



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Prevalence HPV infekce u mužů a žen
léčených pro neplodnost**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Horáčková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Jaworek
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Horáčková
Název práce	Prevalence HPV infekce u mužů a žen léčených pro neplodnost
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Hana Jaworek
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Lidský papilomavirus (HPV) je jednou z nejčastějších pohlavně přenosných chorob způsobující různá nádorová onemocnění, nejčastěji rakovinu děložního čípku. Prevalence HPV infekce se pohybuje mezi 14–35 %. HPV vyšetření není při léčbě neplodnosti indikováno, zůstává tedy tato možná příčina neplodnosti opomenuta. HPV se může vázat na akrozom spermie a mít vliv na její motilitu. Oplození oocyty HPV infikovanou spermií může mít negativní vliv na jeho vývoj. Vzorky 64 párů léčených pro neplodnost, 20 dárců spermií a 16 dárek oocytů byly vyšetřeny na přítomnost HPV DNA dvěma HPV DNA testy, jejichž výsledky byly porovnány. HPV infekce byla detekována v 21,9 % cervikálních stěrů žen léčených pro neplodnost a v 37,5 % cervikálních stěrů dárek oocytů. U mužů léčených pro neplodnost byl HPV detekován v 53,1 % a u dárců spermií v 40 %. HPV DNA byla detekována častěji ve stěrech z penisu (53,6 %) než ve vzorcích ejakulátu (28,3 %). Objasnění vlivu HPV infekce na plodnost a vlivu HPV pozitivitu u dárců gamet na úspěšnost asistované reprodukce by mělo být předmětem dalšího výzkumu.</p>
Klíčová slova	HPV, HPV DNA screening, PCR, neplodnost
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Veronika Horáčková
Title of thesis	Prevalence of HPV Infection in Women and Man Treated for Infertility
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc
Supervisor	Mgr. Hana Jaworek
The year of presentation	2016
Abstract	Human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted diseases resulting in various cancers most often cervical cancer. The prevalence of the HPV infection is between 14-35 %. HPV testing is not indicated in the treatment of infertility, therefore this possible cause of infertility remains overlooked. HPV can bind to the sperm acrosome and affect its motility. Oocyte fertilization with the HPV-infected semen can have a negative impact on its development. Sixty-four pairs treated for infertility, 20 sperm donors and 16 oocyte donors were examined for the presence of HPV DNA by two HPV DNA tests. Results of these tests were compared. The HPV prevalence was 21.9 % in women treated for infertility and 37.5 % in oocyte donors. In women, HPV DNA was detected in cervical swabs. In men treated for infertility HPV was detected in 53,1 % and in sperm donors in 40 %. HPV DNA was detected more often in swabs taken from the penis (53,6 %) than in samples of semen (28,3 %). Further research should clarify the influence of HPV infection on fertility and influence of HPV positivity in gamete donors on assisted reproduction outcome.
Keywords	HPV, HPV DNA screening, PCR, infertility
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala Mgr. Haně Jaworek za odborné vedení práce, poskytnuté konzultační hodiny, nespočet rad a především za trpělivou korekturu a Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. za statistickou analýzu výsledků.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK

1.	CÍLE PRÁCE	14
2.	ÚVOD	15
3.	TEORETICKÁ ČÁST	16
3.1	Lidský papilomavirus	16
3.2	Průběh HPV infekce	18
3.2	Prevalence	19
3.3	HPV a možný vliv na plodnost.....	20
3.3.1	HPV a neplodnost u mužů	21
3.3.2	HPV a neplodnost u žen.....	22
3.3.3	HPV u dětí.....	23
3.4	Prevence	24
3.4.1	Vakcinace.....	25
3.4.2	Screening.....	26
3.4.3	HPV DNA screening.....	27
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
4.1	Materiál a pomůcky	30
4.2	Přístrojové vybavení a software	31
4.3	Použité chemikálie	31
4.4	Etická hlediska	33
4.5	Pacientské vzorky.....	33
4.6	Použité metody a pracovní postupy.....	33
4.6.1	Izolace DNA z ejakulátu a cervikálních stěrů.....	34
4.6.2	Izolace DNA ze stěrů z penisu	34
4.6.3	HPV DNA testy	37

4.6.4	Vyhodnocení výsledků.....	39
5.	VÝSLEDKY	40
6.	DISKUSE.....	45
7.	ZÁVĚR	47
	POUŽITÁ LITERATURA	
	PŘÍLOHY	

SEZNAM ZKRATEK

ADAT1	Human tRNA-specific adenosine deaminase 1
ART	Assisted reproductive technology, Asistovaná reprodukce
ASA	Anti-sperm antibodies, Protilátky proti spermiím
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance, Atypické dlaždicové buňky nejasného významu
ATHENA	Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics
ČR	Česká republika
E genes	Early genes, Časně geny
EB	Elution buffer, Eluční pufr
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay, Enzymaticky značená imunoanalýza
HIV	Human immunodeficiency virus
HPV	Human papillomavirus, Lidský papilomavirus
HR HPV	High risk HPV, Vysoce rizikové HPV
IARC	International Agency for Research on Cancer, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
L1 genes	Late genes, Pozdní geny
L2 genes	Late genes, Pozdní geny
LBC	Liquid based cytology
LCR	Long control region, Dlouhá kontrolní oblast
LR HPV	Low risk HPV, Nízce rizikové HPV
MMX	MasterMix
NPV	Negativní prediktivní hodnota
ORF	Open reading frames, Otevřené čtecí rámce
PAP	Papanicolaův test
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerázová řetězová reakce
p-value	Statistická pravděpodobnost
RRP	Rekurentní respirační papilomatóza

WB Washing buffer, Promývací pufr

WHO World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

1. CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše na téma vliv HPV infekce na fertilitu. Teoretická část je zaměřena na prevalenci HPV infekce v populaci, metody detekce lidského papilomaviru a především na vliv HPV infekce na kvalitu spermatu, interakci s ženským pohlavním ústrojím s následným vlivem na embryogenezi a graviditu. Dalším cílem práce bylo vyšetření přítomnosti HPV infekce pomocí dvou HPV DNA detekčních metod, jejichž výsledky byly porovnány u párů léčených pro neplodnost, dárců spermií a dárekyní oocytů. V rámci experimentální části bylo také vyhodnoceno dotazníkové šetření zaměřené na zdravotní stav a sexuální chování respondentů. Cílem této bakalářské práce bylo vyhodnocení HPV prevalence u mužů a žen léčených pro neplodnost a dárců gamet.

2. ÚVOD

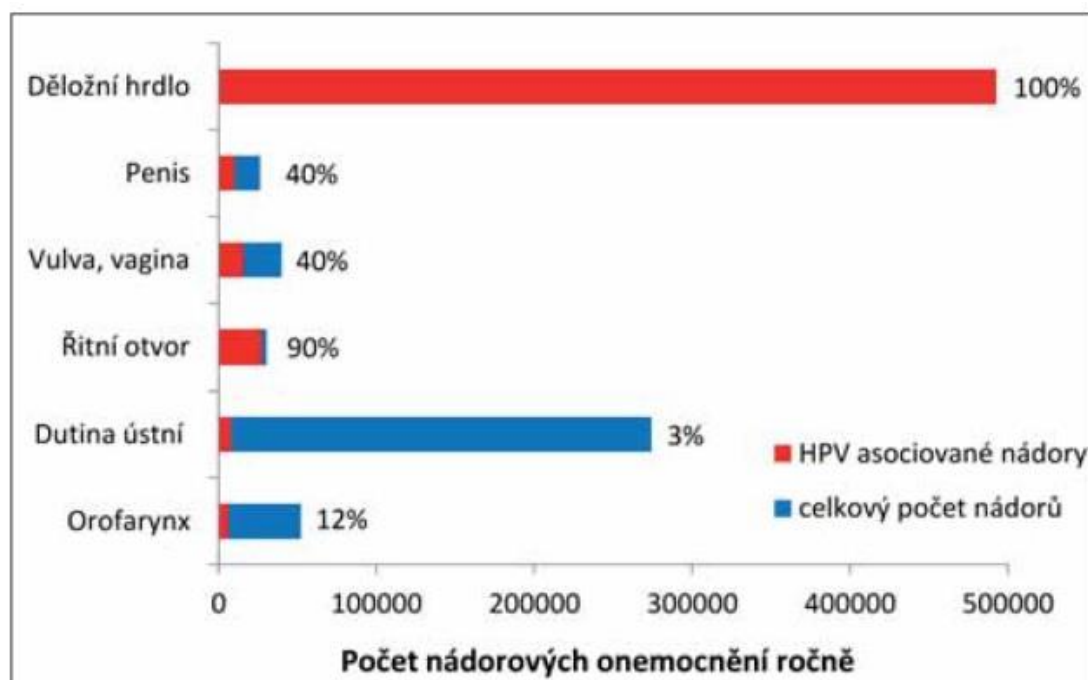
Lidský papilomavirus (HPV) je jednou z nejčastějších pohlavně přenosných chorob v celosvětovém měřítku. S HPV infekcí se během svého života setká přibližně 80 % sexuálně aktivních jedinců, ve většině případů však imunitní systém infekci eliminuje bez klinických příznaků (Bosch, 2013). V současnosti bylo identifikováno více než 120 typů HPV, z nichž přibližně 40 může infikovat sliznici anogenitálního traktu. Tyto genotypy, souhrnně označovány jako slizniční HPV, jsou klasifikovány na základě jejich onkogenního potenciálu na nízké rizikové (low-risk/LR HPV), způsobující benigní hyperproliferační léze nebo genitální bradavice a vysoce (high-risk/HR HPV) rizikové genotypy asociované se vznikem premaligních a maligních lézí (Fernandes, 2013; de Villiers et al., 2004). Perzistence HPV infekce může vést ke vzniku přednádorových a nádorových změn, především v oblasti děložního hrdla (Walboomers et al., 1999). Karcinom děložního čípku je druhým nejčastějším rakovinovým onemocněním s vysokou mortalitou u žen. Ročně je odhaleno přibližně 493 000 nových případů rakoviny děložního čípku po celém světě, z čehož 233 000 případů vede k úmrtí (Parkin, 2005). Karcinom děložního čípku je asymptomatické onemocnění, proto je na jeho včasnou diagnostiku zaměřen cervikální screening.

Kromě vzniku benigních a maligních lézí by HPV infekce mohla ovlivňovat také plodnost. Má negativní vliv na kvalitu spermatu, oplození oocyty a samotný vývoj plodu. Jednoznačná spojitost mezi HPV a infertilitou nebyla dosud prokázána (Souho, 2015). Proto jsem se v této práci zaměřila na zjištění HPV prevalence u párů léčených pro neplodnost a dárců gamet.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Lidský papilomavirus

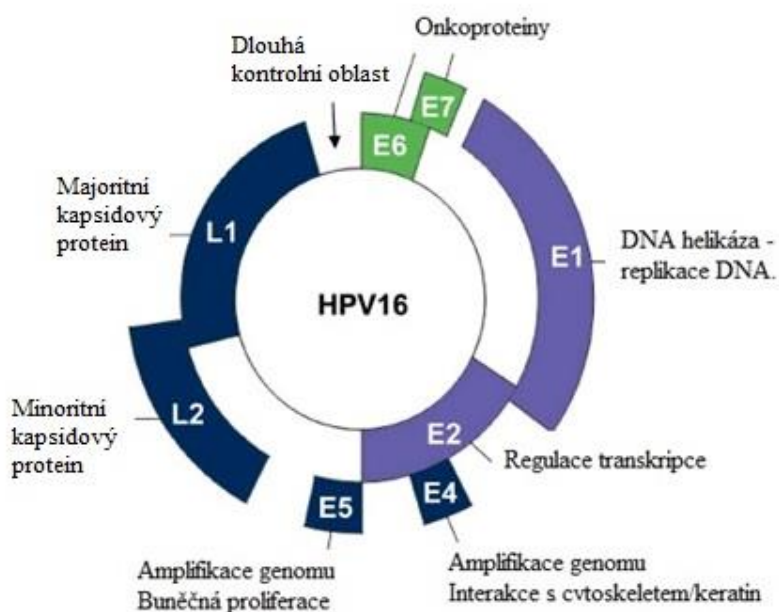
Lidský papilomavirus se řadí do čeledi *Papillomaviridae* (de Villiers et al., 2004). Mezi HR HPV genotypy, které infikují slizniční epitel anogenitálního traktu a mají schopnost navodit onkogenní transformaci buňky, patří HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 (Jacobs et al., 1995). Vysoce rizikové genotypy HPV u žen způsobují nejčastěji karcinomy děložního hrdla. Dále také mohou způsobovat karcinomy vulvy, vagíny, řitního otvoru, dutiny ústní a orofarynxu. U mužů způsobuje intraepiteliální neoplazie, které se považují za předchůdce rakoviny penisu. Dále podněcuje vznik rakoviny hlavy a krku (Obr. 1). U většiny mužů probíhá infekce asymptomaticky (Ingles et al., 2015; Ondryášová et al., 2015). Mezi LR HPV řadíme např. HPV 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44/55, 54, 72, 81 genotypy způsobující benigní léze.



Obr. 1: HPV asociovaná nádorová onemocnění (Ondryášová et al., 2015).

HPV je malý, neobalený virus, jehož cirkulární dsDNA interaguje s histon-like proteiny. Povrch viru tvoří ikosaedrální kapsida složená z proteinů L1 (major capsid protein) a L2 (minor capsid protein). Genom HPV o velikosti přibližně 8000 pb obsahuje osm otevřených čtecích rámců (ORF – open reading frames), které se dělí do tří regionů. První z nich se nazývá dlouhá kontrolní oblast (LCR – long

control region), ve které se nachází většina regulačních sekvencí DNA potřebných pro replikaci a expresi virového genomu. Oblast E (early region) obsahuje geny pro proteiny regulující životní cyklus HPV viru. Poslední region genomu HPV oblast L (late region) nese geny pro L1 a L2 kapsidové proteiny (Obr. 2) (Fernandes et al., 2013). Pro replikaci viru je nezbytná E1 helikasa a E2 origin-binding protein, mezi jehož další funkce patří regulace transkripce virálních genů a zajištění správné segregace HPV episomu do dceřiných buněk během mitózy. V časně fázi HPV infekce E2 inhibuje transkripci onkoproteinů E6 a E7. Během maligní transformace však často dochází k integraci HPV DNA do lidského genomu, ztrátě E2 a zvýšení exprese E6 a E7 onkogenů (Hebner a Laimins, 2006; D'Abramo a Archambault, 2011).



