

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praha 2008

Pavλίna Jarolímková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Srovnání amplifikační a neamplifikační metody detekce HPV v klinických vzorcích.

Vypracoval:

Pavλίna Jarolímková

Vedoucí bakalářské práce:

MUDr. Otakar Nyč, PhD.

Studijní obor:

Zdravotní laborant

Prohlašuji, že jsme v předložené práci použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 15. dubna 2008

.....
Podpis

Souhrn

Karcinom děložního čípku je druhým nejčastějším zhoubným nádorem u žen ve světě a je způsoben infekcí lidským papillomavirem. K šíření infekce HPV dochází především sexuálním stykem. V současnosti je HPV nejčastější sexuálně přenosnou infekcí.

Cílem této bakalářské práce a jedním z cílů grantu IGA MZ NC 5959 bylo porovnání citlivosti a specifity metody polymerázové řetězové reakce a metody neamplifikační hc2 pro detekci HPV DNA v cervikálních stěrech pacientek se suspektním cytologickým nálezem. PCR je metodou velmi citlivou a je na ní založena řada komerčních setů. V rutinních virologických laboratořích se k detekci HPV infekce dnes nejvíce používá komerčně dostupná hybridizační souprava DNA test hc2 HPV.

Klíčová slova: Papillomavirus – Polymerázová řetězová reakce – Karcinom děložního čípku - DNA test hc2 HPV

Summary

Cervical carcinoma is the second most frequent malignancy in women world wide. Infection of human papillomaviruses has been recognized as an etiological factor. HPV infection is transmitted sexually. Nowadays, it is considered as the most frequent sexually transmitted infection.

The objective of this bachelor work and one of the objectives of grant IGA MZ NC 5959 was to compare the sensitivity and specificity of the polymerase chain reaction method and the nonamplification method hc2 for detection of HPV DNA in cervical specimens of woman with suspicious cytologic findings. Many commercially available detection kits are based on the PCR method, which is very sensitive. Nowadays, the most commercially utilized kit in the routine laboratories in the Czech Republic is hc2 HPV is frequently being used for detection of HPV infection in routine virology laboratories.

Key words: Papillomavirus – Polymerase chain reaction – Cervical carcinoma - DNA test hc2 HPV

Tato bakalářská práce vznikla v Národní referenční laboratoři pro papillomaviry, v Ústavu hematologie a krevní transfuze v rámci grantu IGA MZ NC 5959.

Děkuji MUDr. Otakaru Nyčovi, PhD. za odbornou pomoc při vypracování bakalářské práce. Především bych chtěla poděkovat RNDr. Ruth Tachezy, PhD. za cenné rady, připomínky a za to, že mi umožnila absolvovat toto studium. Dále děkuji RNDr. Janě Šmahelové, RNDr. Martině Salákové, PhD. a MUDr. Elišce Mudrové za odbornou pomoc při studiu a při psaní závěrečné práce. Nakonec bych chtěla poděkovat svému příteli za trpělivost a podporu během studia.

Obsah

1.	Obecná část	1
1.1	Historie	1
1.2	Taxonomie	1
1.3	Klasifikace HPV	2
1.4	Virový genom	3
1.5	Infekční cyklus	4
1.6	Onemocnění vyvolaná HPV	5
1.6.1	Kožní infekce	5
1.6.2	Slizniční infekce	6
1.7	Přenos a rizikové faktory	6
1.8	Detekce HPV	7
1.8.1	Morfologické metody	7
1.8.2	Imunochemie	7
1.8.3	Elektronová mikroskopie	7
1.8.4	Metody detekce HPV DNA	8
1.8.4.1	Amplifikační metody	8
1.8.4.1.1	Polymerázová řetězová reakce	8
1.8.4.1.2	Nucleic Acid Sequence Based Amplification	8
1.8.4.2	Hybridizační metody	8
1.8.4.2.1	Southern blot	8
1.8.4.2.2	Dot blot hybridizace	9
1.8.4.2.3	In situ hybridizace na filtru	9
1.8.4.2.4	In situ hybridizace na sklíčkách	9
1.8.4.2.5	DNA test hc2 HPV	9
1.8.4.3	Nové komerčně dodávané testy ověřené v NRL pro PV	9
1.8.5	Serologické metody	10
1.8.6	Typy biologického materiálu	10
2.	Experimentální část	12
2.1	Cíl práce	12

