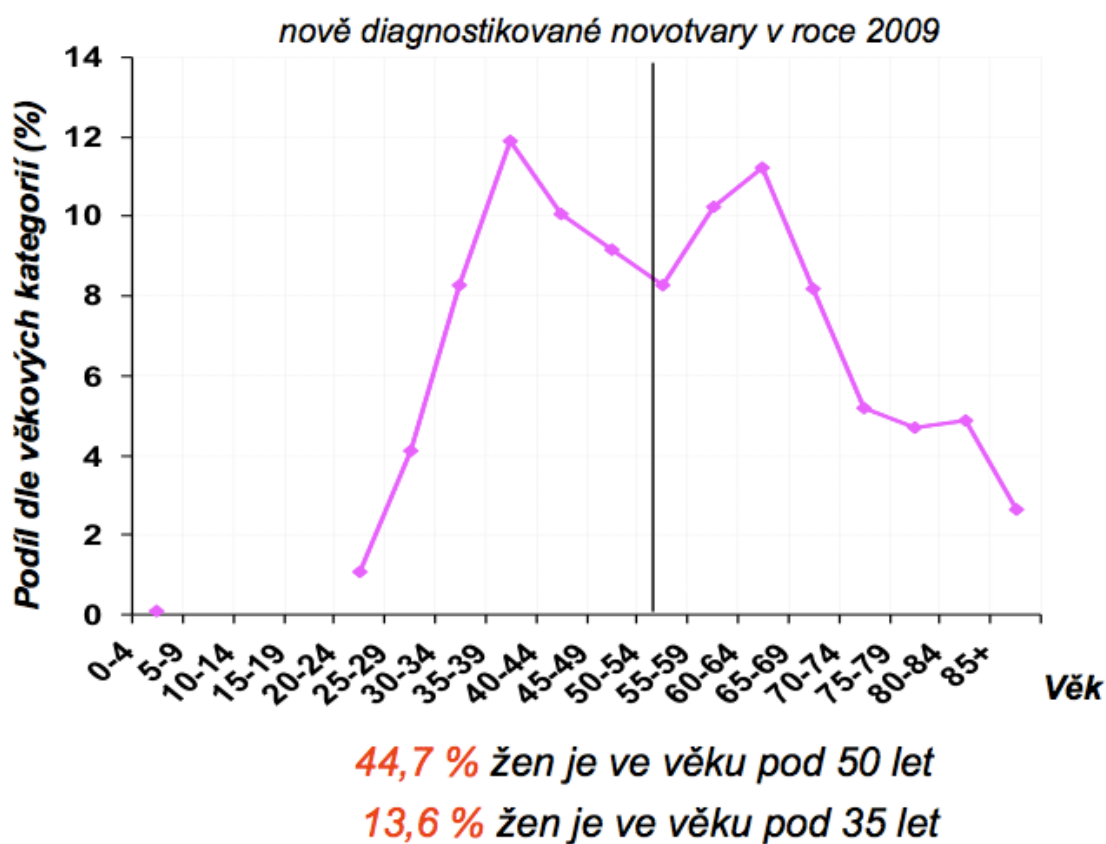
Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>

Tabulka 5: Základní epidemiologické údaje karcinomu děložního hrdla v ČR (z roku 2009).

<b>Incidence</b>	Celkový počet nově diagnostikovaných žen	1025
	Z toho v klinickém stádiu III-IV	33,6 %
	Incidence na 100 000 žen	19,2
<b>Mortalita</b>	Celkem zemřelých	311
	Mortalita na 100 000 žen	5,8
<b>Prevalence</b>	Celkový počet žen v prevalenci	16 826
	Z toho v klinickém stadiu III-IV při diagnóze	12,1 %

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>

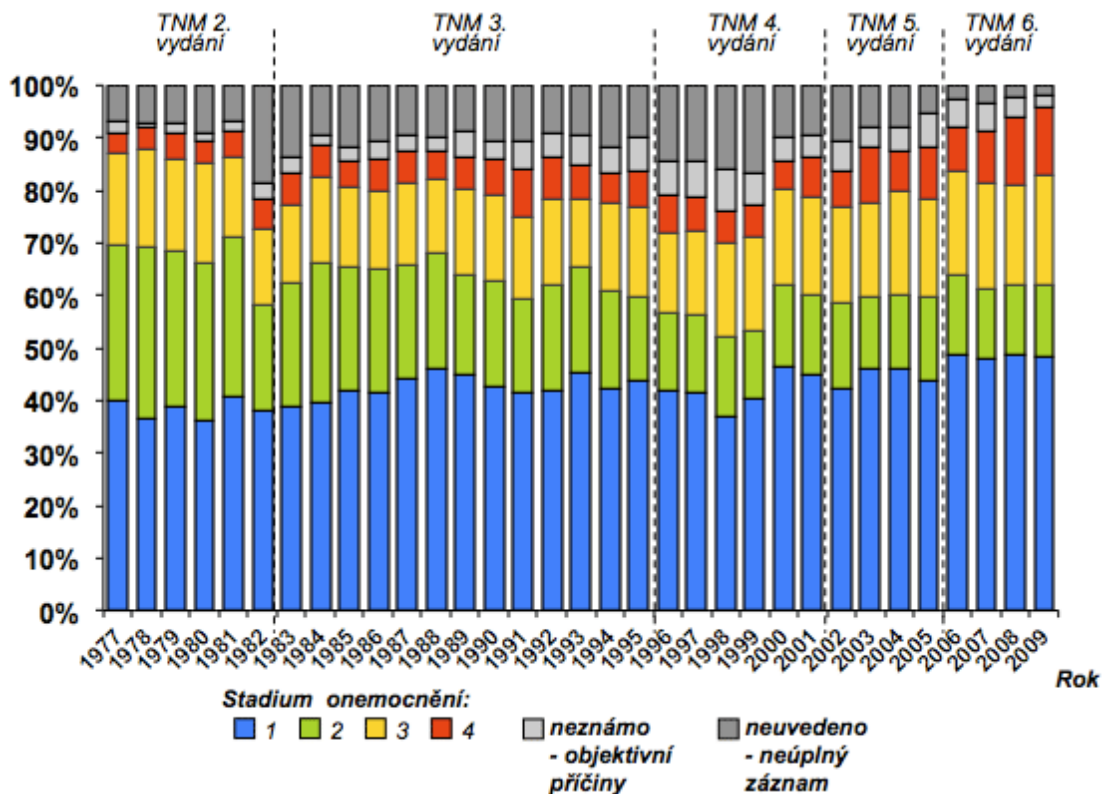
Vysoká incidence u KDH zasahuje široké spektrum věkových kategorií žen. Více než 30 % nových případů karcinomu děložního hrdla se vyskytuje u žen ve věku pod 45 let. Česká republika není výjimkou, věkově specifická incidence začíná významně růst od 29. roku života a vrcholu dosahuje u žen ve věku 35–39 let, graf 3. Bohužel i v těchto věkových kategoriích je relativně vysoká mortalita, k čemuž jistě přispívá i skutečnost, že je neustále nově diagnostikováno téměř 30 % pacientek v pokročilém klinickém stadiu 3 nebo 4 (Dušek et al. 2012), graf 4.



Graf 3: Věková struktura pacientek s nově diagnostikovaným ZN děložního hrdla (data z roku 2009).

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>





Graf 4: Vývoj záchytu stadií ZN děložního hrdla (C53) u žen v České republice.

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>

Význam boje proti karcinomu děložního hrdla podtrhuje skutečnost, že se onemocnění vyskytuje častěji ve věkové skupině 35-50 let. Během posledních čtyř desetiletí nastalo dramatické snížení KDH v Severní Americe a západní Evropě díky kvalitnímu cytologickému screeningu. Pro populaci v USA bylo vypočteno riziko vzniku onemocnění 0,3 % při pravidelných cytologických kontrolách. V České republice je podle neoficiálních zdrojů „proscreenováno“ pouze 53 % populace (Halada, Špaček 2011).

Studie z roku 2013 ukazuje velmi vysokou prevalenci HR HPV v České republice ve věkové skupině žen 21-25 let, ale i starších 31 let (15 %), přičemž nejčastější genotyp je HPV 16. Tato prevalence koreluje s vysokým výskytem karcinomu děložního čípku v České republice (Tachezy et al. 2013).

## **1.7 Prevence karcinomu děložního hrdla**

*„Světový boj proti rakovině nelze vyhrát samotnou léčbou: chceme-li zabránit onkologické krizi, je potřeba co nejdříve zavést účinná preventivní opatření.“*

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=aktuality&aid=212>

### *1.7.1 Primární prevence*

Cílem primární prevence je zamezit přenosu HPV infekce. Vhodné je používání kondomu, zvláště u žen bez stálého sexuálního partnera, pro ženy velmi mladé a pro pacientky po ošetření děložního hrdla. Používání kondomu má význam i u žen sledovaných pro mírnou cervikální prekancerózu. Zde se zamezí dalšímu přísunu virové nálože (Cibula, Petruželka et al. 2009).

#### 1.7.1.1 Očkování

Nejnovější a nejspolehlivější metodou primární prevence je očkování proti HPV infekci. Po očkování dojde k rozvoji specifické humorální imunity namířené proti genotypům viru zastoupených ve vakcíně. Základem vakcín jsou virové částice (virus-like particles, VLP), tvořené hlavním kapsidovým proteinem L1, který je nositelem všech dominantních epitopů. VLP neobsahují virovou DNA a proto jsou neinfekční. Vakcíny tzv. první linie jsou zaměřeny proti nejčastějším genotypům HR HPV 16 a 18, které jsou příčinou 70 % případů KDH (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Očkování vakcínou probíhá ve 3 dávkách. Vakcíny vykazují masivní tvorbu typově specifických protilátek, zvláště jeden měsíc po podání 3. dávky vakcíny (0., 2. a 6. měsíc), kdy jejich hladiny vzrostou minimálně 100x nad sérokonverzní mez. Poté se jejich kvantita snižuje a mezi 18. a 24. měsícem (po zahájení očkování) dosahuje hodnot, na kterých přetrvává minimálně po dobu 6,5 let. U kvadrivalentní vakcíny (SILGARD/GARDASIL) přetrvávají protilátky proti HPV typu 6, 11 a 16 nad limitem protilátek (po přirozené nákaze) u minimálně 90 % očkovaných žen ještě po dobu 5 let. Pokles protilátek proti HPV typu 18 nastává kolem 2. roku a dosahuje 70% hladiny kolem 5. roku po očkování. Neznamená to však, že by očkované ženy nebyly vůči

tomuto typu chráněny. Bivalentní vakcína (CERVARIX HPV 16, 18) vykazuje po dobu 6,5 letého sledování téměř 100% sérokonverzní mez protilátek.