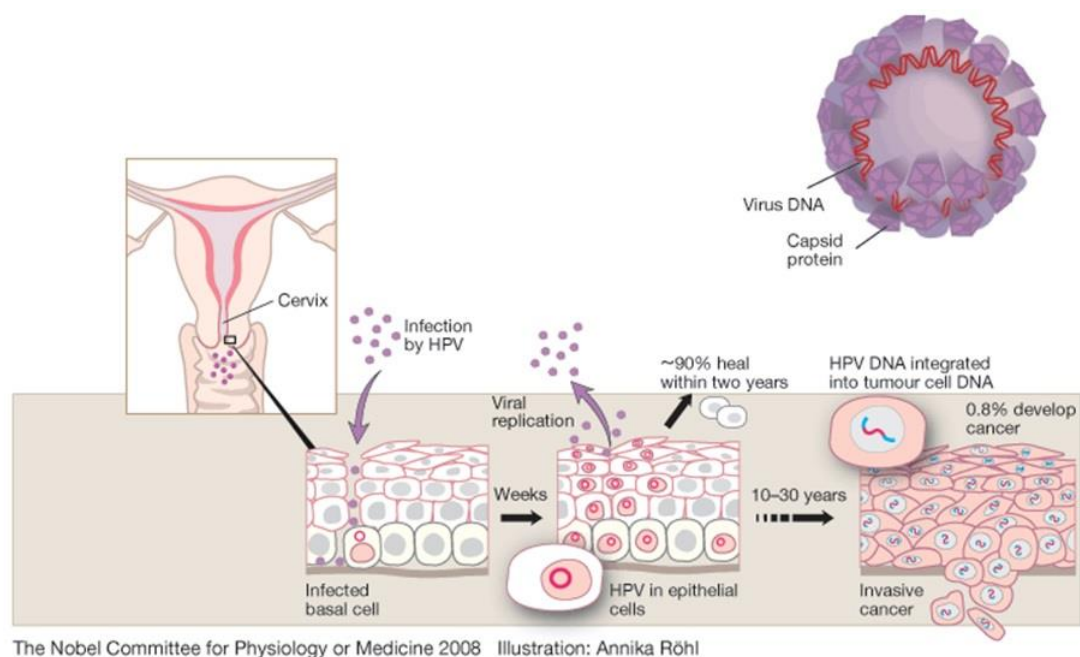
Obr. 2: Organizace genomu HPV. Schematické znázornění kruhového genomu HPV 16 ukazuje umístění časných (E) a pozdních genů (L1 a L2) a dlouhou kontrolní oblast (LCR). HPV genom kóduje osm proteinů, jejichž funkce jsou označeny. Jedná se o proteiny replikace viru E1 a E2 (fialová) a virové onkoproteiny E6 a E7 (zelená). Upraveno (D'Abramo a Archambault, 2011).

Onkogenní účinek HR HPV E6 proteinu spočívá ve vazbě na buněčný protein p53, který integruje odpověď buňky na různé druhy stresu (reaktivní formy kyslíku, poškození DNA, hypoxie), reguluje G1 a G2 kontrolní body buněčného cyklu a v případě neopravitelného poškození DNA indukuje apoptózu (Werness et al.,

1990). Vazba proteinu E6 na p53 vede k jeho degradaci ubikvitin-dependentní proteolýzou, ztrátě kontroly buněčné proliferace a destabilizaci genomu (Scheffner et al., 1990). Ke ztrátě kontroly buněčné proliferace vede také interakce E7 proteinu s pRb a příbuznými proteiny p107, p130. Vazba E7 na pRB indukuje jeho proteosomální degradaci a uvolňuje transkripční faktor E2F, buňka vstupuje do S fáze buněčného cyklu a ztrácí schopnost kontroly proliferace (Fields, 2001). Tvorba maligní lézí je u LR HPV potlačena, protože E6 protein LR HPV neindukuje degradaci p53 a protein E7 nedegraduje pRb (D'Abramo a Archambault, 2011; Chen et al., 2007).

3.2 Průběh HPV infekce

Průběh infekce HPV je obvykle bezpříznakový. Ve většině případů HR HPV infekce děložního čípku dochází k eliminaci infekce imunitním systémem během 1 až 18 měsíců. Tento proces se nazývá spontánní clearance (Sanjosé et al., 2007). Pokud je imunitní odpověď nedostatečná k eliminaci viru, dochází k dlouhodobé infekci, která může vést k vytvoření maligní léze (Obr. 3). Začátek životního cyklu HPV nastává poté, co virus získá přístup k nediferencovaným buňkám bazální membrány dlaždicového epitelu ektocervixu, pokud je tato oblast vystavena mechanickému nebo chemickému traumatu (Fernandes et al., 2013). I přes infekci HPV si buňky bazální membrány zachovávají schopnost diferenciaci, a tak poskytují vhodné prostředí pro množení virionů. K přenosu infekce dochází nejčastěji pohlavním stykem (orálně, vaginálně, análně) při kontaktu sliznic. Způsoby přenosu HPV u dětí jsou sporné. Zahrnují přenos perinatálně, auto a hetero inokulací, případně nepřímo prostřednictvím kontaminovaného předmětu (Puranen et al., 1997; Szydłowski et al., 2013).



Obr. 3: Vývoj infekce HPV. Po drobném traumatu sliznice virion proniká do buněk bazální membrány děložního čípku, kde se díky zachování diferenciace bazálních buněk dále množí a po několika letech se může rozvinout v maligní léze (The 2010 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Illustrated Information. Nobelprize.org. 6 Oct 2011).

3.2 Prevalence

Lidský papilomavirus (HPV) je jednou z nejčastějších sexuálně přenosných infekcí na celém světě (Bosch, 2013). Ačkoli je HPV infekce velmi běžná, její prevalence se v jednotlivých geografických regionech značně liší podle jejich úrovně rozvoje, socioekonomické situaci a především podle charakteristiky studované populace. V roce 2005 proběhla celosvětová studie Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer – IARC), ze které vyplývají až 20násobné rozdíly v celkové prevalenci HPV infekce mezi jednotlivými regiony. HPV prevalence standardizovaná dle věku byla přibližně 5krát vyšší v subsaharské Africe než v Evropě. V této studii byla zjištěna prevalence HPV infekce u žen bez cytologického nálezu 1,4-25,6 % celosvětově (Clifford et al., 2005). V Evropě se HPV infekce vyskytuje u 8,1 % žen (Sanjosé et al., 2007). V České republice proběhla v roce 2006 studie na přítomnost HPV infekce, ve které bylo zjištěno, že 23 % žen bez abnormálního cytologického nálezu na děložním čípku bylo pozitivních na HR HPV (Tachezy et al., 2006). Vrchol incidence infekce je v období bezprostředně po začátku sexuálního života. Ve věku 18-25 let dosahuje

45 % a více. Riziko infekce se zvyšuje s počtem sexuálních partnerů (Freitag, 2015; Giuliano et al., 2011).

Dunne et al. uvedl prevalenci HPV infekce u mužů 1,3-72,9 % v závislosti na místě odběru vzorku. Nejvyšší prevalence byla zjištěna ve stěrech z penisu (Dunne et al., 2006). Vysoká prevalence lidského papilomaviru u mužů výrazně zvedla zájem odborné společnosti, kvůli jeho možným důsledkům na mužskou plodnost. Podle posledních poznatků 7-16 % mužů léčených pro neplodnost je postiženo HPV infekcí spermatu (Schillaci et al., 2013; Laprise et al., 2013).

V souvislosti s možným vlivem HPV na plodnost v ženské populaci Hermonat et al. v roce 1997 provedl studii, která hodnotí přítomnost HPV DNA u 25 spontánních potratů, z nichž 15 (60 %) bylo pozitivních na HPV E6/E7 sekvenci. Po podstoupení ART (Assisted reproductive technology – asistovaná reprodukce), byl výskyt potratů výrazně vyšší u párů, kde jeden nebo oba partneři byli HPV pozitivní ve srovnání s neinfikovanými páry (Pereira et al., 2015).

3.3 HPV a možný vliv na plodnost

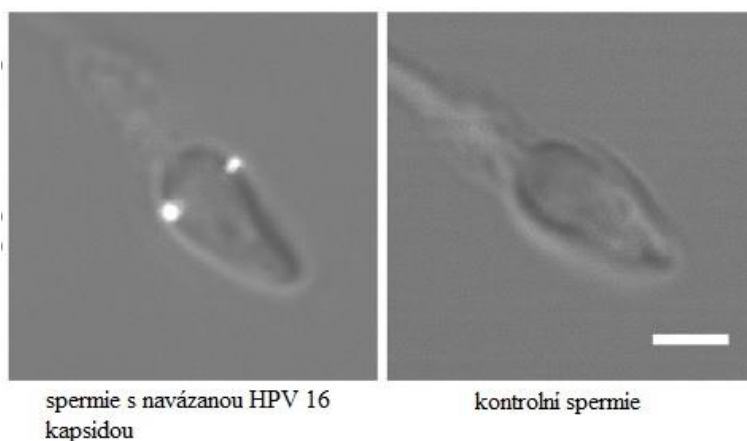
Světová zdravotnická organizace (World Health Organization – WHO) definuje neplodnost jako neschopnost sexuálně aktivních partnerů dosáhnout spontánního těhotenství do jednoho roku bez použití antikoncepce (Zegers-Hochschild, 2009). Neplodnost je problém globálních rozměrů, který ovlivňuje 8 – 12 % párů na celém světě (Daar a Merali, 2002). Je všeobecně známo, že sexuálně přenosné infekce jako *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* mohou vést ke změnám plodnosti nebo dokonce k neplodnosti. Vliv některých sexuálně přenosných virových infekcí jako HIV (Human immunodeficiency virus), cytomegalovirus, herpes simplex virus nebo HPV na plodnost není zcela objasněn (Souho et al., 2015; Pereira et al., 2015).

U párů léčených pro neplodnost, které podstupují asistovanou reprodukci, nedochází k testování přítomnosti HPV DNA, stejně tak nejsou testováni dárci spermií nebo dárkyně oocytů. U mužů je pouze vyšetřen spermioqram a u žen se provádí testování hladiny hormonů, ovulační testy a vyšetření dělohy. Dárce gamet jsou testováni na přítomnost HIV, Hepatitidu B a C nebo *Chlamydia trachomatis* (WHO, 2002). Diskutovaným tématem je testování dárců spermií nebo dárkyní oocytů na přítomnost HR HPV, kvůli možným rizikům spojených s ART (Calinisan et al., 2002; Gizzo et al., 2014).

3.3.1 HPV a neplodnost u mužů

U mužů byla HPV infekce detekována na povrchu penisu, v ejakulátu, močové trubici nebo šourku. Giuliano et al. zjistil nejvyšší prevalenci HPV infekce u mužů na povrchu penisu (49,9 %). Ve vzorcích ejakulátu byla prevalence HPV nejnižší (5,3 %) (Giuliano et al., 2007). Nejsnazší anatomické místo pro odběr vzorku je žalud penisu. Právě kvůli neinvazivitě odběru a vysokému zachytu HPV infekce byl pro zjištění HPV prevalence u mužů použit stěr z penisu. HPV prevalence ve stěrech z penisu byla porovnána s prevalencí HPV infekce v ejakulátu, kvůli možnému vlivu na plodnost (Dunne, 2006).

Ačkoli předchozí výzkumy prokázaly přítomnost HPV DNA na povrchu penisu, v močové trubici, varleti a nadvarleti, jen málo studií se zabývalo výskytem HPV DNA ve spermatu, což může úzce korelovat s neplodností. Předpokládá se, že HPV se váže na dvě různá místa podél ekvatoriální oblasti hlavičky spermie, jejíž akrozom obsahuje glykosaaminoglykany, které mohou zprostředkovávat navázání HPV na spermii. Nedávné důkazy naznačují, že L1 HPV kapsidový protein a glykosaminoglykan, syndekan-1 se nachází v ekvatoriální oblasti hlavičky spermie, ale kompletní mechanismus vazby viru na spermii zatím není zcela objasněn (Obr. 4) (Pereira et al., 2011; Foresta et al., 2011).



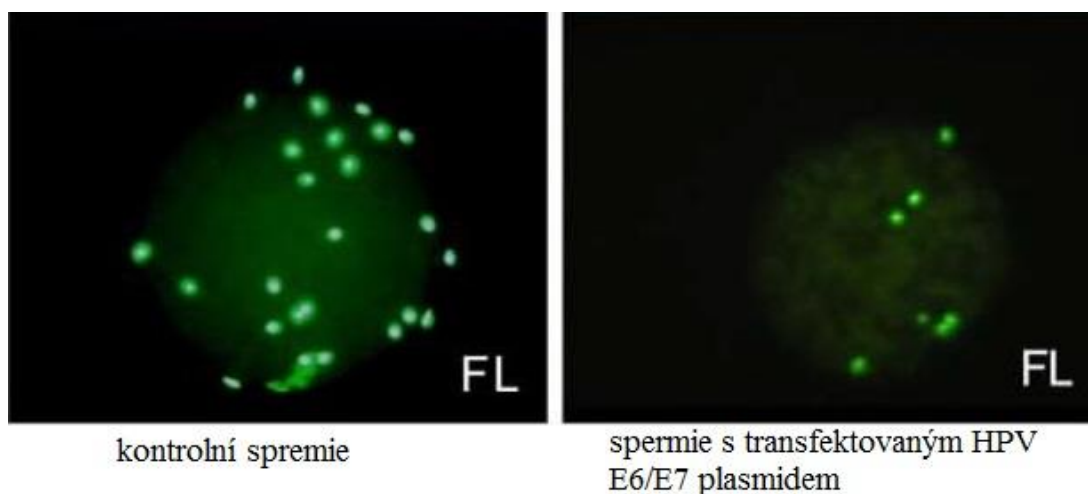
Obr. 4: Kapsidy HPV 16 navázané v ekvatoriální oblasti živých spermií. Vlevo jsou viditelné kapsidy kumulované konkrétně ve dvou ohnicích v ekvatoriální rovině hlavičky spermie (Pérez-Andino et al., 2009).