2.2	Materiál	12
2.3	Principy metod	13
2.3.1	Polymerázová řetězová reakce	13
2.3.2	Elektroforéza	14
2.3.3	Southern blotting	15
2.3.4	DNA test hc2 HPV	15
2.4	Zpracování cervikálních stěrů pro detekci HPV metodou PCR	16
2.4.1	Polymerázová řetězová reakce - pracovní postup	16
2.4.2	Elektroforéza - pracovní postup	18
2.4.3	Southern blot -pracovní postup	18
2.4.4	Hybridizace - pracovní postup	19
2.4.5	Další vyšetření diskrepantních vzorků	22
2.4.5.1	Sekvenační Sangerova metoda	22
2.4.5.2	Reverse line blot assay	23
2.5	DNA test hc2 HPV - pracovní postup	24
3.	Výsledky	25
4.	Diskuse	27
5.	Závěr	28
6.	Použitá literatura	29
7.	Seznam zkratk	31

1. OBECNÁ ČÁST

1.1 Historie

Genitální bradavice znali již lékaři v 1. stol. n. l. v antickém Řecku. Tyto bradavice se v historii označovaly, mimo jiné, i jako kondylomata a toto označení se užívá dodnes.⁽¹⁾ Průkaz původu kožních bradavic provedl v roce 1907 lékař G. Ciuffo, který infikoval vlastní předloktí hrubým filtrátem z bradavic. Zajímavé pozorování ve vztahu ke karcinomu provedl v 19. století italský lékař Rigoni-Stern, který si všiml častého výskytu karcinomu děložního čípku u prostitutek ve srovnání s absencí tohoto onemocnění u jeptišek.⁽²⁾ Vlastní průkaz virových partikulí z kožních bradavic byl proveden až v roce 1949, genitálních bradavic v roce 1969.⁽¹⁾