Postvakační protilátky mohou u některých žen vymizet, to ale neznámá, že očkované ženy přestávají být proti daným typům HPV chráněny. Při humorální imunitní odpovědi vznikají i paměťové buňky, které se ukrývají v lymfoidní tkáni a jsou v relativně hojné míře přístupné kdekoli. V důsledku toho je imunitní odpověď masivnější a rychlejší. Očkování vakcínami SILGARD a CERVARIX by mělo chránit minimálně po dobu 10-15 let (Fait et al. 2009).

Výzkum vede k dalšímu vyhodnocování účinnosti současných vakcín v plánovaných dvou dávkách oproti dosavadnímu schématu tří dávek. Dále se výzkum zabývá rozvojem, testováním devítivalentní profylaktické vakcíny (HPV 6/11/16/18/31/33/45/52/58) a je také zaměřen na terapeutické a profylaktické vakcíny L2 (Dochez et al. 2014).

#### **Doporučení Národní referenční laboratoře pro papilomaviry pro použití vakcíny**

Podle výsledků klinických zkoušek vakcíny SILGARD je patrné, že vakcína má 100% účinek před infekcí ve vakcíně obsaženými kmeny HPV. Vzhledem k tomu, že se během 2 let po zahájení sexuálního života nakazí 60 % dívek, tento 100% účinek lze očekávat u těch dívek, které ještě pohlavní styk neměly. U žen, které se s infekcí setkaly, ale v současnosti nejsou infikované (HPV DNA negativní, pozitivní protilátky), je účinnost vakcíny pro závažné léze na děložním hrdle 100 %. U žen, které jsou dlouhodobě infikované, tedy s aktivní perzistentní infekcí (pozitivní protilátky, které se tvoří 9-12 měsíců po infekci, HPV DNA pozitivní), je účinnost vakcíny prakticky nulová. U těch žen, které jsou nově infikované (negativní protilátky, HPV DNA pozitivní) je účinnost vakcíny 28 %. Případná vakcinace těchto žen by mohla mít efekt, ale až po vyčištění aktivní infekce – HPV DNA negativní (Fait et al. 2009).

Podle rozsáhlé studie, kde se posuzovala prevalence protilátek proti HPV v České republice, by rutinní očkování mělo být provedeno u dívek do 13 let. Avšak ukázalo se, že i u dívek nad 15 let (zvyšující se prevalence HR HPV) bude očkování prospěšné. Přítomnost protilátek (specifických pro všechny typy ve vakcíně) je vzácná (Hamšíková et al. 2013).

Onemocnění, proti nimž je určena profylaktická vakcinace:

- spinocelulární karcinom děložního hrdla,
- adenokarcinom děložního hrdla,
- CIN 1, CIN2, CIN3,
- adenokarcinom *in situ* děložního hrdla,
- vaginální intraepiteliální neoplazie 2. a 3. stupně,
- vulvární intraepiteliální neoplazie 2. a 3. stupně,
- kondylomata accuminata (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Od 1. dubna 2012 (zákon č. 48/1997 Sb., o veřejném zdravotním pojištění, v platném znění, § 30, odst. 2, písmeno b, bod 6) se mohou dívky v České republice nechat očkovat proti rakovině děložního hrdla od dovršení 13. do dovršení 14. let věku z prostředků veřejného zdravotního pojištění (Mouková et al. 2013).

I když zájem rodičů od zavedení plošné vakcinace výrazně vzrostl (do listopadu 2012 bylo proočkováno až 76 % 13letých dívek), stále očkování proti karcinomu děložního hrdla zůstává mediálně i společensky diskutovaným tématem (Ami Communications 2013).

### 1.7.2 Sekundární prevence

#### 1.7.2.1 Preventivní prohlídky

Preventivní prohlídky jsou důležitým faktorem v prevenci vzniku KDH. U nás podle neoficiálních zdrojů dochází na pravidelné prohlídky pouze 53 % žen (Halada, Špaček 2011).

Screening spočívá v pravidelných gynekologických kontrolách, jejichž cílem je odhalit přednádorové změny nebo časná stadia zhoubného nádoru. Při výskytu abnormálních změn na děložním hrdle většinou nedochází k výrazným zdravotním změnám nebo obtížím: proto hrozí riziko, že tyto změny nebudou včas zachyceny. Jediným účinným způsobem prevence KDH je tedy důsledné a pravidelné sledování. V České republice bylo v lednu 2014 zahájeno adresné zvaní pacientek k preventivním vyšetřením děložního hrdla (Dvořák et al. 2014).

### 1.7.2.2 Výsledky cytologického stěru

Onkologická cytologie tvoří s kolposkopií a HPV testem soubor prebioptických a screeningových metod. Abnormalita výsledků cytologického stěru vede ke kolposkopickému vyšetření a HPV testu. Cytologie je vysoce specifická (97 %), ale při jednorázovém odběru málo senzitivní (60 %). Falešná negativita epitelových abnormalit u jednotlivého cytologického stěru se pohybuje v rozmezí 15-40 %. Citlivost se zvyšuje opakováním cytologických vyšetření a doplněním o HPV test. Výsledky jednotlivých cytologických laboratoří jsou také závislé na způsobu provádění vnitřních kontrolních mechanismů (Turyna, Sláma et al. 2010).

Akreditované cytologické laboratoře v České republice jsou zobrazeny na mapě, obrázek 9 v příloze 3.

### 1.7.2.3 Výhody zařazení HPV testu do screeningu

Z publikovaných analýz vyplývá, že HPV testování je určeno k třídění žen s nejednoznačnými cytologickými nálezy, ke sledování žen s abnormálními výsledky screeningu (negativní kolposkopie/biopsie), k predikci terapeutických výsledků po léčbě CIN. A zvláště pak jako součást primárního screeningu KDH v kombinaci s Pap testem nebo HPV test samotný (Cuzick et al. 2008).

Provedení HPV testu je vzhledem k prevalenci opodstatněné až po 30. roce života ženy. Pozitivita HR HPV v této skupině žen je jasným rizikovým faktorem. U žen nad 35 let je senzitivita HPV testu pro HG léze 95% a specifita 93%. Riziko rozvoje karcinomu a CIN3 při HPV i cytologické negativě je u žen starších 30 let menší než 2 % po dobu následujících 10 let.

Doplnění genotypu při pozitivním HPV testu může stanovit vyšší rizika vzniku karcinomu. V Portlandské studii představuje pozitivita HPV 16 při současné cytologické negativě 21% riziko rozvoje CIN3 v následujících 10 letech, pozitivita HPV 18 představuje 18% riziko a pozitivita jiného HR genotypu riziko pouze 1,5 %.

Mezi další perspektivní již zmíněné diagnostické testy patří detekce p16, Ki67, ProEx C a HPV mRNA (Turyna, Sláma et al. 2010).

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### **2.1 Cíl práce**

Cílem mé práce je zdůraznit velký význam HPV testování žen nad 35 let v rámci preventivních prohlídek. V kombinaci s cytologií lze zvýšit citlivost záchytu onemocnění KDH z 60 % nad 90 %. Při negativním výsledku HPV testu a cytologie by bylo možné významně prodloužit interval preventivních prohlídek v České republice.

### **2.2 Hypotézy**

1. Protože je u žen nad 35 let s HPV infekcí až 400krát větší riziko vzniku KDH, snažila jsem se zjistit, zda příčinou cytologických změn vyšetřovaných žen, jsou právě nebezpečné typy high risk HPV (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68).
2. Po zhodnocení výsledků HPV testování v jednotlivých věkových kategoriích žen, jsem porovnávala modely efektivnějšího screeningu ve vyspělých zemích a u nás v České republice.
3. Je zřejmé, že z výše uvedených publikací i z hodnocení mnou uvedeného souboru patientek vyplývají řešení, která by se dala využít v praxi.

### **3. Metodika výzkumu**

#### **3.1 HPV test**

Na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice v Jindřichově Hradci, a.s. se začal provádět HPV test 21. 3. 1995. Tehdy používaná metoda byla založená na stejném principu hybridizace jako mikrometoda používaná dnes, ale s použitím zkumavek. Do naší laboratoře jsou zasílány vzorky z gynekologických ambulancí části Jihočeského kraje a části kraje Vysočina.

V mé studii jsem sledovala počty žen s pozitivním výsledkem detekce HPV DNA high risk (typy 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68), s přihlédnutím k jejich věku. Celou skupinu jsem rozdělila do šesti věkových kategorií: do 25 let včetně, 26-35 let včetně, 36-45 let včetně, 46-55 let včetně, 56-65 let včetně, nad 65 let. Všechny vzorky pocházely od žen s abnormálním cytologickým nálezem nebo s diagnózou vypovídající o změnách na děložním hrdle.

##### **3.1.1 Odběr a uchování vzorků**

Vzorek na vyšetření HPV do naší laboratoře přichází odebraný ve speciální odběrové soupravě HC Cervical Sampler od firmy QIAGEN, obrázek 10. Odběry na vyšetření HPV provádí lékař v gynekologické ambulanci tak, že sterilním vatovým tampónem odstraní nejprve hlen na sliznici a poté provede kartáčkem z odběrové soupravy razantní stěr sliznice hrdla děložního. Tento kartáček zalomí do transportního média odběrové nádoby a uzavře víčkem. Cervikální vzorky s transportním médiem mohou být skladovány do dvou týdnů při pokojové teplotě a odeslány bez zmrazení do laboratoře. Do přenosného média pro vzorky je výrobcem přidán konzervační prostředek, aby se zpomalilo množení bakterií a zachovala se neporušená DNA lidského papilomaviru (SOP, příbalová informace výrobce).



Obrázek 10: Speciální odběrová souprava HC Cervical Sampler, která se skládá z cervikálního kartáčku a transportního média.

Zdroj: vlastní foto

Zkumavka se vzorkem je po zapsání do laboratorního informačního systému označena příslušným vygenerovaným identifikačním číslem, pod kterým je dále zpracovávána. V laboratoři musí být vzorky uskladněny v chladničce při teplotě 2-8 °C, pokud budou zpracovány do jednoho týdne. V mrazicím boxu při teplotě -20 °C lze vzorky uchovávat déle než jeden týden, maximálně však po dobu tří měsíců (SOP, příbalová informace výrobce).