Byl prokázán vliv infekce lidského papilomaviru na kvalitu spermatu. Většina studií se jednoznačně shoduje, že HPV způsobuje sníženou motilitu spermií (Foresta et al., 2015). HPV infekce byla také spojena se sníženou životaschopností spermií, sníženým počtem morfologicky normálních spermií a zvýšenou hladinou protilátek proti spermiím (ASA – antisperm antibodies). *In-vitro* experimenty také prokázaly, že HPV může způsobit fragmentaci DNA. Po expozici spermie genotypům HPV 16 a HPV 31 došlo k její apoptóze, tak jako u somatických buněk, avšak vystavením spermie genotypům HPV 18, 33 nebo HPV 6 a HPV 11 nebyla fragmentace DNA pozorována. Genotypy HPV 6, 11, 16 ovlivňují morfologii hlavičky spermie. Ale v prostředí *in-vivo* tento proces není potvrzen (Souho et al., 2015; Connelly et al., 2001). Dalším neméně důležitým faktorem, který má vliv na pohlavní buňky je přítomnost ASA, jejichž produkce je pravděpodobně stimulována přítomností HPV DNA. ASAs se váží na spermii velice pevně a mohou způsobovat její přímé poškození, abnormální složení semenné plazmy nebo ovlivňovat mitochondriální funkci. Prevalence ASAs je vyšší u pacientů léčených pro neplodnost, tudíž jejich přítomnost může být spojena s redukovanou motilitou spermií (Garolla et al., 2013). Dodnes je jen málo známých informací o vlivu infekce HPV na sperma, jejich klinických důsledcích, clearance nebo o možné změně autoimunity spermie.

3.3.2 HPV a neplodnost u žen

HPV vázán na spermii může svou genetickou informaci exprimovat v oplozeném vajíčku a způsobit jeho apoptózu. U myších experimentů *in-vitro* a v *in-vivo* lidských modelech bylo zjištěno, že HPV genom je exprimován v oplodněném oocytu, blastocystě a trofoblastu buňky (Gizzo et al., 2014). Virový genom by mohl vyvolat buněčné změny, jako je inhibice růstu zygoty, snížení vývoje blastocysty, inhibice procesu formování blastocysty, fragmentace DNA a apoptózu. HPV infekce by tedy mohla mít fatální dopad na časný vývoj embrya (Calinisan et al., 2002; You et al., 2002). Nejvyšší míra fragmentace DNA a apoptózy myší blastocysty byla zaznamenána po expozici HPV 16. Další výzkumy proběhly hamster egg penetration testem, které prokázaly schopnost spermie transferovat kapsidový protein L1 a také geny *E6/E7* viru s jejich následnou expresí v blastocystě (Obr. 5). Byly použity oocyty křečka a lidské spermie s transfektovaným plasmidem pIRES2-AcGFP1-E6E7. HPV infikované spermie byly schopny proniknout do oocytu a exprimovat v

něm virové geny (Foresta et al., 2011). Mechanismus interakce oocyty s genomem HPV není dosud zcela objasněn (Noventa et al., 2014).



Obr. 5: Oocyt samice křečka penetrován kontrolními spermii a transfektovanými spermii HPV16 E6/E7 plasmidem. Zobrazení fluorescenčně pomocí SYBR zelené DNA sondy (Foresta et al., 2011).

Negativní vliv na ženskou plodnost může mít také přítomnost HPV v buňkách trofoblastu. Lidský papilomavirus interagující s buňkami trofoblastu může způsobit vytvoření abnormální placenty (Gomez et al., 2008). You et al., provedla demonstraci, ve které dokázala, že buňky trofoblastu např. dlaždicový epitel jsou velice permissivní k HPV a vykazují určitou podobnost v expresi genů. Zjistila expresi genů (*E1* i *L1*) viru v 3A buňkách trofoblastu kultivovaných s HPV 16. Kromě toho také objevila v různých studiích *in-vitro*, že E6 a E7 onkogeny způsobily jednak pokles počtu 3A buněk trofoblastu, jednak nízkou přilnavost trofoblastu k endometriu v prvním týdnu po expozici. Příčinou snížené invazivity buněk trofoblastu může být negativní regulace E-cadherinem (základní protein pro adhezi buňka-buňka) v buňkách exprimujících genom HPV 16 (Boulenouar et al., 2010). Toto zjištění, že HPV může ovlivňovat životní cyklus buněk trofoblastu, přispělo k potvrzení hypotéz mezi souvislostí HPV infekce a spontánním potratem.

3.3.3 HPV u dětí

Lidský papilomavirus byl detekován také u dětí, ale způsob přenosu infekce HPV není zcela objasněn. Za nepohlavní přenos se považuje perinatální vertikální přenos, fyzický kontakt a autoinokulace (Szydłowski et al., 2013). Dobře

zdokumentován je vertikální přenos HPV z matky na dítě. V děloze by mohlo dojít k infekci skrze infikovaný porodní kanál nebo hematogenně přes placentu. HPV DNA byla zjištěna v plodové vodě, plodových obalech, trofoblastu buněk placenty a u dětí narozených jak císařským řezem, tak i spontánním porodem (Rintala et al., 2005). LR HPV 6 a HPV 11 způsobují u dětí rekurentní respirační papilomatózu (RRP). Toto onemocnění patří mezi nejčastější benigní karcinomy hrtanu u dětí (Bosch, 2013; Derkay, 2001). RRP je spojena s vertikálním přenosem z matky na dítě během porodu skrze infikovaný porodní kanál (Szydłowski et al., 2013). Některé studie ukázaly, že většina dětí se narodila matkám, které prodělaly genitální kondylomata (Tai et al., 2012). Stejně jako u mužů a žen, HPV u dětí infikuje dlaždicový epitel sliznic a zapříčiňuje vznik genitálních bradavic (Syrjanen a Puranen, 2000).

3.4 Prevence

HPV jako bezpříznaková infekce s inkubací 1-8 měsíců je nejčastěji spojována s karcinomem děložního čípku. Rakovina děložního čípku je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění u žen s vysokou mortalitou. V České republice je každý rok nově diagnostikováno přes 1000 nových případů karcinomu cervixu a přibližně 400 pacientek s touto diagnózou ročně zemře (Ondryášová et al., 2013).

V rozvojových zemích je nejvyšší procento nejen infikovaných žen, ale také nejvyšší počet úmrtí na karcinom cervixu, ve srovnání s vyspělými zeměmi, proto je velice potřebné zavedení HPV DNA screeningu a rozvoj metod identifikace HPV (Freitag, 2006).

Nejúčinnější a nejlevnější prevencí proti všem onkologickým chorobám je informování veřejnosti o rizicích jejich vzniku a možnostech změn životního stylu (Holubová, 2007). Prevence se rozděluje na primární a sekundární.

- Primární – cílem primární prevence je zamezení vzniku nemoci. V případě HPV se jedná konkrétně o omezení počtu sexuálních partnerů. Ideálně však sexuální abstinence. Použití kondomu při pohlavním styku pouze snižuje riziko, ale nezamezuje přenosu infekce. Do primární prevence se také řadí očkování proti HPV. Jako primární prevence proti HPV je nejjednodušší dodržování zdravého životního stylu a posílení imunity (Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

- Sekundární – má za úkol včasný záchyt prekanceróz. Díky sekundární prevenci dochází k odhalení dysplastických změn v raných stádiích a dává možnost včasné léčbě se zvýšenou pravděpodobností jejího úspěchu. Za sekundární prevenci se v případě HPV považuje pravidelný gynekologický screening (Schiffman a Castle, 2005).

3.4.1 Vakcinace

Očkování proti HPV je určeno především pro adolescentní dívky, které ještě neměly pohlavní styk (Tab. 1). V současnosti je také velice často diskutován význam očkování chlapců, aby se předešlo přenosu HPV při pohlavním styku z ženy na muže a naopak. Další aspektem proč očkovat chlapce nebo muže by mohla být možná souvislost HPV s neplodností. V dnešní době je vakcinace poměrně dobře dostupná a také hrazená pojišťovnamy pro dívky ve věku mezi 13-14 lety. Očkovací látky jsou připraveny na bázi virus-like particles (Burk et al., 2009). Aktuálně používané vakcíny chrání proti hlavním rizikovým typům HPV 16 a HPV 18, které jsou příčinou asi 70 % rakoviny děložního hrdla. Klinické testování úspěšně ukončily tři vakcíny. Poměrně krátkou dobu je na trhu nonavalentní vakcína.

- Cervarix – bivalentní rekombinantní vakcína proti HR HPV 16 a 18. Zajišťuje prevenci karcinomu děložního čípku (Schejbalová, 2011).
- Silgard – tetravalentní rekombinantní vakcína proti LR HPV 6 a 11 a HR HPV 16 a 18. Zajišťuje prevenci nejen karcinomu děložního čípku, ale také genitálních bradavic a vaginálních a cervikálních prekanceróz (Chlíbek et al., 2011).
- Gardasil 9 – nonavalentní vakcína proti HPV genotypům 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58 a pro prevenci genitálních bradavic způsobených genotypy HPV 6 a 11. Tato vakcína má potenciál prevence karcinomu děložního čípku až 90 %. Je určena nejen pro dívky a ženy, ale také pro chlapce ve věku 9-15 let (Kirby, 2015).

Tab. 1: HPV proočkovanost věkových skupin českých dívek (převzato z www.vakciny.net)

% Proočkovanost ve věkových skupinách	2007	2008	2009	2010
<11 let	0,2	0,4	0,4	0,3
11-15 let	3,9	8,6	10,3	9,2
15-20 let	3,3	9,1	15,4	21,1
21-26 let	0,9	2,3	3,5	4,6

3.4.2 Screening

V České republice je screening karcinomu děložního hrdla upravován věstníkem ministerstva zdravotnictví č. 07/2007. Jedná se o pravidelný odběr stěrů z děložního hrdla gynekologem, alespoň jednou ročně u dospělých žen. Screening se provádí za účelem odhalení dysplázie nebo časných stádií karcinomu děložního čípku a tím cílené snížení morbidit a mortality. Ačkoli je vyšetření cervikální cytologií plně hrazeno pojišťovny, k preventivní gynekologické prohlídce se dostaví pouze přibližně 55 % žen (Májek, 2013). Nejvyšší procento karcinomu děložního hrdla se vyskytuje u žen, které nedodrží pravidelné návštěvy u gynekologa.

Cervikální cytologie je v současnosti nejpoužívanější screeningovou metodou. Pomocí Pap (Papanicolaou) testu nebo pokročilejší LBC (liquid-based cytology) dochází k odběru stěru z děložního čípku a určení konkrétního stavu epitelu cervixu. V případě Pap testu je stěr z děložního čípku nanesen na sklo, fixován, barven dle Papanicolaou a poté hodnocen cytologickou laboratoří podle platného systému Bethesda 2001. LBC zvyšuje senzitivitu vyšetření odstraněním rušivého vlivu krve či hlenu při klasickém Pap testu, test je navíc lépe hodnotitelný díky rovnoměrnému rozmístění buněk v jedné vrstvě a je použitelný k dalšímu testování, např. k HPV DNA diagnostice (Ondryášová et al., 2013). Nevýhodou cervikální cytologie je nízká senzitivita detekce premaligních lézí 50-70 % a vysoké procento falešně negativních nálezů. Opakování testování cytologie po 12 měsících ukázalo nejvyšší pozitivní prediktivní hodnotu v kombinaci s vysokou negativní prediktivní hodnotou (NPV) pro CIN3 +. Z tohoto důvodu je doporučeno připojení HPV DNA screeningu, který má vyšší senzitivitu (Dijkstra et al., 2014).

3.4.3 HPV DNA screening

Testování založené na diagnostice HPV DNA ve vzorcích je dnes pouze doplňkové. V současné době jsou k HPV DNA diagnostice zasílány pouze případy s abnormální cytologií s neznámým významem (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), vyskytující se přibližně u 4 % případů (Arbyn et al., 2010). Potřebu a přínos HPV DNA diagnostiky potvrdila studie ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics). V této studii byly srovnány výsledky LBC a HPV DNA testů u 47 000 žen. ATHENA ukázala na vyšší citlivost HPV DNA diagnostiky na úkor nižší specifity oproti LBC, která byla pravděpodobně ovlivněna zařazením žen nižších věkových skupin (Wright et al., 2011). Výskyt HPV je nejčastěji u žen ve věku 18-25 let. S ohledem na clearance viru má smysl testovat ženy, které jsou starší 30 let. HPV testování poskytuje velmi vysokou negativní prediktivní hodnotu (NPV), která při souběžném použití cytologie umožňuje prodloužit screeningový interval až na 6 let (Dillner et al., 2008; Ondryášová et al., 2013).

HPV DNA testy umožňují detekovat pouze HR HPV DNA nebo jednotlivé genotypy HPV. Testy detekující HPV DNA jsou většinou založeny na PCR reakci. Principem PCR reakce je použití specifických primerů, které se váží na různé části DNA. Nejčastěji používané primery jsou MY09/MY11, GP+/6+, SPF10 (detekce genu *L1*), CP primery (detekce HPV genu *E1*) nebo pU primery (detekce genu *E6/E7*) (Baay et al., 1996; Hermonat, 1997). Pomocí primerů je možno detekovat pouze přítomnost HPV DNA, ale nelze identifikovat jednotlivé genotypy. Pro genotypizaci jsou nejčastěji použity metody založené na značení primerů (biotin) a následné ELISA reakci (enzyme-linked immunosorbent assay, enzymaticky značená imunoanalýza), real-time PCR se značenými próbami, popř. hybridizaci PCR produktů se specifickými oligonukleotidovými próbami fixovanými na stripu (line blot) nebo čipu (microarray) (Ondryášová et al., 2013).

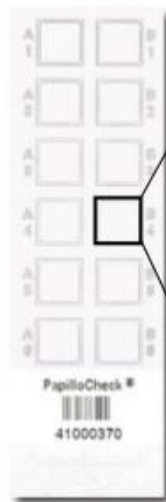
V experimentální části této práce byly k detekci HPV DNA použity HPV DNA testy firem Roche a Greiner Bio-one. Obě metody jsou validovány k použití v klinických laboratořích. Cobas[®] 4800 HPV test je poloautomatizovaný. Vyhodnocení probíhá bez vnějšího zásahu operátora, a tak dochází k maximální eliminaci chyb způsobené lidským faktorem.