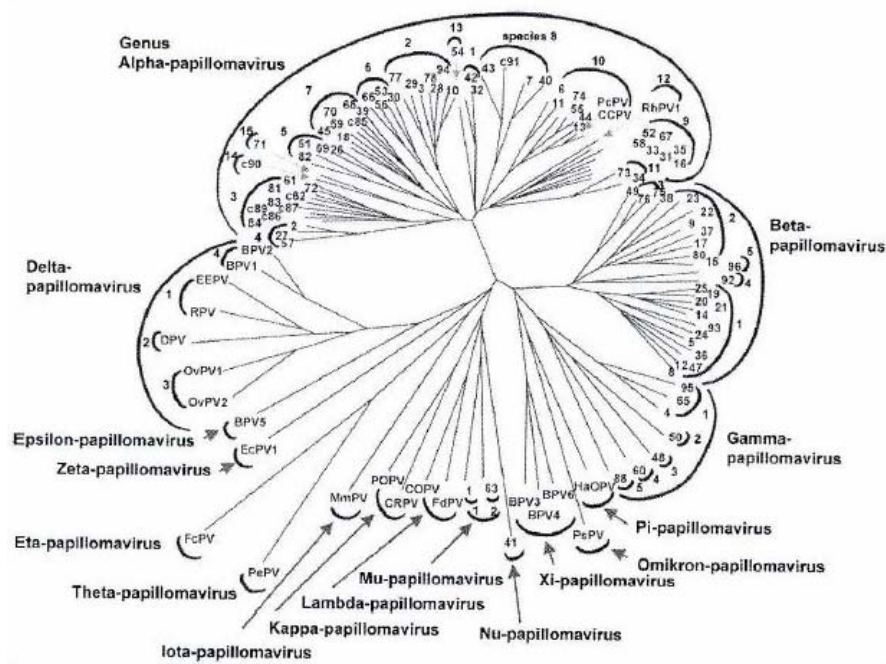
1.2 Taxonomie

Papillomaviry (PV) dříve patřily do rodu *Papillomavirus*, který společně s rodem *Polyomavirus* tvořil čeleď *Papovaviridae*. Později byly oba rody překlasifikovány na podčeledi *Polyomavirinae* a *Papillomavirinae*. V roce 2000 došlo k rozdělení čeledi *Papovaviridae* na dvě samostatné čeledi: *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae*.

PV jsou dále řazeny do rodů označovaných řeckými písmeny (alfa, beta atd.) a do druhů označovaných arabskými číslicemi (1, 2 atd.). (Obr. č.1)

Nejvíce genotypů PV bylo dosud nalezeno u člověka. Další byly izolovány z lézí primátů, kopytníků, šelem, mořských savců, hlodavců, ale i z vačnatců a ptáků. U lidí vyvolávají tvorbu papillomů a zhoubných nádorů – karcinomů. U zvířat jsou nejčastějším projevem infekce PV kožní papillomy, ale byl zaznamenán i výskyt karcinomu v genitální oblasti. U kopytníků PV vyvolávají též fibromy, fibropapillomy a fibrosarkomy. PV jsou druhově specifické a přenos mezi druhy nebyl dosud zaznamenán.⁽¹⁾

PV jsou malé, asi 55 nm velké viry s ikosahedrání neobalenou kapsidou a genomem tvořeným jednou dvouřetězcovou kruhovou DNA s přibližně 8 000 páry bází (pb).⁽³⁾ (Obr. č. 2)

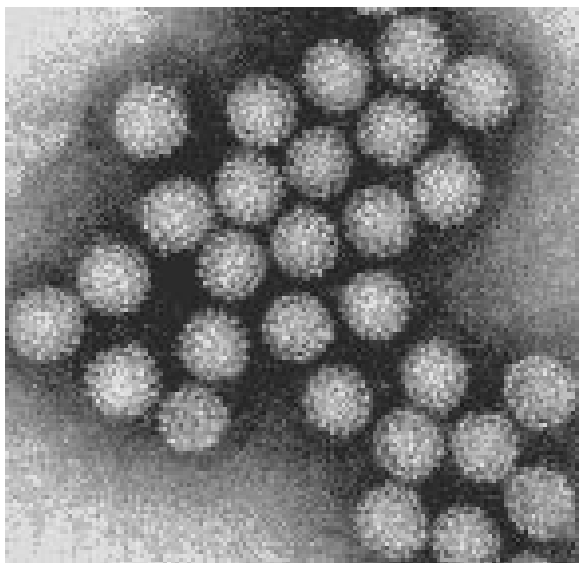


Obr. č. 1 Fylogenetický strom papillomavirů (převzato DE VILLIERS a spol. 2004).

1.3 Klasifikace HPV

V současné době známe více než 130 molekulárně charakterizovaných typů lidských papillomavirů (HPV). Klasifikace HPV virů je založena na odlišnostech ve struktuře DNA kódující oblasti pro pozdní protein L1 a časné proteiny E6 a E7. Homologie ve struktuře DNA nižší než 90% určuje genotypy, 90-98% souhlas ve struktuře určuje subtypy, souhlas vyšší než 98% pak varianty.⁽³⁾

Na základě tkáňové specifity dělíme HPV na kožní a slizniční.⁽⁴⁾ Dle schopnosti vyvolat neoplastickou transformaci dělíme papillomaviry na nízko- (LR – low risk) (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 a 81) a vysoko-rizikové (HR – high risk) (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82) typy.⁽⁵⁾