### 3.1.2 Použití HPV testu

K detekci HPV používáme soupravy *hc2 High-Risk HPV DNA Test* a *hc2 HPV DNA Test* od firmy QIAGEN. Principem stanovení je průkaz nukleové kyseliny hybridizací se zesílením signálu na mikrodestičce. K detekci třinácti typů DNA lidského papilomaviru s vysokým rizikem a pěti typů DNA lidského papilomaviru s nízkým rizikem (v cervikálních nebo jiných vzorcích) se používá chemiluminiscence.

Použití testu je určeno:

1) Pro detekci HPV s vysokým rizikem 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68, pro něž bylo dokázáno, že jsou primárním příčinným faktorem pro vznik karcinomu děložního hrdla.



2) Pro detekci HPV s nízkým rizikem 6/11/42/43/44, pro něž bylo dokázáno, že jsou příčinou tvorby genitálních bradavic.

2) Jako další následný test pro pacientky s abnormálním výsledkem Pap nátěru nebo s cervikálním onemocněním pro doporučení kolposkopie či jiných následných postupů.

3) Jako další následný test pro pacientky s nízkým stupněm dlaždico-buněčných intraepiteálních lézí nebo s vysokým stupněm těchto lézí v Pap nátěru před kolposkopií (SOP, příbalová informace výrobce).

### 3.1.3 *Princip metody*

Principem HPV testu je stanovení příslušné nukleové kyseliny hybridizační metodou se zesíleným signálem za použití chemiluminiscenční detekce. Vzorky obsahující cílovou DNA po denaturaci hybridizují se specifickou sondou RNA HPV. Výsledné hybridy jsou imobilizovány na povrchu jamky mikrodestičky, která je potažená protilátkami, specifickými pro hybridy RNA:DNA. Imobilizované hybridy potom reagují s konjugovanými protilátkami alkalické fosfatázy a jsou detekovány pomocí chemiluminiscenčního substrátu. Na každou protilátku je konjugováno několik molekul alkalické fosfatázy. Množství konjugovaných protilátek se váže ke každému imobilizovanému hybridu, což má za následek podstatnou amplifikaci signálu. Protože substrát je štěpen navázanou alkalickou fosfatázou, dojde k vyzáření světla, které je měřeno luminometrem jako relativní světelné jednotky (RLU). Intenzita vyzářeného světla určuje přítomnost či nepřítomnost cílové DNA ve vzorku (SOP, příbalová informace výrobce).

### 3.1.4 *Činidla a pomůcky*

**Činidla a potřebné součásti diagnostické soupravy** (obrázek 11 v příloze 4):

- indikační barvivo (obsahuje 0,05 % azidu sodného),
- denaturační činidlo (zředěný roztok hydroxidu sodného),
- roztok k naředění sondy (pufrovaný roztok s azidem sodným),
- sonda HPV pro nízké riziko (HPV 6,11,42,43,44 RNA směsná sonda v pufrovaném roztoku),

- sonda HPV pro vysoké riziko (HPV 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68 RNA směsná sonda v pufovaném roztoku),
- kontrola kvality HPV pro nízké riziko (klonovaná DNA HPV 6),
- kontrola kvality HPV pro vysoké riziko (klonovaná DNA HPV 16),
- negativní kalibrátor (nosič DNA v médiu pro přenos vzorků s azidem sodným),
- kalibrátor HPV pro nízké riziko (klonovaná DNA HPV 11),
- kalibrátor HPV pro vysoké riziko (klonovaná DNA HPV 16),
- imobilizační mikrodestička, potažená protilátkami proti hybridu RNA:DNA (obrázek 12, příloha 4),
- detekční činidlo 1 (protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou proti hybridu RNA:DNA v pufovaném roztoku s azidem sodným),
- detekční činidlo 2 (chemiluminiscenční substrát),
- koncentrovaný promývací pufr (obsahuje 1,5 % azidu sodného).

#### *3.1.5 Laboratorní materiály a pomůcky:*

- rotační třepačka (obrázek 13, příloha 4),
- mikrodestičkový inkubátor (obrázek 14, příloha 4),
- mikrodestičkový luminometr DML 2000 Digene (obrázek 15, příloha 4),

Další laboratorní pomůcky v příloze 5. Opatření pro zacházení s testem jsou uvedeny v příloze 6 (SOP, příbalová informace výrobce).

#### *3.1.6 Pracovní postup*

Postup testu:

- Začínáme-li pracovat, ponecháme mikrodestičkový inkubátor a vodní lázeň temperovat po dobu alespoň 60 minut, aby bylo dosaženo rovnováhy při 65 °C. Luminometr zapínáme rovněž na začátku pracovního dne, aby byl v době měření optimálně vytemperován.
- Všechna činidla z lednice a vzorky necháme temperovat při pokojové teplotě 15-30 minut na 20-25 °C.
- Pracovní prostor dekontaminujeme.
- Údaje o vyšetřovaných vzorcích vložíme do PC systému software verze 4.01

- Všechny vzorky promícháme na vortexu, alespoň 5 sekund.
- Nejdříve musí být testovány negativní kalibrátory, kalibrátory pro nízké riziko, kalibrátory pro vysoké riziko, kontroly kvality a potom vzorky.

### **1) DENATURACE:**

- Odstraníme transportní víčka u všech zkumavek.
- Při prvním použití setu připravíme všechny kontroly, kalibrátory stejně jako vzorky a skladujeme je při -20 °C v mrazicím boxu. Poté je můžeme ještě 3x rozmrazit a použít.
- Denaturační činidlo s 5 kapkami indikačního barviva napipetujeme do každého vzorku v transportním médiu. Objem potřebného denaturačního činidla je ekvivalentní polovině objemu vzorku. Odběrové zkumavky uzavřeme šroubovacími uzávěry.
- Vzorky dokonale promícháme pomocí vortexové míchačky, během třepání musí být viditelný vír kapaliny uvnitř každé zkumavky tak, že kapalina omývá celý vnitřní povrch zkumavky. Kontroly, kalibrátory a vzorky by měly změnit barvu na tmavě fialovou.
- Inkubace obsahu zkumavek probíhá ve stojanu umístěném ve vodní lázni při 65 °C 45 minut.
- Po inkubaci vyjmemе kontroly, kalibrátory a vzorky z vodní lázně a necháme zchladnout. Po dobu nejméně 5 sekund promícháme každou zkumavku pomocí vortexu (SOP, příbalová informace výrobce).

### **2) HYBRIDIZACE:**

- Připravíme si hybridizační mikrodestičku a označíme jí. U každého vyšetření testujeme 3 negativní kontroly, 3 pozitivní kontroly a 2 kontroly kvality.
- Napipetujeme 75 µl z každé kontroly, kalibrátoru a vzorku na dno jamky hybridizační mikrodestičky. Nesmíme se dotýkat stěn jamek a omezíme možnost tvorby vzduchových bublinek. Používáme speciální čtyřkanálové pipetovací zařízení EXPAND 4 a čisté zvláště dlouhé pipetovací špičky pro každý přenos, abychom zamezili zkřížené kontaminaci kontrol, kalibrátorů nebo vzorků.
- Po přenosu posledního vzorku přikryjeme mikrodestičku víčkem a provedeme inkubaci hybridizační mikrodestičky po dobu 10 minut při 20-25 °C.

- Pozorně napipetujeme 25  $\mu$ l sondy HPV pro vysoké a nízké riziko (důkladně promíchané, předem připravené směsi) do každé jamky hybridizační mikrodestičky. Používáme jednokanálovou pipetu a pro každou jamku novou špičku. Nesmíme se dotýkat stěn jamek a musíme zabránit zpětnému odstříku.
- Zakryjeme hybridizační mikrodestičku speciální fólií a třepeme na rotační třepačce, nastavené na 1100 otáček za minutu po dobu 3-5 minut. Kontroly, kalibrátory a vzorky by měly po třepání zežloutnout. Jamky, které zůstaly fialové, patrně neměly patřičné množství sondy. Přidáme dalších 25  $\mu$ l sondy do vzorků, které zůstaly fialové a znovu třepeme.
- Po promíchání sejmeme fólii a nahradíme víčkem.
- Inkubujeme v ohřívači mikrodestiček, který byl vytemperován na 65 °C po dobu 60 minut.
- Opatrně vyjmeme hybridizační mikrodestičku, obsahující kalibrátory, kontroly a vzorky z ohřívače mikrodestiček. Ihned sejmeme víko destičky, umístíme ji na čisté místo a necháme vychladnout.
- Celý obsah (přibližně 100  $\mu$ l) kontrol, kalibrátorů, a vzorků z jamek hybridizační mikrodestičky přeneseme na dno odpovídajících jamek imobilizační mikrodestičky (kterou si předem připravíme a označíme) pomocí osmikanálové pipety. Pro každý přenos používáme nové pipetovací špičky.
- Zakryjeme mikrodestičku fólií a třepeme na rotační třepačce při 1100 otáčkách za minutu, při 20-25 °C po dobu 60 minut.
- Poté vyjmeme imobilizační destičku z rotační třepačky a opatrně sejmeme fólii. Odstraníme kapalinu z jamek vylitím do výlevky, neobracíme destičku do původní polohy a odstraníme zbytek tekutiny energickým poklepem (2-3 krát) vždy na čisté papírové ubrousky bez volných vláken (dále tampóny). Vrchní část destičky musí být suchá (SOP, příbalová informace výrobce).

### **3) DETEKCE HYBRIDU:**

- Opatrně napipetujeme 75  $\mu$ l detekčního činidla 1 do každé jamky imobilizační mikrodestičky pomocí osmikanálové pipety reverzní pipetovací technikou.

- Přikryjeme destičky čistým víčkem a necháme inkubovat při 20-25 °C po dobu 30 minut (SOP, příbalová informace výrobce).