Cobas[®] 4800 HPV test je založený na automatizované izolaci DNA ze vzorku pomocí magnetických částic. Dále je založen na real-time PCR se specifickými

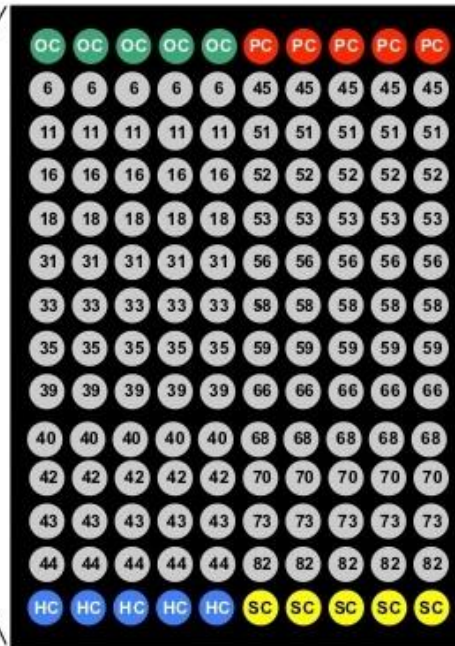
fluorescenčně značenými sondami, které jsou značeny 4 různými barvami, pro HPV 16, HPV 18, pro ostatní HR HPV genotypy a pro interní kontrolu. Oligonukleotidové sondy se váží na *L1* oblast HPV genomu. Jako interní kontrola slouží gen pro β -globin. Detekce probíhá pomocí analyzátoru cobas z 480, který využívá fluorescenčního signálu k detekci amplifikované nukleové kyseliny pomocí metody real-time PCR (Roche Molecular Diagnostics, 2011).

PapilloCheck HPV-Screening[®] se provádí metodou PCR, dále nanesením na čip, kde probíhá hybridizace PCR produktů se specifickými DNA próbami. Detekuje fragment *E1* genu HPV genomu. Jako kontrola slouží *ADAT1* (human tRNA-specific adenosine deaminase 1). Nakonec je PapilloCheck[®] čip (Obr. 6) automaticky skenován, analyzován a vyhodnocován pomocí dvou barevného laserového skeneru (excitační vlnové délky 532 nm a 635 nm), který umožňuje detekci fluorescenčního signálu generované přítomností HPV specifických amplifikačních produktů, stejně jako kontroly (Gmbh, 2011). Do PCR reakce je přidáván enzym UNG (Uracil N-glycosylase), které zabraňuje carry-over kontaminaci. Štěpí PCR produkt a zabraňuje reamplifikaci PCR produktu (Gmbh, 2011).

KONTROLA ORIENTACE
PRO OPTIMÁLNÍ ANALÝZU



HYBRIDIZAČNÍ
KONTROLA



PCR KONTROLA

GENOTYPOVĚ
SPECIFICKÉ HPV
DNA SONDY V 5
OPAKOVÁNÍCH

KONTROLA VZORKU

Obr. 6: Nákres čipu PapilloCheck®. Znáznorněna hybridizační kontrola, PCR kontrola, kontrola vzorku a HPV DNA sondy. PCR kontrola a kontrola vzorku skenována laserem o excitační vlnové délce 635 nm (červená oblast), zatím co hybridizační kontrola je skenována laserem o excitační vlnové délce 532 nm (zelená oblast). Upraveno (Gmbh, 2011).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této části práce byly vyšetřovány vzorky 64 párů léčených pro neplodnost, 20 dárců spermatu a 16 dárkyní oocytů na přítomnost HR HPV a LR HPV pomocí HPV DNA testů cobas[®] 4800 HPV a PapilloCheck HPV-Screening[®]. Oba testy jsou validovány pro použití v klinických laboratořích. Srovnání základních parametrů použitých metod je shrnuto v tabulce 2. Výhodou PapilloCheck[®] HPV-Screening testu je detekce jednotlivých genotypů lidského papilomaviru s vysokou specifitou (Gmbh, 2011). V případě cobas[®] 4800 HPV testu je výhodou také částečná automatizace celého procesu a tím rychlejší zpracování většího množství vzorků s minimalizací lidského faktoru. Problémem většiny HPV DNA testů může být jejich cílení na HPV gen *L1*. Při integraci viru do lidského genomu v některých případech dochází k rozpadu fragmentu *L1*. V těchto případech je možnost falešné negativity výsledků, a tak může dojít k opominutí nejzávažnějších případů (Morris, 2005; Vinokurova et al., 2008; Walboomers et al., 1999).

Tab. 2: Porovnání základních parametrů použitých HPV DNA detekujících metod.

HPV test	cobas [®] 4800 HPV test	PapilloCheck HPV-Screening [®]
Detekované typy HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44/55
Princip testu	real-time PCR, fluorescenčně značené sondy	PCR, nanesení na čip, hybridizace a detekce fluorescence scannerem
Detekovaný HPV gen/ interní kontrola kvality DNA	<i>L1</i> / gen pro β -globin	<i>E1/ ADAT1</i>
Senzitivita/specifita (\geq CIN2) [%]	92,9/71,0	95,8/96,7

4.1 Materiál a pomůcky

Odběrové médium cobas[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), QIAamp[®] DNA Micro Kit (proteináza K, AL pufr, AW1 pufr, AW2 pufr, QIAamp MinElute kolonka) (Quiagen), PBS, 96% ethanol, RNA free voda, cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit (MGP, eluční pufr) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit (WB pufr) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), cobas[®] 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit

(proteináza K, SDS, lytický pufr) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), cobas[®] 4800 HPV Amplification/Detection Kit (HPV master mix, HPV Mg/Mn) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), cobas[®] 4800 HPV Controls Kit (HPV pozitivní kontrola, HPV negativní kontrola) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), špičky CO-RE, zásobník na činidla 50 ml a 200 ml, extrakční destička pro systém cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), mikrotitrační destička a zalepovací folie pro systém cobas[®] 4800 0,3 ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), extrakční destička pro systém cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), PapilloCheck[®] test kit (PCR masterMix, slidebox, hybridizační pufr, pufr A, pufr B) (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), oCheck[®] DNA Extraction Kit - CheckExtractor[™] (Taq Polymeráza: HotStarTaq[®] DNA Polymerase 5 U/μl (Qiagen), Uracil-N-Glycosylase: Uracil-DNA Glycosylase 1 U/μl (Fermentas), čipy PapilloCheck[®] (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), PCR stripy, oCheck[®] hybridizační komůrka (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), magnetický držák, oCheck[®] promývací box (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), zkumavky, mikrozukavky 1,5 ml Eppendorf, odměrné válce, pipety, kádinky, špičky s filtrem, pinzety, stojan na zkumavky, cervikální kartáčky, vatové tyčinky

4.2 Přístrojové vybavení a software

centrifuga, minicentrifuga, vortex mixer, termostat, vodní lázeň, analyzátor cobas[®] z 480, zařízení cobas[®] x 480, kontrolní jednotka systému cobas[®] 4800 se softwarem verze 1.0 nebo vyšší, cobas[®] 4800 Work Order Editor verze 0.2.9.0912 nebo vyšší, cycler, Check[™] scanner, CheckReport[™] Software Basic, CheckReport[™] Software PapilloCheck[®] plugin, centrifuga na čipy, Veriti[™] Thermal Cycler

4.3 Použité chemikálie

AL pufr	součástí kitu
AW1 pufr	25 ml 96% ethanolu + 19 ml koncentrátu promývacího pufu AW1
AW2 pufr	30 ml 96% ethanolu + 13 ml koncentrátu promývacího pufu AW2

MGP	93 % izopropanol
EB pufr	pufr Tris-HCl; 0,09 % azid sodný
WB pufr	dihydrát citrátu sodného; 0,05 % N-metylizotiazolon HCl
Proteináza K	pufr Tris-HCl; < 0,05 % EDTA; glycerol; chlorid vápenatý; octan vápenatý; < 2 % proteináza K
SDS	pufr Tris-HCl; 0,2 % SDS; 0,09 % azid sodný
LYS	pufr Tris-HCl; 37 % guanidin HCl; < 5 % polydokanol
HPV MMX	tricinový pufr; octan draselný; hydroxid draselný; glycerol; < 0,13 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP; < 0,01 % upstream a downstream HPV primery; < 0,01 % upstream a downstream β -globin primery; < 0,01 % fluorescenční HPV sondy; < 0,01 % fluorescenční β -globin sondy; < 0,10 % EagleZ05 [®] DNA polymeráza (mikrobiální); < 0,10 % AmpErase (uracil-N-glykozyláza) enzym (mikrobiální); 0,09 % azid sodný
HPV Mg/Mn	octan hořečnatý; octan manganatý; < 0,02 % ledová kyselina octová; 0,09 % azid sodný
HPV (+) C	pufr Tris-HCl; EDTA; 0,05 % azid sodný; < 0,002 % poly rA RNA (syntetická); < 0,001 % neinfekční plasmid DNA (mikrobiální) obsahující HPV sekvence 16, 18, 39; < 0,001 % neinfekční plasmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvence lidského β -globinu
HPV (-) C	pufr Tris-HCl; EDTA; 0,05 % azid sodný; < 0,002 % poly rA RNA (syntetická)
PCR MasterMix	součástí kitu
Hybridizační pufr	25 – 50 % roztok guanidin thiokyanátu
Taq Polymerase (HotStarTaq [®])	DNA Polymerasa 5 U/ μ l
Purifikační pufr A	součástí kitu
Purifikační pufr B	součástí kitu
PBS pufr	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 8 mM KH ₂ PO ₄ , (pH 7,3)
96% ethanol	

DEPC voda

Uracil-N Glycosylasa Uracil-DNA Glycosylasa 1 U/ μ l

odběrové médium Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.
cobas® PCR Cell
Collection Media

4.4 Etická hlediska

Tato bakalářská práce byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací, podle návrhu studie schváleného Etickou Komisí Lékařské fakulty a Zubního lékařství Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas k využití odebraných vzorků pro výzkumné projekty a vyplnili dotazník zaměřený na jejich zdravotní stav a sexuální chování.

4.5 Pacientské vzorky

K vyšetření přítomnosti HPV byly u žen použity stěr z děložního čípku, u mužů stěr z penisu a zároveň ejakulát. Cervikální stěry byly provedeny při gynekologickém vyšetření. Po provedení stěru byl odběrový kartáček vložen do odběrového média cobas® PCR cell collection Media a vzorky byly skladovány při pokojové teplotě. Stěr z penisu byl proveden mužem otřením vatové štětičky 3x dokola v oblasti *coronal sulcus* a *corona glandis*. Stěr z penisu byl po vložení štětičky do zkumavky eppendorf s 0,5 ml odběrového média cobas® PCR cell collection Media skladován při pokojové teplotě. Sperma bylo získáno při standardním vyšetření spermogramu pro neplodnost nebo při darování. Až do provedení testů byly vzorky spermatu uchovávány v odběrovém médiu při pokojové teplotě. Celkem bylo poskytnuto 64 vzorků mužů a žen z neplodných párů, 20 vzorků dárců spermatu a 16 vzorků dárkyní oocytů. Pacientské vzorky byly dále zpracovány dle postupu uvedeného v následující kapitole.

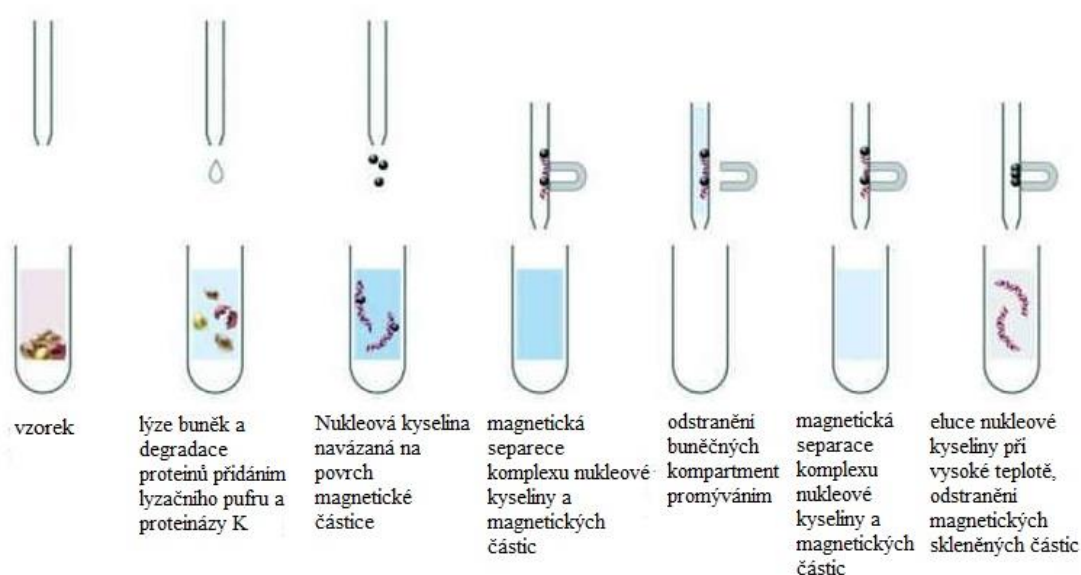
4.6 Použité metody a pracovní postupy

Proces testování vzorků párů léčených pro neplodnost a dárců gamet na přítomnost HPV DNA se skládal z izolace DNA, amplifikace cílové HPV DNA pomocí PCR a detekce PCR produktů. Vyhodnocení výsledků HPV vyšetření

a dotazníkového šetření proběhlo statistickými metodami za použití testů McNemar, Wilcoxon, Fisherova testu a studentova t-testu.

4.6.1 Izolace DNA z ejakulátu a cervikálních stěrů

DNA z ejakulátu a stěrů děložního čípku byla izolována automaticky pomocí cobas[®] x 480. Simultánní extrakce HPV a buněčné DNA založená na magnetických částicích je součástí Cobas 4800[®] HPV testu (Obr. 7). Po skončení izolace DNA byla DNA z extrakční destičky přepipetována pomocí magnetické podložky do zkumavek eppendorf.



Obr. 7: Princip izolace DNA pomocí magnetických částic přístrojem cobas x 480 (<https://lifescience.roche.com/shop/products/magna-pure-lc-20-instrument>).