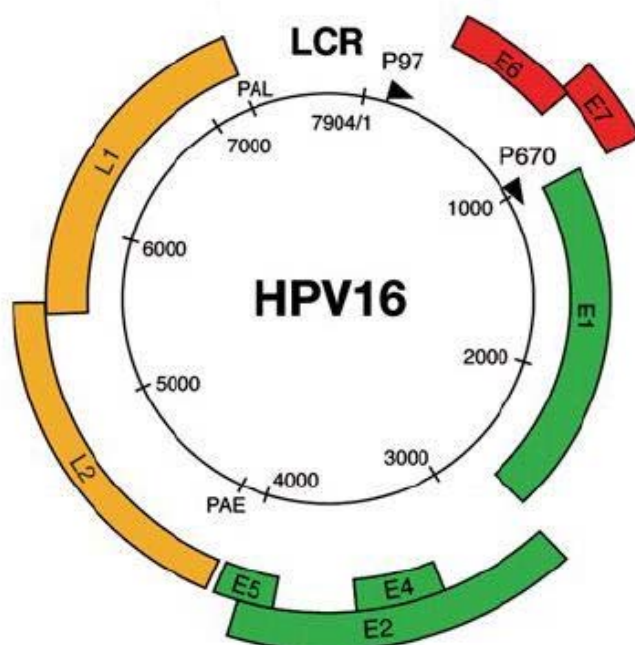
Obr. č. 2 Elektronmikroskopický snímek papillomavirů (www.papillomavirus.cz).

1.4 Virový genom

Genom obsahuje časnou (E – early), pozdní (L – late) a nekódující oblast (LCR – long control region). (Obr. č. 3) Nekódující kontrolní oblast tvoří asi 10% genomu a obsahuje místa pro vazbu virových a buněčných transkripčních faktorů a místo počátku replikace virové DNA. V pozdní oblasti se nacházejí dva otevřené čtecí rámce (ORF) pro hlavní protein L1 a minoritní protein L2, které tvoří virový obal. Protein L1 je vysoce sekvenčně konzervativní, proto se využívá pro porovnání jednotlivých typů a variant PV. Při expresi v rekombinantních systémech vytváří spontánně pseudopartikule, to znamená prázdné částice uspořádaním podobné partikulím složených z obou kapsidových proteinů. Časná oblast obsahuje 5-8 ORF označovaných E1- E8. Časné proteiny se uplatňují při replikaci HPV, při přežívání v infikované tkáni a při procesu iniciace nesmrtnosti buňky. E1 se podílí na replikaci virové DNA. Protein E2 se uplatňuje jako transkripční faktor, tvoří dimery, které se vážou na specifická místa v LCR. Pro zahájení replikace virové DNA je nutná vzájemná součinnost E1 a E2. Funkce proteinu E3 není známa. Protein E4 vzniká poměrně pozdě ve virovém cyklu. Spojuje se s cytoskeletem infikovaných buněk a předpokládá se, že hraje důležitou roli při dozrávání viru a napomáhá uvolnění virionů z buňky. Protein E5 je hlavním transformačním proteinem bovinních PV (BPV), pravděpodobně se také podílí na

transformaci buněk infikovaných HPV. Proteiny E6 a E7 kódují dva hlavní onkoproteiny.⁽⁶⁾ Zajišťují immortalizaci buněk a udržení tohoto stavu, jsou vždy produkovány v nádorové tkáni a vážou se na buněčné proteiny p53, resp. pRB, jenž v buňce negativně regulují buněčný cyklus a vyřazují je tak z funkce.⁽¹⁾

Všechny papillomaviry analyzované do současné doby mají geny E1, E2, E4, E6 a E7, zatímco geny E5 a E8 se vyskytují jen u některých papillomavirů a gen E3 byl zjištěn pouze u BPV-1.⁽⁷⁾



Obr. č. 3 Organizace genomu HPV 16 (převzato DOORBAR a spol. 2006 a upraveno).