#### **4) PROMÝVÁNÍ:**

- Odstraníme detekční činidlo 1 z jamek tak, že na destičku položíme čisté tampóny a opatrně ji převrátíme. Necháme destičku odkapat po dobu 1-2 minut a důkladně osušíme čistými tampóny. Opatrně zlikvidujeme použité tampóny, aby nedošlo ke kontaminaci alkalickou fosfatázou v dalších krocích.
- Při použití promývacího aparátu promyjeme destičku 6x ručně. Každá jamka je promyta k přetečení, aby bylo odstraněno detekční činidlo 1 z horního okraje jamek.
- Po promývání vysušíme destičku tak, že ji obrátíme na čisté tampóny a silně na ní 3-4x poklepeme. Destičku necháme obrácenou na jiném čistém tampónu odkapat alespoň 5 minut.
- Destička musí být bílá a v jamkách mikrodestičky nesmí zůstat žádná růžová kapalina (SOP, příbalová informace výrobce).

#### **5) AMPLIFIKACE SIGNÁLU:**

- Opatrně napipetujeme 75 µl detekčního činidla 2 do každé jamky imobilizační mikrodestičky pomocí osmikanálové pipety a reverzní pipetovací techniky.
- Zakryjeme mikrodestičku víčkem a provedeme inkubaci při 20-25 °C po dobu 15 minut bez přístupu přímého slunečního světla.
- Odečteme hodnoty vyzařovaného světla na mikrodestičce na přístroji DML 2000 po maximálně 30 minutách inkubace.
- Připojený počítač se softwarem Digene verze 4.01 zajistí změření a vyhodnocení vstupních dat. Výsledky jsou automaticky archivovány, je rovněž možné je vytisknout v různých výstupních formátech dle požadavků laboratoře (SOP, příbalová informace výrobce).

##### *3.1.7 Interpretace výsledků*

- Software provádí ověření změřených hodnot pro kontroly a kalibrátory, vyhodnotí poměry a meze, stanoví hranici positivity pro daný test.

- Kvalitativní software Digene a protokoly DML 2000 verze 4.01, určenými pro HPV automaticky ověří níže uvedená kritéria a vypočte standardní odchylku, průměr kalibrátoru a variační koeficient.
- Negativní kalibrátor musí být testován 3x. Průměr negativního kalibrátoru musí být 10-250 RLU. Výsledky by měly vykazovat variační koeficient do 25 % (CV %). Pokud je CV vyšší než 25 %, software nám automaticky vyřadí hodnotu o množství RLU nejvíce vzdálené od průměru a znovu vypočte průměr pomocí dvou zbylých hodnot.
- Kalibrátor HPV s vysokým nebo nízkým rizikem musí být opět testován 3x. Výsledky by měly vykazovat variační koeficient do 15 %, je-li tato hodnota vyšší, software nám opět vyřadí hodnotu kalibrátoru o hodnotě RLU nejvíce vzdálené od průměru a znovu vypočte průměr pomocí dvou zbylých hodnot.
- Pro ruční výpočet % CV: vydělíme standardní odchylku hodnot RLU zbývajících replikátů negativního kalibrátoru průměrem hodnot RLU zbývajících replikátů kalibrátoru s vysokým rizikem a tento výsledek vynásobíme 100.
- Výsledky průměru kalibrátoru s vysokým rizikem (HRC), s nízkým rizikem (LRC) a negativního kalibrátoru (NC) jsou použity k výpočtu poměru HRC / NC či LRC / NC pro každou sondu a tyto poměry musí splňovat kritéria pro ověření kalibrace testu. Přijatelné rozmezí je 2,0-15, jinak je stanovení neplatné a musí být opakováno. Pokud je vyšetření platné, stává se průměr hodnot HRC a LRC hranicí positivity pro určení vzorků. Všechny hodnoty RLU pro vzorky jsou převedeny na poměr k příslušné hodnotě hranice positivity. Poměr RLU vzorku / hodnota hranice positivity.
- Kontroly kvality pro nízké riziko (QC1 – LR) a pro vysoké riziko (QC2 – HR) musí být součástí každého zkušebního testu a hodnota RLU / hodnota hranice positivity (CO) musí spadat do následujících přijatelných rozmezí, jinak je stanovení neplatné a musí být opakováno. QC1 – LR: 0,001-0,999 a QC2 – HR: 2-8.
- Hranice positivity pro *DNA test hc2 HPV* s vysokým rizikem je nastavena výrobcem na 1 pg/ml, je ekvivalentní 100 000 HPV kopií/ml nebo 5000 HPV kopií na stanovení.
- Vzorky s poměry RLU / hodnota hranice positivity větší nebo rovna 1,0 jsou považovány za POZITIVNÍ.

- Vzorky s poměry RLU / hodnota hranice positivity menší než 1,0 jsou považovány za NEGATIVNÍ nebo nebyla zjištěna žádná DNA HPV pro 13 testovaných typů HPV. Sekvence DNA HPV s vysokým rizikem jsou buď nepřítomny, nebo jsou úrovně DNA HPV pod úrovní detekčního limitu stanovení (SOP, příbalová informace výrobce).

### 3.1.8 *Systém externího hodnocení kvality*

Podstatou externího hodnocení kvality (EHK) jsou procesy, zajišťující kvalitu měření. Principem EHK je provádění mezilaboratorních zkoušek. Požadavky na organizátory EHK patří:

- zaručená nestrannost a nezávislost,
- odborná způsobilost,
- technicko-organizační způsobilost,
- zavedený systém řízení kvality,
- akreditace podle ISO Guide 43 – 1: 1997 a/nebo dle ILAC G – 13: 2000.

EHK doplňuje jiné procesy k zajištění kvality: validace, verifikace, interní kontrola kvality, měření referenčních materiálů. Vyhodnocení výsledků měření v rámci EHK umožní účastníkovi: určení případných chyb a nejistot, usnadní odstranění analytických problémů, vede ke zlepšování kvality, v mnoha případech účinným nástrojem verifikace a návaznosti výsledků měření. Účast v EHK je povinný požadavek norem ISO 15189 a ISO 17025. V systému EHK jsou pro vybrané analyty vydávány certifikáty úspěšnosti. Certifikát pro daný analyt obdrží pracoviště, které se zúčastnilo příslušného kontrolního cyklu EHK a splnilo podmínky pro přidělení certifikátu. Certifikát má platnost jednoho roku a nositelem jednoho certifikátu může být jen jedno pracoviště/analytický systém (Friedecký et al. 2006).

Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a. s. se účastní systému externího hodnocení kvality od roku 1999 dosud, 1x ročně. Úspěšnost byla 100 %, kromě roku 2000: 80 % a roku 2004: 90 %. Laboratoř má tedy všechny certifikáty EHK za období 1999-2013, poslední za rok 2013 je v příloze 7.

## 4. Výsledky

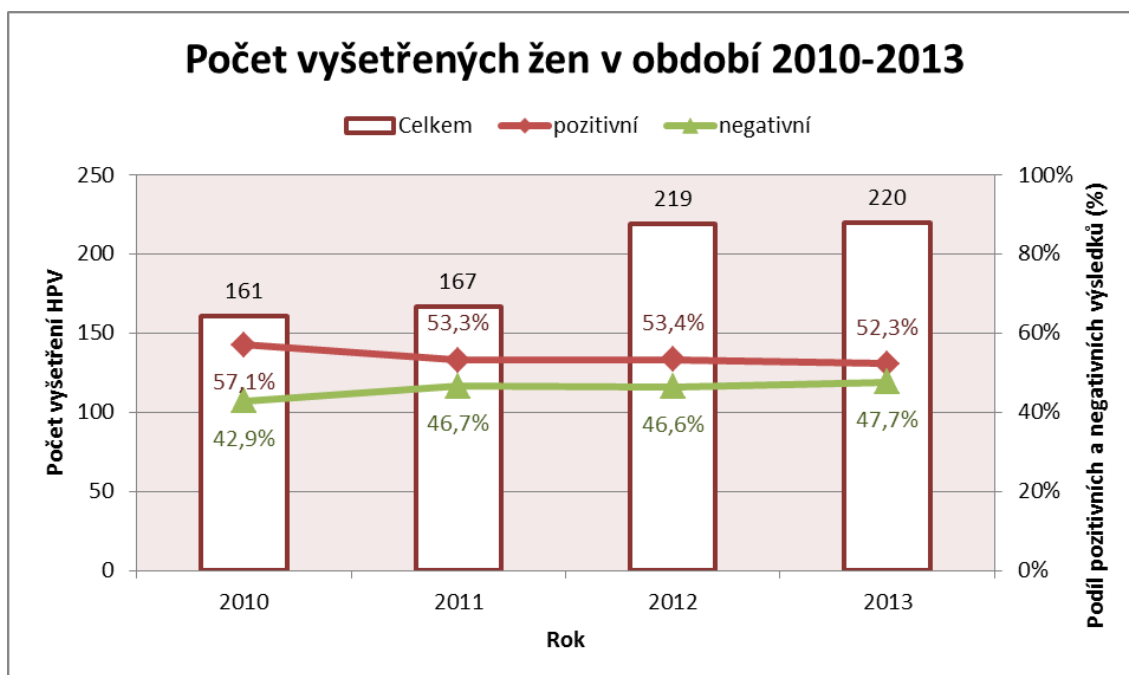
Do mé studie jsem zahrнула cervikální vzorky žen (v šesti věkových kategoriích), testované na přímý průkaz high risk HPV (typy 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) a odebrané na základě abnormálních změn děložního hrdla. Na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. bylo v období od 1. 1. 2010 do 31. 12. 2013 vyšetřeno celkem 767 pacientek.

*Tabulka 6:* Přehled pozitivních a negativních vyšetření HPV high risk v období od 1. 1. 2010 do 31. 12. 2013.