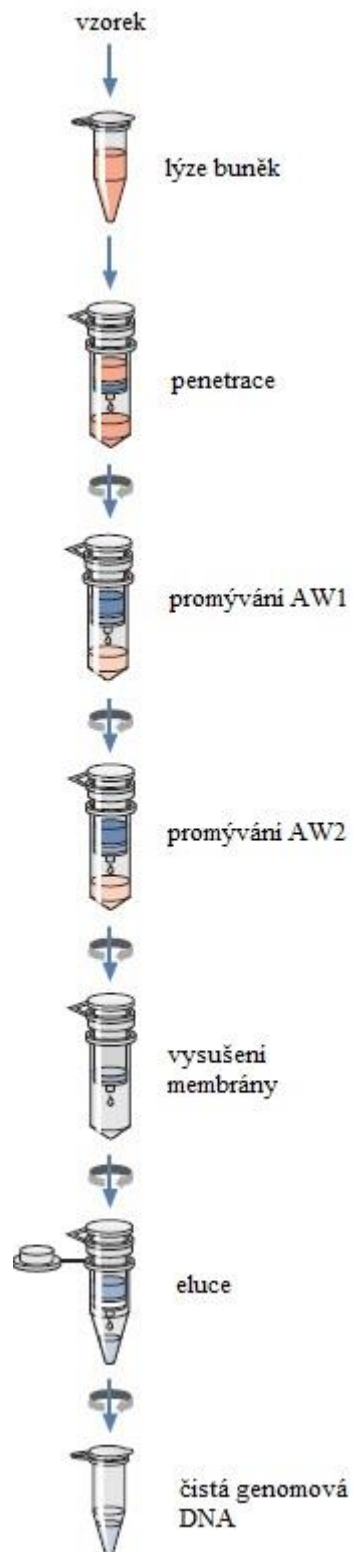
4.6.2 Izolace DNA ze stěrů z penisu

Základním zpracováním vzorku stěrů z penisu byla izolace DNA. Pro izolaci DNA byl použit QIAamp[®] DNA Micro Kit (QIAGEN[®]).

Prvním krokem izolace DNA bylo odmytí fixačního roztoku. Vzorky byly centrifugovány při 11 000 g 5 minut. Po odpipetování eluátu bylo přidáno 500 μ l pufru PBS. Vzorky byly opět centrifugovány při 11 000 g 5 minut. V dalším kroku byl odpipetován eluát na konečný objem 100 μ l. Lýze buněk byla docílena přidáním 10 μ l proteinázy K, která způsobuje narušení buněčných membrán a následný rozpad buňky a také velmi účinné štěpení DNáz, jež by mohly izolovanou DNA degradovat.

A také přidáním 100 μ l AL pufru (lyzační). Následně došlo k vortexování po dobu 15 sekund a inkubaci vzorků v termostatu při 56°C 10 minut. Poté by kapka na víčku a stěnách zkumavky odstraněny pulzním stočením na minicentrifuze,

Další částí izolace DNA bylo vysrážení DNA pomocí 50 μ l 96% ethanolu, který nebyl součástí kitu. Lyzát byl s 96% ethanolem vortexován 15 sekund, inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě pulzně centrifugován na minicentrifuze. Lyzát byl následně přepipetován do 2 ml zkumavek obsahujících kolonku s membránou (QIAamp®). Nukleová kyselina byla adsorbována na silikagelovou membránu při centrifugaci (1 minuta při 6000 g). Zatímco DNA zůstala vázaná k membráně kolonky, kontaminanty se účinně vymyly nejprve přidáním 500 μ l promývacího pufru AW1 a poté přidáním 500 μ l promývacího pufru AW2. Po přidání promývacího pufru AW1 a AW2 byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 6000 g. Po centrifugaci byly sběrné zkumavky pod kolonkou vyměněny za nové. Membrána kolonky byla vysušena centrifugací (3 minuty při 20 000 g). Konečnou částí izolace byla eluce DNA z membrány kolonky do 40 μ l DEPC vody, která byla na kolonce inkubována 5 minut při laboratorní teplotě (15 – 25°C). Následovala centrifugace 1 minutu při 20 000 g. DNA byla do analýzy (maximálně týden) skladována při 5°C a následně při -20°C. Postup je graficky znázorněn na Obr. 8.



Obr. 8: Schéma manuální izolace DNA založené na adsorpci DNA na silikagelovou membránu (Qiaamp et al., 2004).

4.6.3 HPV DNA testy

4.6.3.1 PCR

PCR potřebná pro provedení analýzy pomocí PapilloCheck HPV-Screening[®] byla provedena na Veriti[™] Thermal Cycler. PCR je založena na denaturaci DNA, nasednutí specifických primerů a amplifikaci cílové nukleové kyseliny. Získané amplikony byly následně hybridizovány na čip. Real-time PCR byla provedena cobas z 480 (Roche). Real-time PCR se liší od PCR současnou kvantifikací PCR produktu během amplifikace.

4.6.3.2 Cobas 4800[®] HPV test

Systémem cobas[®] 4800 (Roche) byla automaticky izolována DNA z ejakulátu a stěrů z děložního čípku. *L1* gen 14 HR HPV a gen pro β -globin (interní kontrola) byly amplifikovány a detekovány analyzátozem cobas z 480. V rámci jedné analýzy bylo vyšetřeno 22 patientských vzorků, pozitivní a negativní kontrola, které byly součástí diagnostického kitu. Práce se systémem:

- cobas x 480 (příprava vzorků): Po zapnutí systému byla dle požadavků provedena denní nebo týdenní údržba. Poté byly do přístroje vloženy vzorky, reagentie, špičky a destičky dle instrukcí softwaru. Po automatické izolaci DNA byla softwarem ověřena úspěšnost extekce DNA. Destička s DNA jednotlivých vzorků a reagentiemi pro real-time PCR byla přelepena ochranou folií přesunuta do cobas z 480, kde proběhla amplifikace a detekce cílových genů pomocí real-time PCR. Na závěr byly výsledky analýzy zkontrolovány a schváleny operátorem. Vyhodnocení výsledků probíhalo zcela automaticky bez možnosti manipulace operátora.
- Po skončení izolace DNA byla zbylá DNA za pomoci magnetické podložky přepipetována z extrakční destičky do zkumavek eppendorf. Tato DNA byla následně použita pro HPV DNA detekci PapilloCheck[®] HPV Screeningem.

4.6.3.3 PapilloCheck[®] HPV Screening

V první kroku byl připraven mix reagentií pro PCR reakci dle tabulky 3. MasterMix byl krátce vortexován a stočen. Uracil-N-Glykosylasu bylo nezbytné naředit DEPC vodou (1:200) vždy čerstvou. K 21 μ l mixu reagentií pro PCR bylo přidáno 5 μ l vyšetřované DNA, která byla promíchána pipetováním. Po

centrifugaci (800 g, 30 s) byly vzorky vloženy do termocycleru, kde proběhla PCR. Spolu se vzorky byla vždy analyzována 1 pozitivní a 1 negativní kontrola (voda). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z HPV 16 pozitivní buněčné linie SiHa.

Tab. 3: Příprava mixu reagensí pro PCR reakci.

	objem pro 1 vzorek
PapilloCheck® PCR MasterMix	19,8 µl
HotStarTaq® Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Uracil-N-Glycosylase (0,005 U/µl)	1 µl
celkový objem výsledného mastermixu	21 µl

Po skončení PCR následovala hybridizace PCR produktů na čipy PapilloCheck®. Do připravené oCheck® hybridizační komůrky byl vložen mokřý papírový ručník, za účelem vytvoření atmosféry nasycené vlhkosti, zabraňuje odpařování malého objemu hybridizační směsi na čipu. Před samotnou hybridizací byly v oCheck® komůrce inkubovány 10 minut při pokojové teplotě maximálně 4 PapilloCheck® čipy. Promývacím roztokem připraveným dle tabulky 4 byly rovnoměrně naplněny promývací boxy. Jeden z nich byl následně umístěn do vodní lázně, kde byl promývací roztok temperován na 50 °C. Pro jeho přípravu promývacího roztoku byl pufr A a pufr B temperován na laboratorní teplotu.

Tab. 4: Příprava promývacího pufru.

	objem na 1 čip
destilovaná voda	140 ml
PapilloCheck® pufr A	14 ml
PapilloCheck® pufr B	1,75 ml
celkový objem	155,75 ml

Po pulzním vortexování a stočení bylo do nových stripů pipetováno 30 µl hybridizačního pufru a 5 µl PCR produktu. Hybridizační směs byla promíchána pipetováním a 25 µl této směsi bylo nanášeno na čip. Následovala inkubace čipů v uzavřené hybridizační komůrce po dobu 15 minut. Čipy by neměly přijít do styku se světlem.

Další fází bylo promývání. Pomocí magnetického držáku byly čipy přeneseny do boxu s promývacím roztokem. Promývání probíhalo ve třech krocích.

1. Promývání čipů v prvním promývacím boxu po dobu 10 sekund pohybem nahoru a dolů při laboratorní teplotě.
2. Promývání čipů ve druhém promývacím boxu s promývacím roztokem po dobu 60 sekund občasným pohybem nahoru a dolů při 50°C (box byl umístěn ve vodní lázni).
3. Promývání čipů ve třetím promývacím boxu po dobu 10 sekund pohybem nahoru a dolů při laboratorní teplotě.

Ihned poté byly čipy 60 sekund centrifugovány.

V závěru byly čipy umístěny do CheckScannerTM a skenovány laserem. PCR kontrola a kontrola vzorku byla skenována laserem o excitační vlnové délce 635 nm (červená oblast), zatím co hybridizační kontrola byla skenována laserem o excitační vlnové délce 532 nm (zelená oblast). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru.

4.6.4 Vyhodnocení výsledků

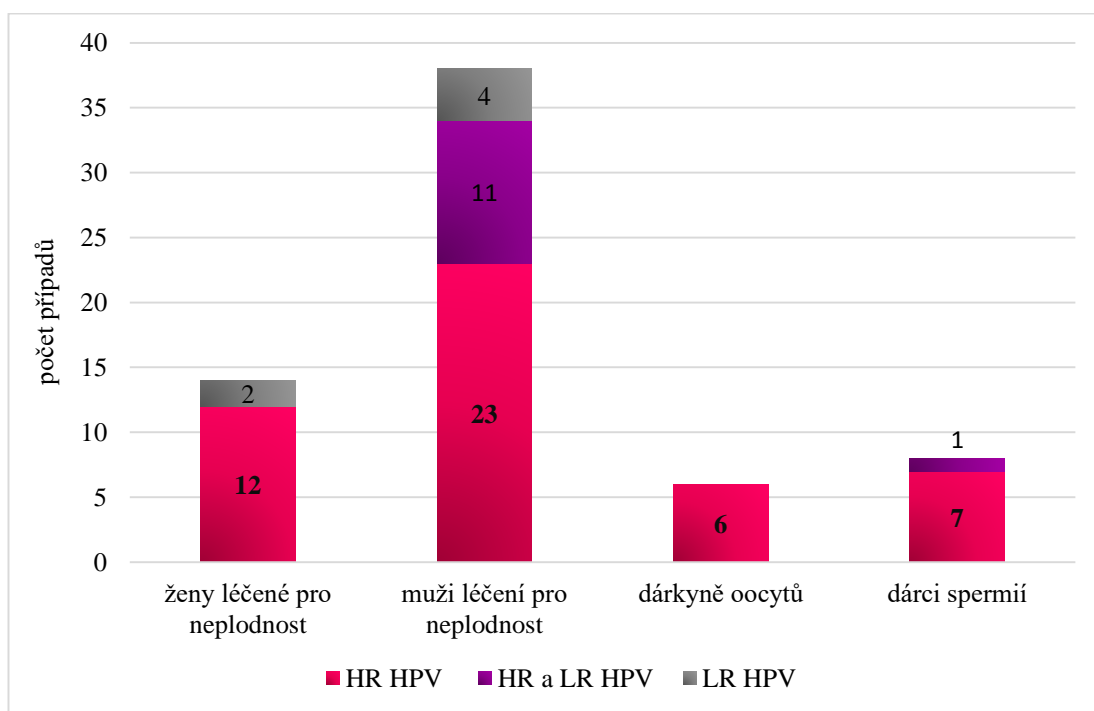
Jako HPV pozitivní byly vyhodnoceny vzorky ejakulátu a cervikálních stěrů, u nichž byla detekována přítomnost DNA HPV genotypů 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 nebo 66 oběma použitými metodami. V případě neshody metod byla analýza zopakována. Jako HPV pozitivní byly vyhodnoceny také vzorky, u nichž byla HPV DNA detekována 2x stejnou metodou. Přítomnost HR HPV 53, 70, 73, 82 a LR HPV 6, 11, 40, 42 43 a 44/55 byla vyhodnocena pouze na základě výsledku PapilloCheck HPV-Screeningu[®]. HPV pozitivita stěrů z penisu byla vyhodnocena pouze na základě výsledků PapilloCheck HPV-Screening[®] testu. Pro porovnání cobas[®] 4800 HPV testu a PapilloCheck HPV-Screeningu[®] byly hodnoceny pouze genotypy, které jsou detekovány oběma detekčními metodami.

Statistické zpracování výsledků HPV DNA testů a dotazníkového šetření provedla Mgr. Jana Vrbková, Ph.D. (Laboratoř experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci). Statistická významnost vztahu zkoumaných dat byla hodnocena pomocí dvourozměrného a jednorozměrného studentova t-testu. Dále také pomocí Fisherova přesného testu, Wilcoxonova přesného testu a McNemarova testu. Při všech analýzách byla zvolena hladina významnosti 0,05.

5. VÝSLEDKY

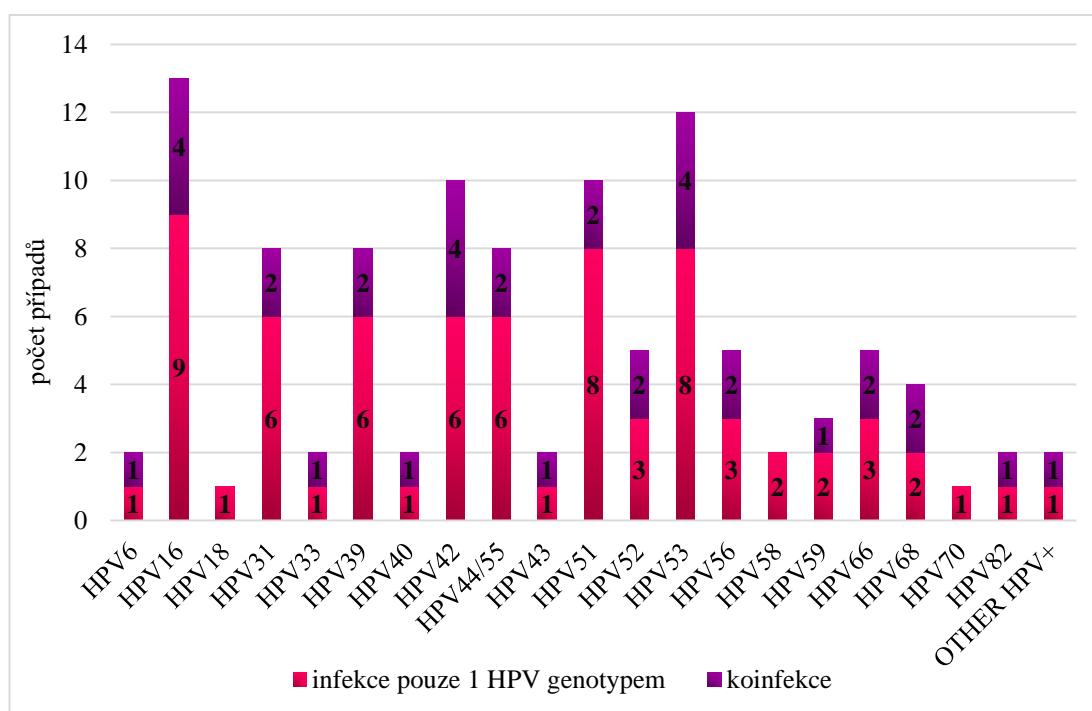
Vybraný soubor testovaných subjektů byl rozdělen do čtyř skupin: 64 žen z párů léčených pro neplodnost (ve věku $32 \pm 5,3$), 64 mužů z párů léčených pro neplodnost (ve věku $36 \pm 6,3$), 16 dárkyní oocytů (ve věku $27 \pm 3,7$), a 20 dárců spermií (ve věku $25 \pm 5,4$). HPV DNA byla u žen detekována ve vzorcích stěrů z děložního čípku a u mužů ve vzorcích ejakulátu a stěrů z penisu.