1.5 Infekční cyklus

Infekční cyklus PV je úzce spojen s diferenciací cílové buňky. Přes drobná poranění (mikrotraumata) vstupuje virus do nediferencovaných keratinocytů bazální membrány epitelu. Přejít mezi dlaždicovým a cylindrickým epitelem patří mezi nejvíce vnímavou oblast pro infekci. Nacházíme jej na děložním hrdle ale také v oblasti krku (epiglotis) nebo v oblasti anální. Zvláště náchylné k infekci jsou nezralé metaplastické buňky. Virový genom zůstává v infikovaných buňkách obvykle v

epizomální formě a postupně dochází k přepisu všech časných i pozdních genů a tvorbě a dozrávání nových infekčních virových partikulí v diferencovaných keratinocytech na povrchu epitelu. Během vývoje léze může však dojít k integraci papillomavirové DNA do buněčného genomu. Aby se virová DNA mohla začlenit do genomu hostitelské buňky, musí dojít k přerušení kruhové molekuly. K tomu dochází v oblasti genu E2, který kóduje virový transkripční faktor, a funguje i jako represor transkripce virových onkogenů E6, E7. Jeho inaktivace tedy může vést k nadprodukci E6 a E7 a také k nekontrolované proliferaci buňky a vzniku maligního klonu.⁽¹⁾⁽⁴⁾ Doba, která uběhne od infekce ke vzniku viditelných lézí, je relativně dlouhá, pohybuje se v rozmezí měsíců.

Imunitní systém není v boji proti HPV příliš účinný a imunitní odpověď na infekci je slabá. HPV infekce nemají viremickou fázi, většinou nejsou provázeny zánětem, a proto se netvoří prozánětlivé cytokiny a nejsou aktivovány antigenprezentující buňky (APC). Replikace HPV a uvolňování virionů nezpůsobuje smrt buňky. Infekční virové částice se uvolňují až z vrchních vrstev odumírajícího epitelu a tím jsou pro APC špatně dostupné.⁽⁸⁾

1.6 Onemocnění vyvolaná HPV

1.6.1 Kožní infekce

HPV vyvolávají benigní kožní onemocnění, jako je *verruca plana*, *verruca vulgaris*, *verruca plantaris*. Nejčastěji jsou v těchto lézích nacházeny HPV typy 1, 2, 3, 7 a 10.⁽⁵⁾

Epidermodysplasia verruciformis (EV) je vzácné autozomálně recesivně dědičné onemocnění epitelu. U 50 % pacientů dochází na místech vystavených slunečnímu záření k malignímu zvratu těchto lézí asociovaných s infekcí HPV-5. V benigních EV lezích bylo prokázáno asi 20 různých typů HPV, ale jen typy 5, 8 a 14 se vyskytují i v maligních lezích EV. Roli hrají i mutace v genech EVER 1 a 2, které určují citlivost jedince k HPV infekci.⁽⁵⁾

1.6.2 Slizniční infekce

Genitální bradavice – *condylomata accuminata*, jsou běžně diagnostikovaným venerickým onemocněním, lokalizovaným nejčastěji na vulvě, penisu, čípku děložním, v anální a perianální oblasti. Nejčastěji jsou vyvolané typy HPV 6, 11 a 42. V současnosti jsou genitální bradavice nejčastějším virovým sexuálně přenosným onemocněním (STD).⁽⁹⁾

Rekurentní laryngeální papillomatóza (recurrent respiratory papillomatosis – RRP) je onemocnění hrtanové příklopky a hlasivek u dětí a dospělých. RRP se může šířit až do trachey a bronchů. Toto onemocnění vyvolávají HPV typy 6 a 11.⁽⁹⁾

Fokální epiteliální hyperplazie (morbus Heck) je onemocnění dutiny ústní, které se projevuje uzlíkovitými zduřeninami. Vyskytuje se endemicky v populaci eskymáků a amerických indiánů a je vyvolána typy HPV 13 a 32.⁽⁹⁾