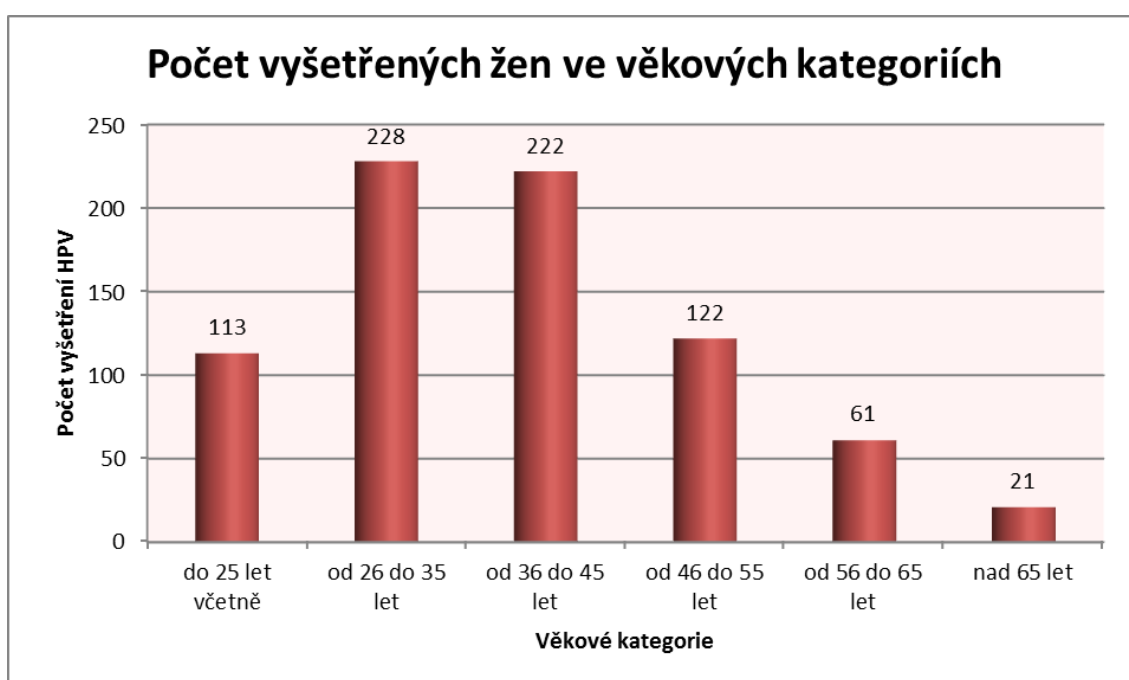
Věkové kategorie	Počet žen								Celkem
	2010		2011		2012		2013		
	POZIT HIGH RISK	NEGAT HIGH RISK	POZIT HIGH RISK	NEGAT HIGH RISK	POZIT HIGH RISK	NEGAT HIGH RISK	POZIT HIGH RISK	NEGAT HIGH RISK	
do 25 let včetně	18	11	17	9	16	5	23	14	113
od 26 do 35 let	38	12	30	22	45	22	40	19	228
od 36 do 45 let	26	19	17	27	32	34	32	35	222
od 46 do 55 let	6	16	13	14	13	20	11	29	122
od 56 do 65 let	3	9	10	5	6	16	5	7	61
nad 65 let	1	2	2	1	5	5	4	1	21
<b>Celkem</b>	<b>161</b>		<b>167</b>		<b>219</b>		<b>220</b>		<b>767</b>

Kompletní výsledky vyšetření HPV testu od 1. 1. 2010 - 31. 12. 2013 prováděné na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a. s. jsou součástí této bakalářské práce v elektronické podobě na CD/DVD disku, tabulka 7 příloha 8.

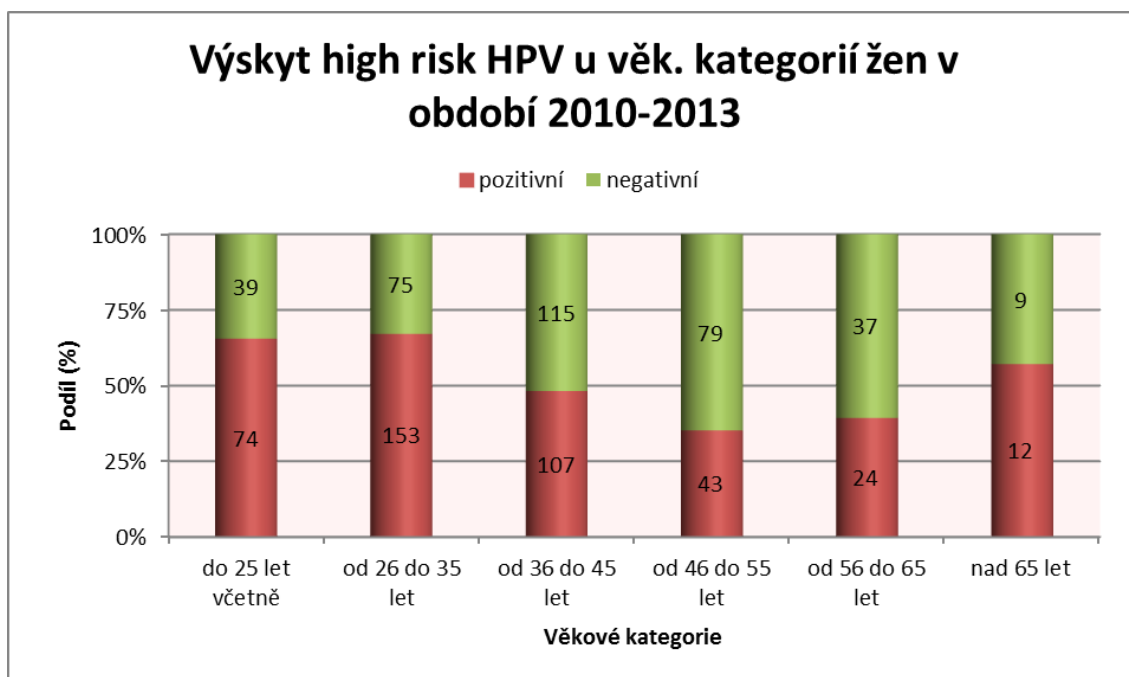




Graf 5: Přehled testovaných žen na HR HPV za období 2010-2013 na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.



Graf 6: Počet testovaných žen na HR HPV ve věkových kategoriích na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec a.s. za uvedené období (2010-2013).



Graf 7: Výsledky testování HR HPV (typy 16/18/31/33/35/39/45/51/52/ 56/58/59/68) u žen s cytologickým nálezem za uvedené období (2010-2013) na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

## 5. Diskuze

Na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. bylo v období od 1.1.2010 do 31.12.2013 celkem vyšetřeno na přímý průkaz HPV high risk (typy 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/ 58/59/68) 767 pacientek.

Cílem mé práce bylo zdůraznit velký význam HPV testování v rámci preventivních prohlídek u žen nad 35 let. Dále jsem se snažila potvrdit hypotézu, zda příčinou cytologických změn u této rizikové skupiny žen, jsou právě nebezpečné typy HPV.

Protože normální prevalence infekce HPV v populaci je 14-35 % a vrcholí v časně dospělosti 18-25 let, je třeba se zaměřit na věkovou skupinu kolem 35. roku, kdy se prevalence snižuje působením přirozených imunitních mechanismů přibližně na 5 %. Dlouhodobá perzistence infekce (zvláště genotypy HPV 16 a 18) u této skupiny žen nad 35 let je hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj maligních změn (Turyna, Sláma et al. 2010).

Již z prvního grafu je patrný nárůst vyšetření HPV sledovaných žen od roku 2010 (161 pacientek) do roku 2013 (220 pacientek) o 26,8 %, což může být příčinou zvýšeného zájmu žen o preventivní prohlídky, iniciované zřejmě větší osvětou důležitosti HPV testování. Tento test je možné provést i na žádost pacientky, ale potom si jej musí pacientka sama finančně uhradit.

V mém souboru nejvíce sledovaná riziková věková skupina žen (36-45 let včetně) vykazuje pozitivitu high risk HPV ve 48,2 % (107 high risk HPV pozitivních pacientek z celkového počtu 222). Moje hypotéza, zda příčinou cytologických změn jsou právě nebezpečné genotypy HPV, se tedy potvrdila téměř u poloviny vyšetřovaných žen. Je to poměrně velké množství vzhledem k tomu, že příčin abnormálních cytologických nálezů je mnoho. Kdyby těchto 107 žen s pozitivním testem HR HPV bylo testováno v rámci preventivní prohlídky, mohlo se začít se sledováním a léčbou těchto pacientek dříve, než došlo ke změnám buněk na děložním hrdle. Vysoké procento pozitivních HR HPV u věkové skupiny do 25 let včetně (65,5 %) a 26-35 let včetně (67,1 %) si netroufám hodnotit jako rizikové skupiny pro vznik KDH, vzhledem k normální vysoké prevalenci HPV infekce v tomto věku. Hraniční věk 35 let u poslední zmiňované věkové skupiny bych, ale v případě silně pozitivních HR HPV považovala za riziko pro

vznik KDH. V některých publikacích se uvádí dokonce riziková skupina žen s přetrvávající HPV infekcí již od 30 let. V dalších dvou věkových kategoriích (46-55 let včetně a 56-65 let včetně) je pozitivita HR HPV srovnatelná – 35,2 % a 39,3 % žen. Je ale zřejmé, že první zmiňovaná skupina žen byla zastoupena v množství 122 vyšetřovaných žen, zatímco u druhé bylo pouze 61 vyšetřovaných žen. Podle mého názoru, ženy s přibývajícím věkem docházejí na preventivní prohlídky podstatně méně a navštíví svého gynekologa až v případě zdravotních potíží. To dokazuje i poslední věková skupina (nad 65 let) s vysokým podílem pozitivních HR HPV žen (57,1 %), která je bohužel tvořena jen 21 pacientkami. Je tedy možné, že hlavní příčina jednoho z nejvyšších výskytů KDH ve věkové kategorii 60-65 let, může být absence preventivních prohlídek. Nejvyšší zastoupení pacientek na vyšetření HPV má věková kategorie 26-35 let včetně srovnatelně s kategorií 36-45 let včetně. To znamená častější návštěvy u gynekologa, zřejmě také z důvodu plánovaného rodičovství v tomto věkovém rozmezí.

Mediální podpora odborné veřejnosti je nezbytnou součástí efektivnějšího screeningu. I kvalitně prováděná screeningová vyšetření nepřinesou očekávanou změnu bez maximálního zapojení celé populace. Ženy, které se organizovaného programu neúčastní, představují nejrizikovější skupinu pro rozvoj KDH. Dolní hranicí pro fungující screening je 80% účast žen (Cibula, Petruželka et al. 2009).