Pomocí HPV DNA testů byla u žen z neplodných párů detekována DNA vysoce rizikových HPV ve 12 (12/64; 18,8 %) případech. Nízce rizikové genotypy HPV byly u žen z párů léčených pro neplodnost identifikovány ve 2 (2/64; 3,1 %) případech (příloha 1). U mužů z párů léčených pro neplodnost byl HR HPV detekován v 23 (23/64; 35,9 %) případech ve stěrech z penisu a vzorcích ejakulátu celkem. LR HPV DNA se u mužů léčených pro neplodnost vyskytovala v 11 (11/64; 17,2 %) případech (příloha 2). U dárkyní oocytů bylo zjištěno 6 (6/16; 37,5 %) případů HR HPV pozitivních. LR HPV DNA nebyla v této skupině detekována (příloha 3). Dále bylo u 7 (7/20; 35,0 %) případů dárců spermií z celkového počtu 20 dárců identifikována HR HPV DNA. Nízce rizikové genotypy se u dárců spermií vyskytovaly v 1 (1/20; 5,0 %) případech (Graf 1) (příloha 4).



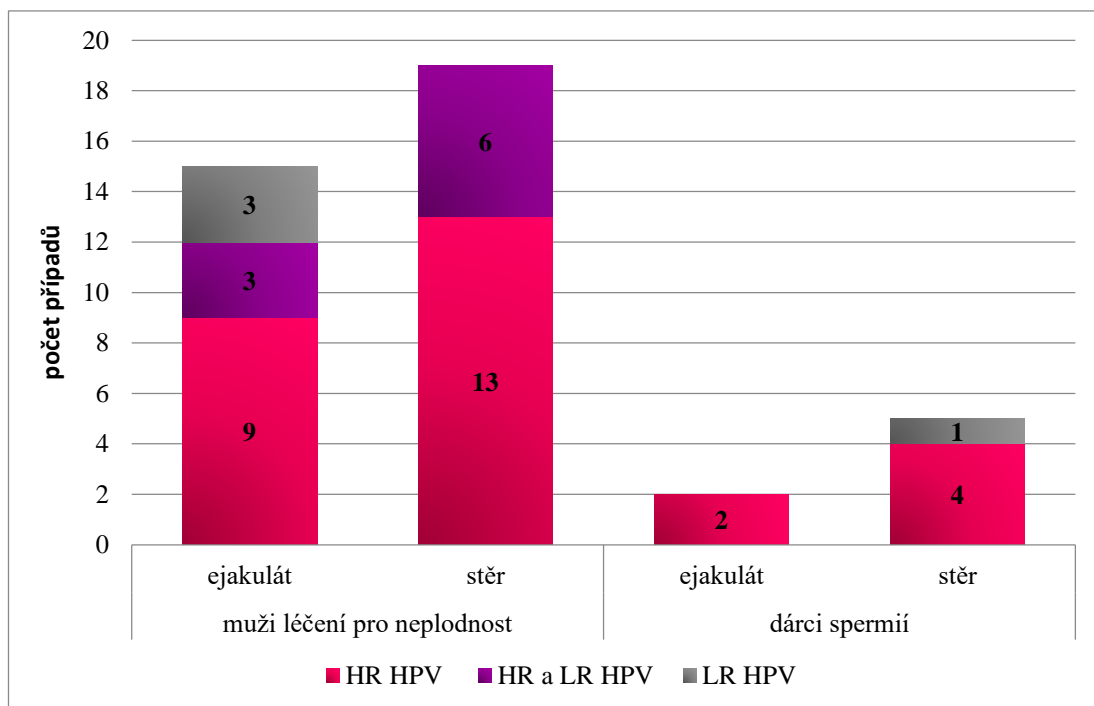
Graf 1: Výskyt HR HPV a LR HPV u mužů a žen léčených pro neplodnost a dárců gamet.

Nejčastěji byly detekovány genotypy HR HPV 16 (9/62; 14,5 %), HPV 53 (8/62; 12,9 %), HPV 51 (8/62; 12,9 %) a LR HPV 42 (6/62; 9,7 %) a HPV 44/55 (6/62; 9,7 %). Jako koinfekce byly často detekovány subtypy HPV 16 (4/35; 11,4%), HPV 42 (4/35; 11,4 %). HPV 53 (4/35; 11,4 %). Genotypy označeny jako other HPV+ byly testovány opakovaně. Jedná se o vzorky detekovány cobas® 4800 HPV testem s genotypy HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 a negativním výsledkem opakovaným PapilloCheck HPV-Screeningem®. Prevalence všech detekovaných genotypů je znázorněna v grafu 2.



Graf 2: Prevalence jednotlivých detekovaných genotypů HPV a koinfekcí u párů léčených pro neplodnost a dárců gamet.

U mužů léčených pro neplodnost byla v ejakulátu identifikována přítomnost HR HPV ve 12 (12/64; 18,8 %) případech. Ve stěrech z penisu se HR HPV DNA vyskytovala v 19 (19/54; 35,1 %) případech. LR HPV DNA v ejakulátu u mužů léčených pro neplodnost byla detekována v 6 (6/64; 9,4 %) případech, ve stěrech z penisu v 10 (10/54; 18,5 %) případech. U dárců spermií byly v ejakulátu HR HPV genotypy detekovány ve 2 (2/16; 12,5 %) případech. Ve stěrech z penisu byl HR HPV identifikován ve 4 (4/16; 25,0 %) případech a LR HPV v 1 (1/16; 6,3 %) případech (Graf 3). U 8 vzorků stěrů z penisu detekce HPV DNA selhala zřejmě z důvodu nedostatečného množství biologického materiálu v analyzovaném vzorku a 2 vzorky stěrů z penisu nebyly k analýze poskytnuty.



Graf 3: Porovnání výskytu HR HPV a LR HPV u ve stěrech z penisu a ejakulátu mužů léčených pro neplodnost a dárců gamet.

Jedním z cílů práce bylo porovnat použitých HPV DNA detekčních metod. Byla porovnána pouze přítomnost HR HPV genotypů, které detekují obě metody. HR HPV DNA byla ve vzorcích stěrů z děložního čípku a ejakulátu detekována cobas[®] 4800 HPV testem i PapilloCheck HPV-Screeningem[®]. Ve stěrech z děložního čípku byla HPV DNA identifikována cobas[®] 4800 HPV testem v 17 (17/80; 21,3 %) případech a PapilloCheck HPV-Screeningem[®] taktéž v 17 (17/80; 21,3 %) případech. Ve vzorcích ejakulátu byly HR HPV genotypy detekovány cobas[®] 4800 HPV testem v 10 (10/84; 11,9 %) případech, ale PapilloCheck HPV-Screeningem[®] ve 12 (12/84; 14,3 %) případech (Tab. 5). Výsledek porovnávaných metod se shodoval z 98,8 % (162/164) případů.

Tab. 5: Porovnání detekce HPV DNA použitými HPV DNA testy.

HPV DNA	cobas [®] 4800 HPV test	PapilloCheck HPV-Screening [®]
stěry z děložního čípku	17/80 (21,3%)	17/80 (21,3%)
ejakulát	10/85 (11,9%)	12/85 (14,3%)

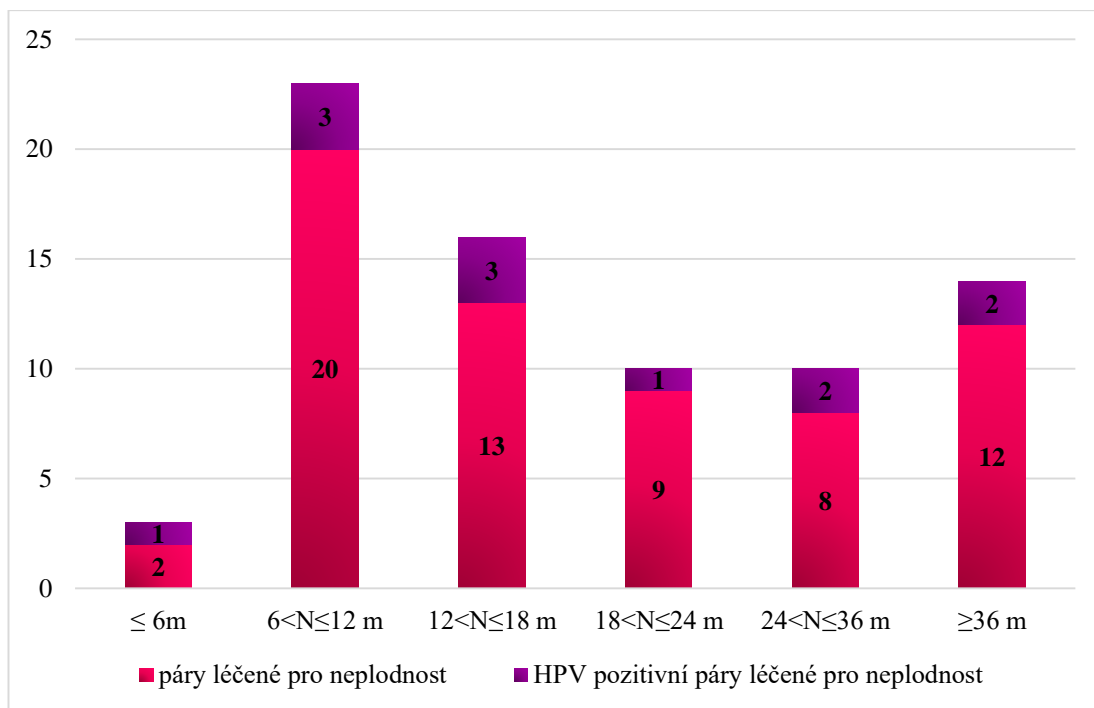
Ve výsledcích byly mimo experimentálně získaná data z HPV DNA testů zahrnuty také informace z dotazníkového šetření. Na základě vyhodnocení dotazníkového šetření bylo zjištěno, že v párech léčených pro neplodnost prodělalo infekci pohlavního ústrojí významně více žen (15/64; 23,4 %) než mužů (5/64; 7,8 %) ($p < 0,034$). Operaci pohlavního ústrojí prodělalo významně více žen léčených pro neplodnost (18/64; 28,6 %) než mužů léčených pro neplodnost (5/64; 7,8%) ($p < 0,006$) (Tab. 6).

Tab. 6: Na základě statistické významnosti znázornění výskytu HR HPV infekcí pohlavního ústrojí a operací pohlavního ústrojí u párů léčených pro neplodnost.

		ženy	muži	celkem	p-value#
HR HPV	pos/total (%)	12/64 (18.8%)	23/64 (35.9%)	35/128 (27,3%)	0,002
Infekce pohlavního ústrojí	pos/total (%)	15/64 (23.4%)	5/64 (7.8%)	20/128 (15.6%)	0,034
Operace pohlavního ústrojí	pos/total (%)	18/63 (28.6%)	5/64 (7.8%)	23/127 (18.1%)	0,006

Dalším zkoumaným parametrem byla doba pokusu o početí. Mezi 64 páry léčenými pro neplodnost se vyskytovaly pouze 2 páry, které se pokouší o početí po dobu 6 měsíců. Poté nejvíce 20 párů v rozmezí 6-12 měsíců, 13 párů, které se pokouší o početí 12-18 měsíců, 9 párů 18-24 měsíců, 8 párů 24-36 měsíců a 12 párů více než 36 měsíců. Z toho 6 (9,7 %) párů, které se pokouší o početí 6-18 měsíců bylo HPV pozitivních (Graf 4). I přes tyto hodnoty jen 6 (9,4 %) párů podstoupilo v minulosti metody asistované reprodukce.

V párech léčených pro neplodnost byla častěji HR HPV pozitivní žena než muž ($p < 0,002$) (příloha 5). Z celého souboru byly pouze 4 ženy očkovány proti HPV a žádný muž. U 1 z žen očkovaných proti HPV byla detekována infekce nevakcinárním HR HPV genotypem HPV 51. Dárci gamet byly významně mladší, měli méně sexuálních a mladších partnerek, než muži z párů léčených pro neplodnost ($p < 0,009$) (příloha 6). Dárkyně oocytů častěji prodělaly pohlavně přenosnou infekci, byly mladší a měly i mladší sexuální partnery, než ženy z párů léčených pro neplodnost. Ženy z párů léčených pro neplodnost byly častěji bezdětné než dárkyně oocytů ($p < 0,001$) (příloha 7). Výsledky statistického zpracování dotazníkového šetření jsou uvedeny v příloze 5-7.



Graf 4: Doba pokusu párů léčených pro neplodnost o počtí.

6. DISKUSE

Lidský papilomavirus jako možná příčina neplodnosti zůstává opomenuta. Infekce HPV ovlivňuje kvalitu spermatu a může mít vliv na úspěšnost ART. HPV DNA může být identifikována pomocí HPV DNA testů, které nejsou součástí pravidelného screeningu.

V této bakalářské práci byly nejčastější detekované genotypy HR HPV 16 (14,5 %), HPV 53 (12,9 %) a HPV 51 (12,9 %). Hodnota HPV 16 se shoduje s publikací Bosch et al, který uvádí světovou prevalenci HPV 16 3,2 % (Bosch et al., 2008). Avšak výsledky pro genotypy HPV 51 a HPV 53 se neshodují s Cliffordem et al, který zjistil výskyt HPV 51 4 % a HPV 53 pouze 1,2 % (Clifford et al, 2005).