Intraepiteliální neoplazie jsou prekancerózní stádia karcinomu děložního čípku (CIN), vagíny (VAIN), vulvy (VIN), penisu (PIN) a perianální oblasti (PAIN). V lezích nižší závažnosti nalezneme velké množství HPV typů, a to i LR HPV, ale v lezích závažnějších lze identifikovat jen HR HPV typy. HR HPV byly prohlášené za etiologické agens všech karcinomů děložního čípku (KDCČ), celosvětově druhého nejčastějšího nádorového onemocnění žen.⁽⁹⁾

1.7 Přenos a rizikové faktory

K přenosu kožní infekce dochází buď přímo osobním kontaktem nebo zprostředkovaně přenosem přes kontaminované plochy a předměty. K šíření infekce genitálními typy HPV dochází převážně sexuálním stykem a vertikálně z matky na dítě. Nákaza lidskými papillomaviry je v současnosti nejčastější sexuálně přenosnou infekcí. Během života je nakaženo alespoň jedním typem až 80% sexuálně aktivních lidí. U sexuálně aktivních dívek se jedná o přechodnou infekci, která většinou proběhne bez jakýchkoliv klinických projevů a organismus se této infekce sám zbaví. Ani dnes však nevíme, jestli virus úplně vymizí nebo jestli v epitelu zůstává a jeho přítomnost jen

nelze dostupnými technikami zjistit. S věkem roste pravděpodobnost dlouhodobého přežívání viru v těle ženy a vzniku závažného onemocnění.

Kromě přítomnosti HR HPV jsou ke vzniku KDC potřebné další faktory. Patří k nim počet sexuálních partnerů, nízký věk koitarché, kouření, hormonální antikoncepce, počet porodů a další sexuálně přenosné infekce, včetně HIV. ⁽⁵⁾

1.8 Detekce HPV

Infekce HPV v genitálním traktu může mít formu klinickou, subklinickou nebo latentní. Léze, které lze pozorovat pouhým okem označujeme jako klinickou formu infekce. Subklinická forma infekce může být zjištěna pomocí morfologických metod - kolposkopie, cytologie a histologie. K detekci latentní formy infekce je nutné použít metody molekulárně-biologické, protože tato forma infekce nevyvolává žádné morfologické změny dlaždicového epitelu. ⁽⁵⁾

1.8.1 Morfologické metody

Morfologické metody umožňují detekovat subklinickou formu HPV infekce. Charakteristickými změnami epitelálních buněk je přítomnost koilocytů a ztráta jader. Cytologický test byl vyvinutý již v roce 1928 Papanicolouem. Původně cytologie užívala tzv. Papanicolauovu klasifikaci (PAP I - V) stěrů z děložního čípku, ale od roku 1989 se používá systém Bethesda, který rozděluje cytologické nálezy na normální, atypický (ASCUS, AGUS), léze nízkého stupně (low grade lesions – LGL), léze vysokého stupně (high grade lesions – HGL) a invazivní karcinom (CA). Tento systém je dále pozměněný od roku 2001. ⁽⁵⁾

1.8.2 Imunochemie

Pro určité účely, spíše výzkumné, se používá detekce HPV pomocí specifických polyklonálních protilátek, které detekují přítomnost strukturálních proteinů, nejčastěji proteinu L1. Omezením této metody je její nízká citlivost. ⁽⁵⁾

1.8.3 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie se používá k průkazu PV partikulí v tkáních. Použití této metody je omezené, protože PV partikule jsou produkovány jen v některých lézích vyvolaných HPV. ⁽⁵⁾

1.8.4 Metody detekce HPV DNA

Metody molekulárně-biologické dělíme na metody amplifikační (polymerázová řetězová reakce, Nucleic Acid Sequence Based Amplification) a metody hybridizační (Southern blot, dot blot, in situ hybridizace na filtru, in situ na sklíčkách, detekce HPV DNA přímou hybridizací). ⁽⁵⁾