Epidemiologická data o invazivních karcinomech děložního hrdla pro Českou republiku nevyznívají příznivě a v rámci zemí EU patříme k zemím bez efektivní strategie pro screening děložního hrdla. Značným pokrokem je v posledních pěti letech snaha o akreditace a systém kontrol kvality pro cytologické laboratoře. Kontrola screeningového programu v systému jednorozhodných screeningových intervalů je obtížná a neumožňuje efektivní kontrolu kvality procesu. V současné době je standardní interval kontrol v zemích EU nejméně tříletý. Organizačně se nejvíce osvědčily modely, které jsou založeny na zvaní žen a dokonalých kontrolách všech kroků screeningového procesu. Samotná kolposkopie a gynekologické vyšetření je jako součást screeningové strategie pro prevenci KDH bohužel kontraproduktivní. Ukazuje se, že zapojení HPV HR testu v rámci prevence (u žen nad 30 let), by zvýšilo senzitivitu screeningu vysoko

nad 90 % (česká data ukazují, že senzitivita screeningu založeného pouze na cytologii je v ČR asi 60 %) a umožnilo by bezpečně prodloužit interval screeningových kontrol u HPV negativních a cytologicky negativních žen na pět let. To by bylo ekonomicky výhodnější než současný zcela neefektivní systém, založený na ročních kontrolách a „svobodné“ docházkové vůli žen na preventivní bezplatná vyšetření (Rob et al. 2011).

Je známo, že genotyp HPV 16 je zodpovědný za 53,5 % a HPV 18 za 17,2 % karcinomů děložního hrdla. Ostatní HR HPV představují riziko KDH: HPV 45 (6,7 %), HPV 31 (2,9 %), HPV 33 (2,6 %), HPV 52 (2,3 %), HPV 58 (2,2 %), HPV 35 (1,4 %), HPV 59 (1,3 %), HPV 56 (1,2 %), HPV 51 (1,0 %), HPV 39 (0,7 %), HPV 68 (0,6 %), HPV 73 (0,5 %) a HPV 82 (0,3 %), (Turyna, Sláma et al. 2010). Bylo by tedy z hlediska rizika vzniku KDH přínosnější, stanovovat nejrizikovější genotypy HPV 16 a HPV 18 samostatně a další méně rizikové genotypy (31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) dohromady.

V případě positivity HPV 16 při současné cytologické negativitě by bylo 21% riziko rozvoje CIN3 v následujících 10 letech, pozitivita HPV 18 představuje 18% riziko a pozitivita jiného HR genotypu riziko pouze 1,5 %. Riziko vzniku karcinomu a CIN3 při HPV i cytologické negativitě je u žen starších 30 let menší než 2 % po dobu následujících 10 let (Turyna, Sláma et al. 2010).

Jak už bylo řečeno, zavedení HPV testu do primárního screeningu v České republice by bezpochybně zvýšilo jeho efektivitu. Společně s cytologií by se zvýšila senzitivita záchytu KDH nad 90 % a pacientky s negativními výsledky obou vyšetření by mohly docházet na preventivní prohlídky v pětiletých intervalech, což by bylo i ekonomicky výhodnější. HPV test nám umožní prokázat přítomnost vysokorizikových typů dříve, než se projeví změny na buňkách děložního hrdla a tím se může začít s léčbou a sledováním pacientek včas.

Zařazení HPV DNA testů do primárního screeningu KDH by tedy významně napomohlo ke snížení morbidit i mortality tohoto onemocnění v české populaci (Ondryášová et al. 2013).

## 6. Závěr

Existuje dostatek důkazů, že HPV testování je výhodné jednak v ujasnění abnormální cytologie, dále jako ukazatel účinné léčby CIN lézí a uplatňuje se hlavně v primárním screeningu žen ve věku nad 30 let a starších (Arbyn et al. 2012).

Na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. bylo celkem vyšetřeno na přímý průkaz high risk HPV 767 pacientek v období od 1. 1. 2010 do 31. 12. 2013.

Cílem mé práce bylo zdůraznit velký smysl HPV testování v rámci preventivních prohlídek a zjistit, zda příčinou cytologických změn vyšetřovaných žen v rizikové skupině (36-45 let) jsou právě nebezpečné typy HPV high risk (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/ 68).

V mém souboru nejvíce sledovaná riziková věková skupina žen (36-45 let včetně) vykazuje pozitivitu high risk HPV ve 48,2 %. Jedná se o 107 pacientek s pozitivním testem HPV high risk z celkového počtu 222 testovaných žen s již abnormálním cytologickým nálezem. Kdyby byl u těchto žen proveden HPV test již v rámci preventivního screeningu, mohly by se pacientky sledovat a léčit dříve, než dojde k buněčným změnám na děložním hrdle.

Velkým přínosem zjištění rizika vzniku KDH by také bylo testování HPV 16 a HPV 18 samostatně. Tyto typy jsou zodpovědné za zhruba 70 % KDH, zbytek karcinomů tvoří ostatní méně rizikové genotypy HPV (31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68).

Zařazení HPV testu do primárního screeningu v České republice, společně s cytologickým vyšetřením u žen nad 35 let, je tedy daleko efektivnější a ekonomicky výhodnější. Při negativitě obou testů by mohla žena docházet na preventivní prohlídky v pětiletých intervalech. Při pozitivním HR HPV a negativní cytologii by naopak mohla být žena více sledována a včas léčena.

## 7. Seznam informačních zdrojů

Anton, M., Lukáš, Z., Nenutil, R., Rejthar, A., Vojtěšek, B. *Srovnání detekce HPV infekce u karcinomu děložního čípku pomocí hybridizace in situ a imunohistochemického průkazu papilomavirového proteinu E6*, Klinická onkologie, 13, s 126-130, 2000.

Ami Communications. *Jak se změnila proočkovanost 13letých dívek proti rakovině děložního čípku za 1. rok hrazeného očkování*, 2013, [www.amic.cz](http://www.amic.cz).

Arbyn, M et al. *Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer*, Vaccine. 30 Suppl 5: 88-99. 2012.

C OLM SOPV MB 001 HYBRIDIZACE NK S AMPLIFIKACÍ. *Přímý průkaz antigenu v buněčném materiálu (HPV, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae)*. Jindřichův Hradec: Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a. s. 2013.

Cibula, D., Petruželka, L., et al. *Onkogynekologie*, 1. vydání, Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.

Cuzick, J et al. *Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries*, Vaccine. 26 Suppl 10: 29-41. 2008.

Dina, R et al. *Specific cervical infection*, Department of Histopathology and Cytology, Faculty of Medicine, Imperial College, London, United Kingdom, [www.eurocytology.eu](http://www.eurocytology.eu)

Dochez, C., Bogers, J, J., Verhelts, R., Rees, H. *HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update*, Vaccine, 32 (14): 1595-601, 2014.

- Ducancelle, A., et al. *Interest of human papillomavirus DNA quantification and genotyping in paired cervical and urine samples to detect cervical lesions*, Archives of gynecology and obstetrics, 2014.
- Dušek, L et al. *Epidemiologie karcinomu hrdla děložního hrdla v České republice*, 2012, <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>
- Dvořák, V et al. *Garance programu cervikálního sreeningu. Především rakovině děložního hrdla!*, 2014, [www.cervix.cz](http://www.cervix.cz)
- Dvořák, V et al. *Garance programu cervikálního sreeningu. Co je cervikální screening*, 2014, [www.cervix.cz](http://www.cervix.cz)
- Dvořák, V et al. *Garance programu cervikálního sreeningu. Seznam akreditovaných cytologických laboratoří*, 2014, [www.cervix.cz](http://www.cervix.cz)
- Dvořák, V et al. *Garance programu cervikálního sreeningu. Celosvětová onkologická zátěž roste závratnou rychlostí, varuje IARC*, 2014, [www.cervix.cz](http://www.cervix.cz)
- Fait, T et al. *Očkování proti lidským papilomavirům*, Praha: Maxdorf s. r. o, 2009. ISBN 978-80-7345-204-9.
- Fínek, J. *Pokročilý karcinom děložního hrdla – nová indikace topotekanu (Hycamtin)*, Onkologie, 2 (1), s 59-61, 2008.
- Freitag, P. *Onkogynekologie*, Praha: Triton, 2001. ISBN 80-7254-196-X.
- Freitag, Pavel. *Papilomavirové infekce v gynekologii*, Praha: Triton, 1998. ISBN 80-85875-93-4.
- Friedecký, B et al. *System externího hodnocení kvality*, Česká společnost klinické biochemie, 2006, <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--system-EHK>



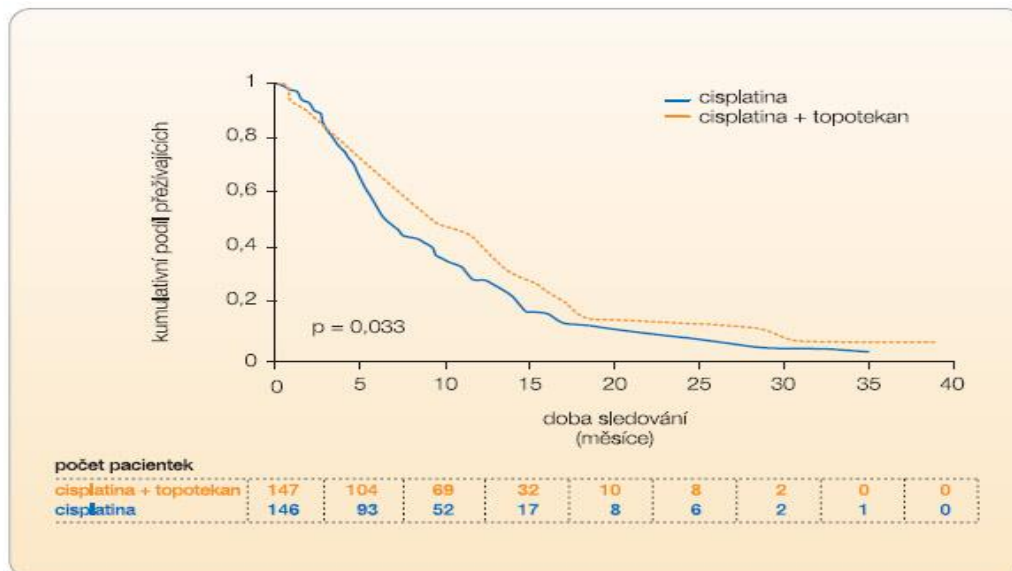
- Halada, P., Špaček, J. *Epidemiologie, etiopatogeneze karcinomu děložního hrdla a současné možnosti jeho prevence*, 2011, [zdravi.e.15.cz/clanek/postgradualni-medicina/epidemiologie-etipatogeneze-karcinomu-delozniho-hrdla-a-soucasne-moznosti-jeho-prevence-457919](http://zdravi.e.15.cz/clanek/postgradualni-medicina/epidemiologie-etipatogeneze-karcinomu-delozniho-hrdla-a-soucasne-moznosti-jeho-prevence-457919)
- Hamšíková, E. *Papilomaviry a jejich role v patogenezi karcinomu děložního hrdla*. Remedica, 17, s 470-475, 2007.
- Hamšíková, E., Ludviková, V., Stasiková, J., Tachezy, R. *Cross-sectional study on the prevalence of HPV antibodies in the general population of the Czech Republic*, Sexually transmitted infections, 89(2): 133-137, 2013.
- Heinzelmann-Schwarz, V, A., Kind, A, B., Jacob, F. *Management of human papillomavirus-related gynecological malignancies*. Curr Probl Dermatolog. 45: 216-24, 2014.
- Killen, J, L. et al. *Improved abnormal pap smear triage using cervical cancer biomarkers*, Journal of Lower Genital Tract Disease, volume 18, issue 1: 1-7, 2014.
- Kobilková, J et al. *Gynekologická cytodiagnostika*, 2. vydání, Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-313-3.
- Kreimer, A, R et al. *Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease*, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 15(5): 908-14. 2006.
- Laco, J. *Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu*, 1. vydání, Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-874-2.
- Minář, L., Weinberger, V. *Prognostický význam tumor markeru SCCA u pacientek s operabilními stadii dlaždicobuněčného karcinomu děložního hrdla*, Praktická gynekologie; 15(2): 64-69, 2011.