Výskyt HPV DNA již byl u žen zkoumán v mnoha studiích. Prevalence HPV byla v této práci detekována u 25,0 % (20/80) žen pomocí HPV DNA testů. Tato prevalence se shoduje s výsledky studií, které uvádí výskyt HPV 1,4-25,6 % (Tachezy et al., 1999; Clifford et al., 2005; Sanjosé et al., 2007). Poměrně velké rozdíly ve výskytu HPV u žen jsou způsobeny rozdílnou charakteristikou studované populace a to zejména věkovým zastoupením žen v jednotlivých studiích nebo rozdílnou demografií. Mezi 18-25 lety se prevalence může pohybovat až okolo 45 % (Freitag, 2006; Clifford et al., 2005). Ve vybraném souboru bylo pouze 13,75 % žen (11/80) ve věku do 25 let, ale 36,4 % (4/11) žen ve věku do 25 let bylo HPV pozitivních. V této práci byl zjištěný výskyt HPV u žen léčených pro neplodnost vyšší (21,9 %), než v publikacích zaměřených na prevalenci HPV (11,1-17,5 %) u žen podstupujících metody asistované reprodukce (Depuydt et al., 2015; Perino et al., 2011). Ve studii Spandorfer et al. byl zjištěn výskyt HPV u 16 % žen podstupujících ART (Spandorfer et al., 2006). Poměrně znepokojivý je výskyt HPV u dárkyní oocytů (6/16; 37,5 %), kvůli možnému přenosu infekce na příjemce. Zatím nebyla publikována žádná studie zabývající se prevalencí HPV u dárkyní oocytů.

U mužů léčených pro neplodnost byla v této práci zjištěná prevalence HR HPV 35,9 %. Tato prevalence odpovídá ostatním studiím, které uvádí výskyt HPV u mužů léčených pro neplodnost 1,3 – 72,9 % (Tanaka, 2000; Golob et al., 2014; Foresta et al., 2015). U dárců spermií byla HPV DNA detekována u 40,0 % mužů. Tato hodnota je 2násobná v porovnání s Rintalou et al., který v roce 2004 uvedl prevalenci 15,5 % u 65 dárců spermatu a 5násobná oproti Olatunbose et al., který zjistil výskyt HPV DNA 7,5 % u dárců spermií. Stejně jako u žen, tak u mužů je tento rozptyl

způsoben různorodostí věku, socioekonomické situace. U mužů především výběrem místa odběru. Nejčastějším místem výskytu HPV u mužů je povrch penisu (Weaver et al., 2004; Astori et al., 1995). Golob et al. uvádí prevalenci HPV DNA ve stěrech z penisu u mužů léčených pro neplodnost 37,1 % a v ejakulátu 13,6 %. HPV pozitivita ve stěrech z penisu zjištěná Golobem et al. je srovnatelná se zjištěnou prevalencí HR HPV infekce u mužů léčených pro neplodnost v této bakalářské práci (35,1 %) a také srovnatelná s prevalencí HR HPV ve vzorcích ejakulátu (18,8 %). HR HPV infekce byla u mužů léčených pro neplodnost 2krát častěji detekována ve stěrech z penisu (35,1 %) než ve vzorcích ejakulátu (18,8 %). Nízce rizikové genotypy HPV, způsobující kondylomata, byly detekovány 2krát častěji ve stěrech z penisu (18,5 %) než v ejakulátu (9,4 %). V této práci byla HPV DNA detekována ze stěrů z penisu, protože HPV vyskytující se na povrchu penisu je nebezpečná, kvůli možnému přenosu na ženu při pohlavním styku, riziku karcinomu penisu nebo vzniku kondylomat (Androphy, 1994).

Vzorčky ejakulátu a stěrů z děložního čípku byly testovány na přítomnost HPV dvěma HPV DNA testy. Byly porovnány výsledky testů pouze pro genotypy detekované oběma testy. Ve vzorcích ejakulátu byly HR HPV genotypy detekovány častěji PapilloCheck HPV-Screeningem (12/84, 14,3 %) než cobas[®] 4800 HPV testem (10/84, 11,9 %), ale v případě stěrů z děložního čípku byly výsledky obou metod stejné (17/80; 21,3 %). Obě metody se shodovaly z 98,8 %. Tento rozdíl mohl být způsoben rozdílnou analytickou senzitivitou pro některé z detekovaných genotypů.

Mnoho žen léčených pro neplodnost prodělalo buď infekci pohlavního ústrojí (23,4 %), nebo operaci pohlavního ústrojí (28,6 %). Mezi kofaktory, které zvyšují riziko HPV infekce, se řadí předešlá expozice *Chlamydia trachomatis* (Bosch, 2006). Pellati uvádí, že *Chlamydia trachomatis* může být jednou z příčin neplodnosti, protože způsobuje obstrukci vejcovodů a může tak zamezit průchodu oocyty vejcovodem (Pellati, 2008).

7. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá prevalencí HPV infekce u mužů a žen léčených pro neplodnost a dárců gamet. V rámci práce bylo vyšetřeno 64 párů léčených pro neplodnost, 20 dárců spermatu a 16 dárekyní oocytů na vysoce rizikové a nízké rizikové genotypy HPV pomocí HPV DNA testů cobas[®] 4800 HPV a PapilloCheck HPV-Screening[®]. Výsledky použitých metod se shodovaly 98,8 % případů. U mužů a žen léčených pro neplodnost byla zjištěna prevalence, která koreluje s prevalencí v publikovaných studiích. Důležitým a překvapivým zjištěním je vysoká HPV prevalence u dárců gamet obou pohlaví. Prevalence HPV v této skupině převyšovala prevalenci HPV u párů léčených pro neplodnost a dosahovala více než 35 %. Toto zjištění je znepokojivé pro možný přenos HPV na příjemce a případně na budoucí plod. Informace získané dotazníkovým šetřením, zaměřeným na zdravotní stav a sexuální chování, napomohly ke stanovení korelace zjištěné prevalence HPV s například počtem operací pohlavního ústrojí nebo infekcemi pohlavního ústrojí. Byl zjištěn vyšší výskyt HPV DNA u žen léčených pro neplodnost, které v minulosti prodělaly infekci pohlavního ústrojí nebo operaci pohlavního ústrojí.

HPV vyšetření není při léčbě neplodnosti indikováno, zůstává tato možná příčina neplodnosti opomenuta. Z důvodu vysoké prevalence u dárců gamet se nabízí otázka testování dárců gamet na přítomnost HPV DNA, kvůli potenciálnímu přenosu na příjemce a možnému vlivu na úspěšnost léčby neplodnosti. Vysoká prevalence u mužů také nabízí zamyšlení ohledně očkování nejen dívek, ale také chlapců.

POUŽITÁ LITERATURA

ANDROPHY E. J. Molecular biology of human papillomavirus infection and oncogenesis. *Journal of investigative dermatology*, 1994, 103.2: 248-256.

ARBYN M., Herbert A., Schenck U., Nieminen P., Jordan J., McGoogan E., Patnick J., Bergeron C., Baldauf J. J., Klinkhamer P., Bulten, J., Martin-Hirsch P. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second ed. – summary document. *Ann Oncology*, 2010, 21, p. 448–458.

ASTORI G., Pipan C., Muffato G., Botta G. A. Detection of HPV-DNA in semen, urine and urethral samples by dot blot and PCR. *The new microbiologica*, 1995, 18.2: 143-149.

BAAY M. F. D., Quint W. G. V., Koudstaal J., Hollema H., Duk J. M., Burger M. P. M., Stolz E., Herbrink P. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *Journal of clinical microbiology*, 1996, 34.3: 745-747.

BOSCH F. X., Qiao Y., Castellsagué X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2006, 94: S8-S21.

BOSCH F. X., Burchell A. N., Schiffman M., Giuliano A. R., Sanjose de S., Bruni L., Tortolero-Luna G., Kruger S., Muñoz K. N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 2008, 26: K1-K16.

BOSCH F. X., Broker T. R., Forman D., Moscicki A. B., Gillison M. L., Doorbar J., Stern P. L., Stanley M., Arbyn M., Poljak M., Cuzick J., Castle P. E., Schiller J. T., Markowitz L. E., Fisher W. A., Canfell K., Denny L. A., Franco E. L., Steben M., Kane M. A., Schiffman M., Meijer C. J., Sankaranarayanan R., Castellsagué X., Kim J. J., Brotons M., Alemany L., Albero G., Diaz M., Sanjosé de S. Comprehensive

control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*, 2013, 31: H1-H31.

BOULENOUAR S., Weyn C., Van Noppen M., Moussa A. M., Favre M., Delvenne P. O., Bex F., Noël A., Englert Y., Fontaine V. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis*, 2010, 31.3: 473-480.

BURK R. D., Chen Z., Doorslaer van K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public health genomics*, 2009, 12.5-6: 281-290.

CALINISAN J. H., Chan S. R., King A., Chan P. J. Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2002, 19.3: 132-136.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention of genital HPV infection and sequelae: report of an external consultants' meeting. *Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention*, 1999.

CLIFFORD G. M., Gallus S., Herrero R., Muñoz N., Snijders P. J., Vaccarella S., Anh P. T., Ferreccio C., Hieu N. T., Matos E., Molano M., Rajkumar R., Ronco G., Sanjosé de S., Shin H. R., Sukvirach S., Thomas J. O., Tunsakul S., Meijer C. J., Franceschi S. IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *The Lancet*, 2005, 366.9490: 991-998.

CONNELLY, D. A., Chan P. J., Patton W. C., King A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2001, 184.6: 1068-1070.

Current practices and controversies in assisted reproduction. Geneva: World Health Organization, 2002.

DAAR A. S., Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. *Current practices and controversies in assisted reproduction*, 2002, 15-21.

D'ABRAMO C. M., Archambault J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein-protein interactions. *Open Virology Journal*, 2011, 5: 80-95.

DEPUYDT C. E., Verstraete L., Berth M., Beert J., Bogers J. P., Salembier G., Vereecken A. J., Bosmans E. Human papillomavirus positivity in women undergoing intrauterine insemination has a negative effect on pregnancy rates. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 2015, 9;81(1):41-6.

DERKAY C. S. Recurrent respiratory papillomatosis. *The Laryngoscope*, 2001, 111.1: 57-69.

DE VILLIERS E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004, 324.1: 17-27.

DIJKSTRA M. G., Snijders P. J. F., Arbyn M., Rijkaart D. C., Berkhof J., Meijer C. J. L. M. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Annals of Oncology*, 2014, mdt538.

DILLNER J., Rebolj M., Birembaut P., Petry K. U., Szarewski A., Munk Ch., de Sanjose S., Naucler P., Lloveras B., Kjaer S., Cuzick J, van Ballegooijen M., Clavel Ch., Iftner T. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *Bmj*, 2008, 337: a1754.

DUNNE E. F., Nielson C. M., Stone K. M., Markowitz L. E., Giuliano A. R. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, 194.8: 1044-1057.

FERNANDES J. V., Araújo J. M. G., Fernandes, T. A. A. M. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access Journal Clinical Trials*, 2013, 5: 1-12.

FIELDS B. N. *Fields virology 1*. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

FORESTA C., Pizzol D., Moretti A., Barzon L., Palù G., Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertility and sterility*, 2010, 94.5: 1723-1727.

FORESTA C., Patassini C., Bertoldo A., Menegazzo M., Francavilla F., Barzon L., Ferlin A. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One*, 2011, 6.3: e15036.

FORESTA C., Noventa M., de Toni L., Gizzo S., Garolla A. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology*, 2015, 3.2: 163-173.

FREITAG P. Klinický význam HPV-testu. *Praktická gynekologie*, 2006, č. 2, 71-73.

GAROLLA A., Pizzol D., Bertoldo A., de Toni L., Barzon L., Foresta C. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertility and sterility*, 2013, 99.1: 125-131. e2.

GIULIANO A. R., Nielson C. M., Flores R., Dunne E. F., Abrahamsen M., Papenfuss M. R., Markowitz L. E., Smith D., Harris R. B. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196.8: 1146-1152.

GIULIANO A. R., Lee J. H., Fulp W., Villa L. L., Lazcano E., Papenfuss M. R., Abrahamsen M., Salmeron S., Anic G. M., Rollison D. E., Smith D. Incidence and

clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *The Lancet*, 2011, 377.9769: 932-940.

GIZZO S., Ferrari F., Noventa M., Ferrari E., Patrelli T. S., Gangemi M., Nardelli G. B. Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact—systematic review. *BioMed research international*, 2014.

GMBH, Greiner Bio-one,. PapilloCheck® high-risk Instructions For Use. 2011. roč. 49, č. August.

GOLOB B., Poljak M., Verdenik I., Kolbezen S. M., Vrtačnik B. E., Zorn, B. High HPV infection prevalence in men from infertile couples and lack of relationship between seminal HPV infection and sperm quality. *BioMed research international*, 2014.

GOMEZ L. M., Ma Y., Ho C., McGrath C. M., Nelson D. B., Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Human reproduction*, 2008, 23.3: 709-715.

HEBNER CH. M., Laimins L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*, 2006, 16.2: 83-97.

HERMONAT P. L., Han L., Wendel P. J., Quirk J. G., Stern S., Lowery C. L., Rechtin T. M. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus genes*, 1997, 14.1: 13-17.

HOLUBOVÁ A. Sestra v prevenci a včasné diagnostice nádorových onemocnění. *Sestra*, 2007, č. 5, s. 52.

CHEN Z., Fu L., Herrero R., Schiffman M., Burk R. D. Identification of a novel human papillomavirus (HPV97) related to HPV18 and HPV45. *International journal of cancer*, 2007, 121.1: 193-198.

CHLÍBEK R., Smetana R., Boštíková J. V. Současnost registrovaných HPV vakcín. *Pediatr Praxi*, 2011, 12.2011: 17-22.

JACOBS M. V., de Roda H. A. M., van den Brule A. J., Snijders P. J., Meijer C. J., Walboomers J. M. Group-specific differentiation between high-and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33.4: 901-905.

KIRBY T. FDA approves new upgraded Gardasil 9. *Lancet Oncology*, 2015, 16.2: e56.

LAPRISE C., Trottier H., Monnier P., Coutlée F., Mayrand M. H. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 2013, det453.

MORRIS B. J. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 2005, 43.11: 1171-1177.

NOVENTA M., Andrisani A., Gizzo S., Nardelli G. B., Ambrosini G. Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPV-related infertility: debate and proposal. *Reproduction Biology Endocrinology*, 2014, 12.1: 48.