1.8.4.1 Amplifikační metody

1.8.4.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda při níž je HPV DNA před detekcí nejprve zmnožena. Touto metodou lze zachytit přítomnost i jediné molekuly papillomavirové DNA. Nevýhodou PCR je možná kontaminace cizorodou DNA. Tomu lze předejít důsledným dodržováním čistoty okolního prostředí, použitých pomůcek a zařazením negativní kontroly do každého kroku přípravy vzorku a provádění vlastní reakce. Jde o vzorek, který obsahuje reakční směs bez vyšetřované DNA. ⁽⁵⁾

1.8.4.1.2 Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)

NASBA je izotermická amplifikační reakce, která na rozdíl od PCR, vyžaduje 3 enzymy: reverzní transkriptázu, Rnasu H a T7 RNA polymerázu a umožňuje detekovat RNA. Na této metodě je založen komerčně dostupný test NucliSENS EasyQ® HPV v1.0 od firmy BIOMÉRIEUX, který v této době testujeme v laboratoři. Tímto testem lze detekovat mRNA 5ti nejčastěji zastoupených typů v karcinomu děložního hrdla a zjistit tak transkripčně aktivní virus.

1.8.4.2 Hybridizační metody

1.8.4.2.1 Southern blot (SB)

Tato metoda je časově náročná a vyžaduje velké množství výchozího materiálu. Ze vzorku je třeba extrahovat vysokomolekulární DNA, provést štěpení restrikcími

endonukleázami a fragmenty přenést na membránu, kde je poté provedena hybridizace. Využívá se při izolaci nových virů. ⁽⁵⁾

1.8.4.2.2 Dot blot hybridizace (DB)

U této metody je možné pracovat s hrubým lyzátem, není nutná extrahovaná DNA. Buněčná DNA je denaturována a fixována na membráně a následně je provedena hybridizace. V dnešní době se tato metoda již příliš nepoužívá. ⁽⁵⁾

1.8.4.2.3 In situ hybridizace na filtru (FISH)

Prvním krokem je rozpuštění materiálu v pufru, nanesení na membránu, lyzování v alkalickém prostředí. Membrána je následně hybridizována s HPV specifickými sondami. Nevýhodou je nízká citlivost, vysoké pozadí po hybridizaci a vysoké množství falešně pozitivních a falešně negativních vzorků. Z těchto důvodů se již tato metoda nepoužívá. ⁽⁵⁾

1.8.4.2.4 In situ hybridizace na sklíčkách (ISH)

Tato metoda umožňuje topografickou lokalizaci HPV DNA a RNA v buňkách a tkáních. Lze ji použít na buňky fixované na sklíčkách a na řezy ze zmrazených biopsií nebo biopsií zalitých v parafínu. K rutinnímu vyšetření klinických vzorků se pro pracnost a nízkou citlivost nepoužívá. ⁽⁵⁾

1.8.4.2.5 DNA test hc2 HPV - detekce HPV DNA přímou hybridizací

Principem komerčně dostupného DNA testu hc2 HPV firmy DIGENE je chemiluminiscenční stanovení nukleové kyseliny hybridizací na mikrodestičce s amplifikací signálu pro kvalitativní detekci 18 typů DNA lidského papillomaviru, s nízkým a s vysokým rizikem.

1.8.4.3 Nové komerčně dodávané testy ověřené v NRL pro PV

Nové komerčně dodávané testy v ČR (tab. č. 1) jsou založené na detekci PCR produktů pomocí obrácené hybridizace k pevně ukotvené próbě a následné reakci s barevným substrátem.

Tab. č. 1 Nové diagnostické komerční testy dostupné v ČR, testované v NRL pro PV.