- Mouková, L., Feranec, R., Chovanec, J. *Prekancerózy v gynekologii – děložní hrdlo*, Klinická onkologie, 26, s 49-51, 2013.
- Ondryášová, H., Koudeláková, V., Hajdúch, M. *Karcinom cervixu – možnosti detekce lidského papilomaviru*, Česká gynekologie, 78, č. 3: 289-294, 2013.
- Poljak, M., Oštrbenk, A. *The Abbott RealTime High Risk HPV test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older*, Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat. 22(2):43-7. 2013.
- QIAGEN. *Digene Hybrid Capture 2- hc2 HPV DNA Test*, příbalová informace výrobce, CD/DVD, 2009.
- Rob, L., Pluta, M., Chmel, R., Robová, H. *Karcinom děložního hrdla v roce 2011 – screening a možnosti prevence*, <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare&aid=110>
- Robová, H. *Topotekan*, Remedia, 6, 2008.
- Roche s. r. o., Diagnostics Division. *Schéma lidského papilomaviru*, [www.hpv16a18.cz/pro-lekare/o-hpv/](http://www.hpv16a18.cz/pro-lekare/o-hpv/)
- Roztočil, A et al. *Moderní gynekologie*, 1. vydání, Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-2832-2.
- Safaeian, M et al. *Epidemiological study of anti-HPV16/18 seropositivity and subsequent risk of HPV16 and -18 infections*, Journal of the National Cancer Institute. 102 (21): 1653-62, 2010.
- Sláma, J. *Bivalentní vakcína proti infekci lidskými papilomaviry*, Remedia. 5, 2007.

- Stannard, L. *Electron micrograph images*, Division of Medical Virology Faculty of Health Sciences University of Cape Town Observatory 7925 Cape Town South Africa, <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html>
- Stapro s. r. o, sídlo: Pardubice. *Informační technologie pro zdravotnictví*, Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a. s, [www.stapro.cz](http://www.stapro.cz)
- Šidlová, H. *Cervikálna cytológia*, Cytopathos, spol. s. r. o, Limbova 5 Bratislava 37, [www.cervix.sk/cytologia/obr-LSIL.php](http://www.cervix.sk/cytologia/obr-LSIL.php)
- Tachezy, R., Šmahelová, J., Kaspírková, J., Saláková, M. *Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women*. Plos one, 8(11): e 79156, 2013.
- Turyňa, R., Sláma, J., et al. *Kolposkopie děložního hrdla*, Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-679-3.
- Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. *Informace o rakovině děložního čípku*, <http://www.vecverejna-cz.eu/cs/o-rakovine-delozniho-cipku>
- Vaculová, J., Horáček, J., Bystroňová, P. *Význam imunohistochemického vyšetření u prekanceróz děložního čípku*, Kontakt, 1, s 157-163, 2007.
- Vajner, L., Uhlík, J., Konrádová V. *Lékařská histologie I*, Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1860-9.
- Vonka, V., Hamšíková, E. *Karcinom děložního čípku: od poznání etiologie k profylaktické vakcíně*, Časopis lékařů českých, 145, s 511-521, 2006.
- Wittekindt, C., Wagner, S., Mayer, C, S., Klussmann, J, P. *Basics of tumor development and importance of human papillomavirus (HPV) for head and neck cancer*, GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg., 11. 2012.

## 8. Přílohy

### Příloha 1:

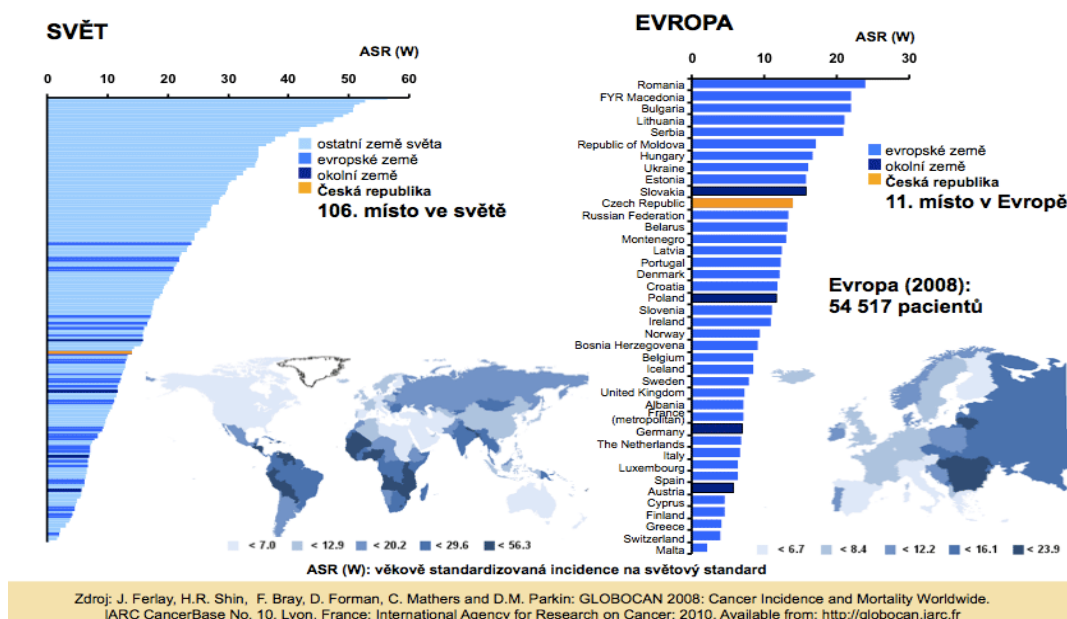


**Graf 1** Srovnání celkového přežití pacientek s pokročilým stadiem karcinomu děložního hrdla léčených kombinací topotekan plus cisplatina versus samotná cisplatina ve studii GOG 0179; volně podle [8] – Long, et al., 2005.

*Graf 1:* Porovnání přežití pacientek s pokročilým stadiem KDH léčených kombinací topotekan s cisplatinou oproti samotné léčbě cisplatinou.

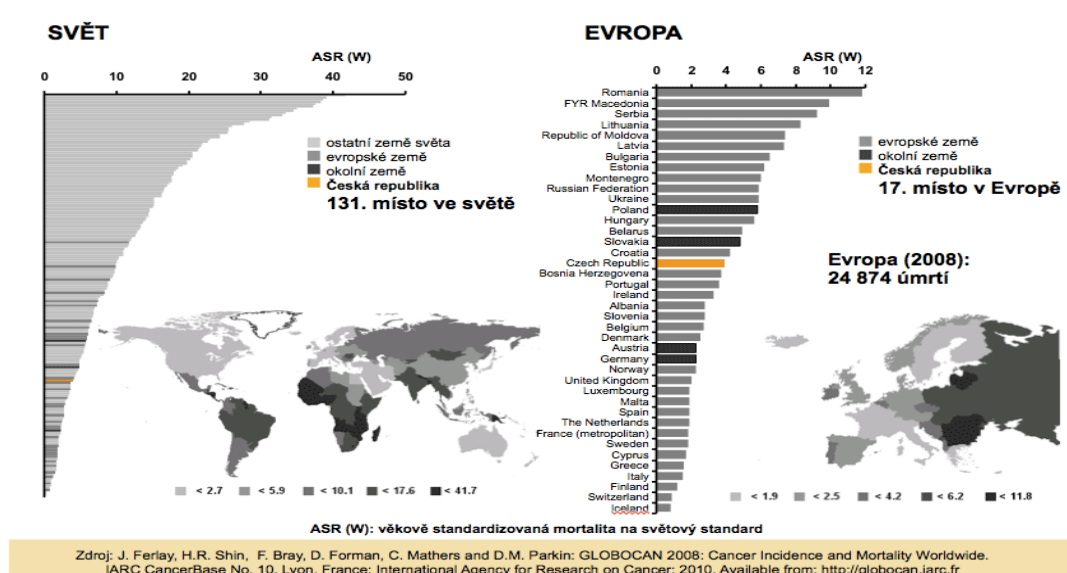
Zdroj: <http://www.remedia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20090220040703.jpg>

## Příloha 2:



Obrázek 7: Incidence ZN děložního hrdla (C53) v mezinárodním srovnání.

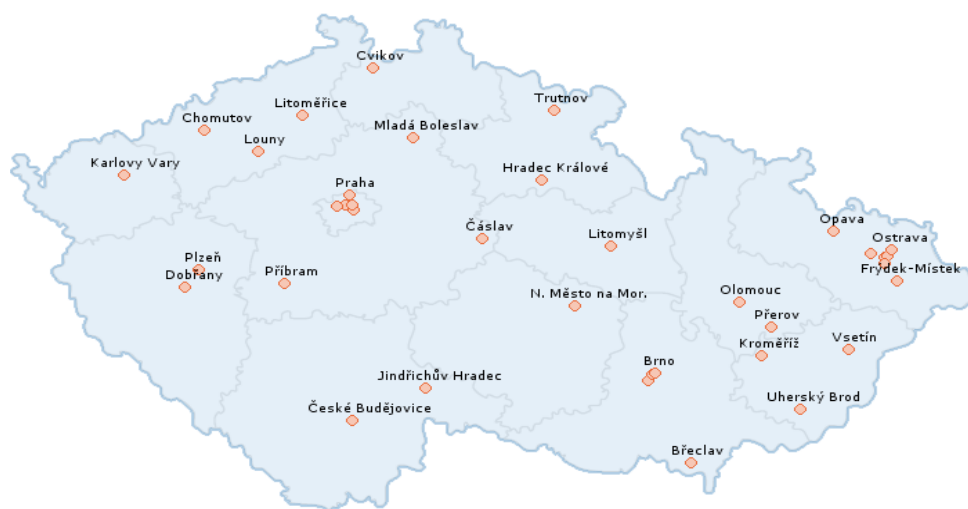
Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>



Obrázek 8: Mortalita ZN děložního hrdla (C53) v mezinárodním srovnání.