OLATUNBOSUN O., Deneer H., Pierson R.. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstetrics & Gynecology*, 2001, 97.3: 357-360.

ONDŘYÁŠOVÁ H., Koudeláková V., Hajdúch M. Karcinom cervixu – možnosti detekce lidského papilomaviru Cervical cancer – possibilities of detection of human papillomavirus. 2013, s. 289–294

ONDRYÁŠOVÁ H., Koudeláková V., Vaněk P., Oborná I., Hajdúch M. Lidský papilomavirus a s ním spojená onemocnění. *Practicus*. 2015, 4/2015, 11-15

PARKIN D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2005, 55.2: 74-108.

PELLATI D., Mylonakis I., Bertoloni G., Fiore C., Andrisani A., Ambrosini G., Armanini D. Genital tract infections and infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2008, 140.1: 3-11.

PEREIRA N., Kucharczyk K. M., Estes J. L., Gerber, Rachel S., Lekovich J. P., Elias R. T., Spandorfer S. D. Human Papillomavirus Infection, Infertility, and Assisted Reproductive Outcomes. *Journal of pathogens*, 2015, 2015.

PEREZ-ANDINO J., Buck Ch. B., Ribbeck K.. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One*, 2009, 4.6: e5847.

PERINO A., Giovannelli L., Schillaci R., Ruvolo G., Fiorentino F. P., Alimondi P., Cefalù E., Ammatuna P. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertility and Sterility*, 2011, 95(5):1845-8.

PURANEN M. H., Yliskoski M. H., Saarikoski S. V., Syrjanen K. J., Syrjanen S. M. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1997, 176.5: 1039-1045.

QIAAMP, Souprava, D S P DNA, Blood MINI a Qiagen GMBH. Příručka QIAamp[®] DSP DNA, 2004, s. 1–26.

RINTALA M. A. M., Grénman S. E., Puranen M. H., Isolauri E., Ekblad U., Kero P. O., Stina M. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *Journal of clinical microbiology*, 2005, 43.1: 376-381.

SANJOSÉ de S., Díaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 2007, 7.7: 453-459.

SCHEFFNER M., Werness B. A., Huibregtse J. M., Levine A. J., Howley P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 1990, 63.6: 1129-1136.

SCHEJBALOVÁ M. HPV infekce. *Diagnóza v ošetrovatelství*, 2011, č. 5, s. 28-30.

SCHIFFMAN M., Castle P. E. The promise of global cervical-cancer prevention. *New England Journal of Medicine*, 2005, 353.20: 2101-2104.

SCHILLACI R., Capra G., Bellavia C., Ruvolo G., Scazzone C., Venezia R., Perino A. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertility and sterility*, 2013, 100.5: 1236-1240.

SOUHO T., BENLEMLIH M., BENNANI B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PloS one*, 2015, 10.5: e0126936.

SPANDORFER S. D., Bongiovanni A. M., Fasioulotis S., Rosenwaks Z., Ledger W. J., Witkin S. S. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertility and sterility*, 2006, 86.3: 765-767.

SYRJANEN S., Puranen M.. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2000, 11.2: 259-274.

SZYDŁOWSKI J., Jonczyk-Potoczna K., Pucher B., Buraczynska-Andrzejewska B., Prauzinska M., Kolasinska-Lipinska J., Krauss H., Piatek. J., Zukiewicz-Sobczak W. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in upper respiratory tract mucosa in a

group of pre-school children. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 2013, 21.4: 822-824.

TACHEZY R., Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: Correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *Journal of medical virology*, 1999, 58.4: 378-386.

TACHEZY, R., Hamšíková E., Hájek T., Mikyšková I., Šmahel M., Ranst van M., Kaňka J., Havráňková A., Rob L., Guttner V., Slavík V., Anton M., Kratochvíl B., Kotršová L., Vonka V. Longitudinal study of patients after surgical treatment for cervical lesions: detection of HPV DNA and prevalence of HPV-specific antibodies. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2006, 25.8: 492-500.

TAI CH. F., Tsou T. P., Hsieh W. S., Chen Ch. Y., Chou H. Ch., Tsao P. N., Hsu Ch. H., Liao Y. J., Lu Ch. Y., Shao P. L., Chang L. Y., Huang L. M. Molecular detection and incidence of human papillomavirus in neonates: Methodology and a pilot study in a medical center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2012, 45.3: 185-192.

TANAKA H., Karube A., Kodama H., Fukuda J., Tanaka T. Mass screening for human papillomavirus type 16 infection in infertile couples. *The Journal of reproductive medicine*, 2000, 45.11: 907-911.

VINOKUROVA S., Wentzensen N., Kraus I., Klaes R., Driesch C., Melsheimer P., Kisseljov F., Dürst M., Schneider A., von Knebel Doeberitz M. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research*, 2008, 68.1: 307-313.

WALBOOMERS J., Jacobs M. V., Manos M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Peto J., Meijer C. J. L. M., Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, 1999, 189.1: 12-19.

WEAVER B., Feng Q., Holmes K. K., Kiviat N., Lee S. K., Meyer Ch., Stern M., Koutsky L. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *Journal of Infectious Diseases*, 2004, 189.4: 677-685.

WERNES B., Levine A. J., Howley P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 1990, 248.4951: 76-79.

WRIGHT T., Stoler M., Sharma A., Zhang G., Behrens C., Wright T. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *American journal of clinical pathology*, 2011, 136.4: 578-586.

YOU H., Liu Y., Carey M. J., Lowery C. L., Hermonat P. L. Defective 3A Trophoblast-Endometrial Cell Adhesion and Altered 3A Growth and Survival by Human Papillomavirus Type 16 Oncogenes11 March of Dimer Grant 6-FY99-188 (to PLH). *Molecular Cancer Research*, 2002, 1.1: 25-31.

ZEGERS-HOCHSCHILD F., Adamson G. D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Van der Poel S. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology. *Human Reproduction*, 2009, dep343.

Internetové zdroje:

MÁJEK, Ondřej., et al. Cervix.cz – Program cervikálního screeningu v České republice Masarykova univerzita, Brno, 2013. [online]. [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <http://www.cervix.cz/> ISSN 1804-087X. Verze 1.6f.

Očkování - Internetové Informační Centrum. [online]. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: http://www.vakciny.net/AKTUALITY/akt_2011_12.htm

PapilloCheck® high-risk - Instructions For Use Revision: BQ-065-01 / August 2011. [online]. [cit. 2016-03-01]. Dostupné z:

<http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/English%20files%20for%20the%20UK%20website/Instructions%20for%20use%20files/IFU%20Papillocheck%20HR.pdf>

KOBILKOVÁ, Jitka. [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z:

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/gynekologicka-cyodiagnostika-na-prahu-3-tisicileti-168659>

Roche Molecular Systems, Inc.. 2011. Cobas HPV Test package insert. Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA. [online]. [cit. 2016-03-01]. Dostupné z:

http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/P100020c.pdf

Roche Lifescience produkty. [online]. [cit. 2016-01-10]. Dostupné z:

<https://lifescience.roche.com/shop/products/magna-pure-lc-20-instrument>

The 2010 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Illustrated Information. Nobelprize.org. 6 Oct 2011. [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z:

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2010/illpres.html

PŘÍLOHY

Příloha 1. Výsledky HPV DNA detekčních metod u žen léčených pro neplodnost

počet vzorků	Cobas 4800® HPV test	PapilloCheck® HPV Screening	HPV závěr
2	HPV16	HPV16	HPV16
1	HPV16, Další HPV	HPV16, 31	HPV16, 31
2	Další HPV	HPV31	HPV31
3	Další HPV	HPV39	HPV39
1	Další HPV	HPV51	HPV51
1	Další HPV	HPV52, 39	HPV52, 39
1	Další HPV	HPV58	HPV58
2	N	HPV44/55	HPV44/55
1	N	HPV53	HPV53
50	N	N	N

Další HPV zahrnuje genotypy HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

Příloha 2. Výsledky HPV DNA detekčních metod u mužů léčených pro neplodnost

počet vzorků	ejakulát		stěr z penisu
	Cobas 4800® HPV test	PapilloCheck® HPV Screening	PapilloCheck® HPV Screening
			HPV16+ další HPV
1	HPV16+další HPV	HPV16	HPV16, 59, 82
1	Další HPV	HPV31	Failed
1	Další HPV	HPV31,42	HPV16,31,42
2	Další HPV	HPV51	HPV51
1	Další HPV	HPV51,44/55	HPV51,44/55
1	Další HPV	HPV51	HPV68
1	Další HPV	HPV56,68	HPV68
1	Další HPV	HPV58	HPV58
1	N	HPV42	HPV53,40
1	N	HPV42	HPV42,56
1	N	HPV53,42	HPV42
2	N	HPV53,42	HPV42
1	N	HPV42	Failed
2	N	N	HPV16
1	N	N	HPV39,44/55
1	N	N	HPV42
2	N	N	HPV44/55
1	N	N	HPV52
1	N	N	HPV53
1	N	N	HPV53,66,43
1	N	N	HPV59
1	N	N	HPV66
1	N	N	HPV70
2	N	N	-

6 N	N	N	Failed
29 N	N	N	N

Další HPV zahrnuje genotypy HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

Příloha 3. Výsledky HPV DNA detekčních metod u dárkyň oocytů

počet vzorků	Cobas 4800® HPV test	PapilloCheck® HPV Screening	HPV závěr
1	HPV16	HPV16	HPV16
1	HPV18	HPV18	HPV18
2	Další HPV	HPV31	HPV31
1	Další HPV	HPV33, 52	HPV33, 52
1	Další HPV	HPV39	HPV39
10	N	N	N

Další HPV zahrnuje genotypy HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

Příloha 4. Výsledky HPV DNA detekčních metod u dárců spermií

počet vzorků	ejakulát			stěr z penisu
	Cobas 4800® HPV test	PapilloCheck® HPV Screening	HPV závěr	PapilloCheck® HPV Screening
1	N	HPV16	HPV16	HPV6
1	N	HPV51	HPV51	N
1	Další HPV	HPV66	HPV66	HPV53, 66
2	N	N	N	HPV51
1	N	N	N	HPV56
1	N	N	N	HPV66
10	N	N	N	N
3	N	N	N	Failed

Další HPV zahrnuje genotypy HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

Příloha 5. Statistické zpracování výsledků dotazníkového šetření u žen a mužů léčených pro neplodnost

	ženy léčené pro neplodnost (pozitivní/celkem[%])	muži léčení pro neplodnost (pozitivní/celkem[%])	p-value [#]
HPV	12/64 (18,8%)	27/64 (42,2%)	0,286
hrHPV	12/64 (18,8%)	18/64 (28,1%)	0,002
STD	15/64 (23,4%)	5/64 (7,8%)	0,034
děti	13/64 (20,3%)	19/64 (29,7%)	0,239
chirurgický zákrok	18/63 (28,6%)	5/64 (7,8%)	0,006
HPV vakcinace	4/63 (6,3%)	0/63 (0%)	0,134
	ženy léčené pro neplodnost (medián)	muži léčení pro neplodnost (medián)	
věk	32 (29-36,62)	36 (33-39,03)	<0,001
věk sexuálního	35 (32,75-39)	32 (29-36)	-

partnera			
počet sexuálních partnerů	4 (3-7)	6 (4-11)	<0,001

McNemarův test, jednorozměrný studentův t-test, Wilcoxonův přesného test.
 Jako HR HPV pozitivní byly hodnoceny vzorky s infekcí HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66.
 STD- pohlavně přenosné choroby
 hodnoty vyznačeny červeně (<0,05) - statisticky významné

Příloha 6. Statistické zpracování výsledků dotazníkového šetření u mužů léčených pro neplodnost a dárců spermií

	dárce spermií (pozitivní/celkem[%])	muži léčení pro neplodnost (pozitivní/celkem[%])	p-value#
ejakulát hrHPV	0/20 (0%)	1/64 (1,6%)	1,000
ejakulát HPV	1/20 (5%)	9/64 (14,1%)	0,439
stěr z penisu hrHPV	7/20 (35%)	23/64 (35,9%)	1,000
stěr z penisu HPV	7/20 (35%)	27/64 (42,2%)	0,756
HPV	7/20 (35%)	27/64 (42,2%)	0,756
hrHPV	7/20 (35%)	18/64 (28,1%)	0,759
STD	1/17 (5,9%)	5/64 (7,8%)	1,000
děti	3/18 (16,7%)	19/64 (29,7%)	0,372
chirurgický zákrok	1/17 (5,9%)	5/64 (7,8%)	1,000
HPV vakcinace	0/16 (0%)	0/63 (0%)	NA

	dárce spermií (medián)	muži léčení pro neplodnost (medián)	p-value#
věk	23	36	<0,001
věk sexuálního partnera	25	32	<0,001
počet sexuálních partnerů	3	6	0,009

Fischerův přesný test, dvourozměrný studentův t-test, Wilcoxonův přesný test.
 Jako HR HPV pozitivní byly hodnoceny vzorky s infekcí HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66.
 STD- pohlavně přenosné choroby
 hodnoty vyznačeny červeně (<0,05) - statisticky významné

Příloha 7. Statistické zpracování výsledků dotazníkového šetření u žen léčených pro neplodnost a dárcyň oocytů

	dárkyně oocytů (pozitivní/celkem[%])	ženy léčené pro neplodnost (pozitivní/celkem[%])	p-value#
HPV	6/16 (37,5%)	12/64 (18,8%)	0,177
hrHPV	6/16 (37,5%)	12/64 (18,8%)	0,177
STD	0/16 (0%)	15/64 (23,4%)	0,033
děti	13/16 (81,2%)	13/64 (20,3%)	<0,001
chirurgický zákrok	0/8 (0%)	18/63 (28,6%)	0,105
abort	3/14 (21,4%)	18/61 (29,5%)	0,745

HPV vakcinace asistovaná reprodukce	0/16 (0%)	4/63 (6,3%)	0,577
	-	6/63 (9,5%)	-
	dárkyně oocytů (medián)	ženy léčené pro neplodnost (medián)	p-value[#]
věk	27,3 (24,08-29,53)	32 (29-36,62)	0,001
věk sexuálního partnera	30 (27-35)	35 (32,75-39)	0,019
počet sexuálních partnerů	4 (2-6)	4 (3-7)	0,440

[#] Fischerův přesný test, dvourozměrný studentův t-test, Wilcoxonův přesný test.
 Jako HR HPV pozitivní byly hodnoceny vzorky s infekcí HPV 16, 18, 31, 33,
 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66.
 STD- pohlavně přenosné choroby
 hodnoty vyznačeny červeně (<0,05) - statisticky významné