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>

### Příloha 3:



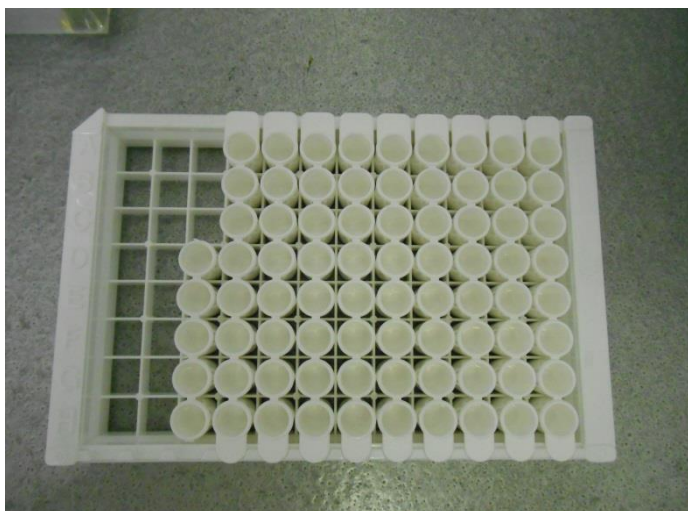
Obrázek 9: Mapa akreditovaných cytologických laboratoří v České republice.

Zdroj: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=cervikalni-screening--centra--seznam>

### Příloha 4:



Obrázek 11: souprava hc2 High-Risk HPV DNA Test a hc2 HPV DNA Test od firmy QIAGEN (Zdroj: vlastní foto).



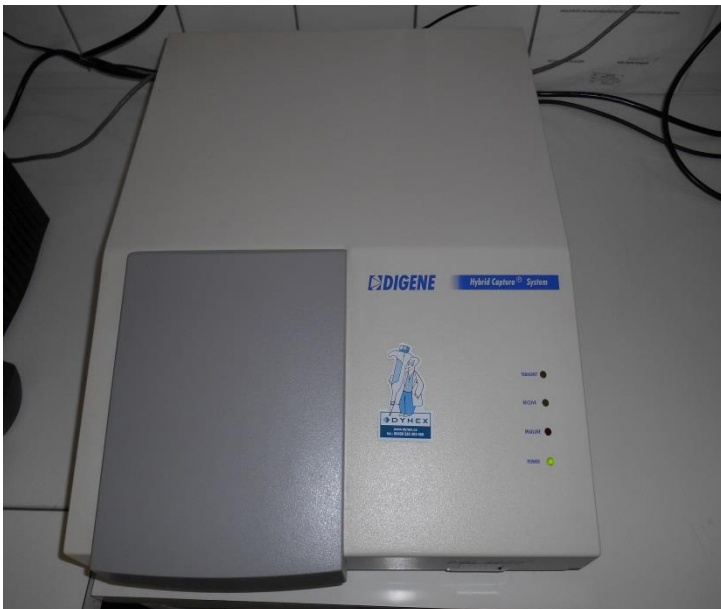
Obrázek 12: imobilizační mikrodestička, potažená protilátkami proti hybridu RNA:DNA (Zdroj: vlastní foto).



Obrázek 13: rotační třepačka (Zdroj: vlastní foto).



Obrázek 14: mikrodestičkový inkubátor (Zdroj: vlastní foto).



Obrázek 15: mikrodestičkový luminometr DML 2000 Digene (Zdroj: vlastní foto).



## **Příloha 5:**

Další laboratorní pomůcky:

- PC systém, software verze 4.01 Digene Hybrid Capture System, tiskárna,
- pipetovací zařízení EXPAND - 4 a stojánek,
- promývací zařízení,
- hybridizační mikrodestičky,
- víčka na mikrodestičky,
- speciální dlouhé pipetové špičky pro pipetování vzorků,
- stojan na zkumavky pro vzorky,
- šroubovací uzávěry zkumavek pro odběr vzorků,
- hybridizační mikrozukavky,
- stojánek na mikrozukavky,
- krycí fólie na destičku,
- vodní lázeň,
- vortexová míchačka s kalíškovým nástavcem,
- jednonanálová pipeta, nastavitelná pro objemy 20-200  $\mu$ l a 200-1000  $\mu$ l,
- opakovací pipeta (Eppendorf Repeater),
- osmikanálová pipeta, nastavitelná pro objemy 25-200  $\mu$ l,
- časovač,
- pipetovací špičky na jedno použití s aerosolovým filtrem,
- špičky na jedno použití pro opakovací pipetu Eppendorf,
- špičky na jedno použití pro osmikanálovou pipetu,
- tampóny na blotování nebo papírové ubrousky bez volných vláken,
- 75% etanol,
- rukavice bez mastku,
- polypropylenové zkumavky s obsahem 5 ml nebo 15 ml s kulatým dnem a snímatelným víčkem,
- odměrný válec pro přípravu pracovního ředění promývacího pufu,
- čerstvá destilovaná voda (SOP, příbalová informace výrobce).

## **Příloha 6:**

Opatření pro zacházení s testem:

- Cervikální kartáček se používá jen u žen, které nejsou těhotné.
- Nesprávně provedený odběr může být příčinou falešně negativního výsledku.
- Pro získání spolehlivých výsledků testu musí být přesně dodržen předepsaný postup pro *hc2 HPV DNA Test* i jeho interpretace. Kalibrátory a kontrola kvality musí splňovat kritéria testu.
- Je důležité odpipetovat přesný objem požadovaného činidla a vše dobře promísit po každém přídavku činidla. Požadovaná změna zbarvení potvrdí, že tyto podmínky byly splněny.
- Nukleové kyseliny jsou velmi citlivé na degradaci nukleázou z okolního prostředí. Nukleázy se vyskytují na lidské kůži a na povrchu věcí, či na materiálech, kterých se dotýkali lidé. Je proto nutné očistit povrchy 75% etanolem a při provedení všech kroků testu používat gumové rukavice bez mastku.
- Zvláště důležité je dokonalé odstranění detekčního činidla 1 důkladným promytím a následné zakrytí imobilizační mikrodestičky po promývacím kroku, protože během inkubace s detekčním činidlem 2 může exogenní alkalická fosfatáza reagovat s detekčním činidlem 2 a vést k falešně pozitivním výsledkům.
- Před začátkem testu vždy provádíme pravidelnou dekontaminaci promývacího zařízení.
- Vzhledem k tomu, že se jedná o časově náročné vyšetření, můžeme test rozdělit na dvě části. První den lze provést denaturaci a vzorky ponechat do druhého dne v chladničce při teplotě 2-8 °C, druhý den pak pokračovat podle pracovního postupu.
- Destičkový inkubátor je validován 2x ročně. Luminometr včetně řídicího počítače, softwaru a rotační třepačka jsou validovány 4x ročně. Pipetovací zařízení EXPAND 4 je validováno 1x za rok (SOP, příbalová informace výrobce).

**Příloha 7:**



# STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

100 42 Praha 10, Šrobárova 48

## Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti

Poskytovatel zkoušení způsobilosti akreditovaný ČIA  
podle ČSN EN ISO/IEC 17043, reg. č. 7001

vydává

# CERTIFIKÁT

č. 011/2013

Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.  
Odd. lékařské mikrobiologie  
MUDr. Heinigeová Blanka  
U Nemocnice 380  
377 38 Jindřichův Hradec 3

Laboratoř se zúčastnila programů zkoušení způsobilosti -  
Externího hodnocení kvality v oblasti lékařské mikrobiologie  
v rozsahu uvedeném v příloze tohoto certifikátu.  
Svémi výsledky dosáhla požadovanou úroveň a splnila  
podmínky správné diagnostiky.

Toto osvědčení platí do: 28.2.2015  
V Praze dne 6.2.2014

  
Ing. Ivan Peter  
vedoucí AP CEM



  
Ing. Jitka Sosnovcová  
ředitelka SZÚ



Státní zdravotní ústav  
Centrum epidemiologie a mikrobiologie  
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10  
tel./fax: 267082427, e-mail: apcem@szu.cz



Příloha k certifikátu č.: 011/2013

**Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.**  
**Odd. lékařské mikrobiologie**  
**MUDr. Heinigeová Blanka**  
**U Nemocnice 380**  
**377 38 Jindřichův Hradec 3**

Číslo programu	Název programu
PT#M/ 3/2013	Sérologie Streptococcus pyogenes - neutralizační metoda
PT#M/ 4/2013	Sérologie toxoplasmózy
PT#M/ 5/2013	Bakteriologická diagnostika
PT#M/ 6/2013	Sérologie EBV
PT#M/ 7/2013	Sérologie CMV
PT#M/ 9/2013	Sérologie lymeské borreliózy
PT#M/10/2013	Sérologie HBV,HCV,HIV
PT#M/11/2013	Identifikace respiračních virů a enterovirů
PT#M/12/2013	Sérologie syfilis
PT#M/17/2013	Sérologie HBV- markery
PT#M/18/2013	Sérologie HAV
PT#M/19/2013	Parazitologie střevení
PT#M/20/2013	Mikroskopická diganostika trichomonád
PT#M/23/2013	Mykologická diagnostika
PT#M/29/2013	Sterilizace
PT#M/31/2013	Detekce papillomavirů
PT#M/33/2013	Sérologie larvální toxokarózy

Informace o provedení programu zkoušení způsobilosti jsou uvedeny ve zprávách.

V Praze dne 6.2.2014

  
Ing. Ivan Peter  
vedoucí AP CEM

Obrázek 16: Kopie certifikátu EHK za rok 2013 (včetně přílohy) pro detekci papilomavirů na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

Zdroj: vlastní kopie