FIRMA	NÁZEV SETU	DETEKCE
Roche	AMPLICOR® HPV	13 HR HPV typů
Roche	LINEAR ARRAY HPV	37 HPV typů
INNOGENETICS	INNO-LiPA	25 HPV typů
Gentech	HPV DNA PCR	5 LR a 7 HR HPV typů
GenID® GmbH, Germany	HPV-screening	6 LR a 17 HR HPV typů
BCS Biotech s.p.a.	ProDect® CHIP HPV TYPING	23 HPV typů

1.8.5 Serologické metody

Serologické metody umožňují zjistit, jestli se organismus s infekcí HPV již setkal. Protilátky proti virově specifickým proteinům jsou nejčastěji detekovány enzymoimunoanalýzou (ELISA) a méně často Western-blotem. Jako antigeny se dnes nejčastěji používají tzv. pseudopartikule (také VLP - virus-like particles), které jsou nejčastěji tvořené pouze proteinem L1 a připravované na hmyzích buňkách nebo v kvasinkových systémech. Druhým typem antigenů jsou fúzní proteiny získané expresí celých proteinů v bakteriálních expresních systémech.

1.8.6 Typy klinického materiálu

K vyšetření HPV molekulárně–biologickými metodami lze použít stěry štětečkem z děložního čípku, uretry, penisu, anální oblasti, oka, dutiny ústní a hrtanu, probatorní biopsie, nefixované vzorky tkáně, parafínové řezy, výplachy z úst, bronchoalveolární laváž a aspirát.

Stěry z děložního čípku, uretry, anální oblasti, penisu, oka, dutiny ústní a hrtanu se provádí štětečkem do zkumavky s transportním médiem a uchovávají po dobu jednoho týdne při +4°C.

Probatorní biopsie a nefixované vzorky tkáně je nutné buď ihned po odebrání zamrazit na –70°C, případně vložit do zkumavky s transportním médiem a zamrazit na

-70°C a takto lze vzorek skladovat dále neomezeně. Skladování při -20°C je možné nejdéle jeden týden. Vzorke se dopravují do laboratoře na suchém ledu, nesmí během transportu rozmrznout.

U parafínových řezů musí být tkáň fixovaná v pufrovaném neutrálním formalínu, metakarnu, acetonu nebo etanolu. Pro analýzu obvykle postačují 2 řezy o síle 20 µm ve sterilní mikroskopické, ale je třeba aby v řezu bylo přítomné dostatečné množství nádorových buněk (alespoň 10%).

Výplach dutiny ústní se provádí 10 ml sterilního fyziologického roztoku a skladuje se při +4°C nejdéle jeden týden.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo srovnání amplifikační a neamplifikační (hybridizační) metody pro detekci HPV DNA v cervikálních stěrech. Jako amplifikační metoda byla použita PCR s následnou detekcí amplikonů na elektroforetickém gelu a hybridizací. K neamplifikačnímu stanovení HPV DNA byla použita komerčně dostupná souprava DNA test hc2 HPV od firmy DIGENE.

2.2 Materiál

Studie zahrnovala pacientky ve věku 16 až 79 let, průměrný věk testovaných byl 37 let. Vyšetřeno bylo celkem 651 žen, které byly poslány do Centra gynekologicko-onkologické prevence (CGOP), Kateřinská, Praha 2 na základě předešlého cytologického nálezu ASCUS/AGUS. Při vstupní prohlídce v CGOP byl ženám odebrán exo+endocervikální stěr. Cervikální stěry pro detekci HPV DNA byly odebrány s použitím soupravy HC Cervical Sampler (DIGENE) a to před odběrem vzorku na cytologické vyšetření. (Obr. č. 4) Souprava HC Cervical Sampler obsahovala kartáček, 1 ml transportního média a podrobný návod. Po odběru se kartáček z odběrové soupravy vložil do média a zalomil. Vzorky byly skladovány při +2–8°C, pokud se stanovení provedlo do jednoho týdne. Jestliže zkouška nebyla provedena v jednom týdnu, byly vzorky uskladněny při -20°C.



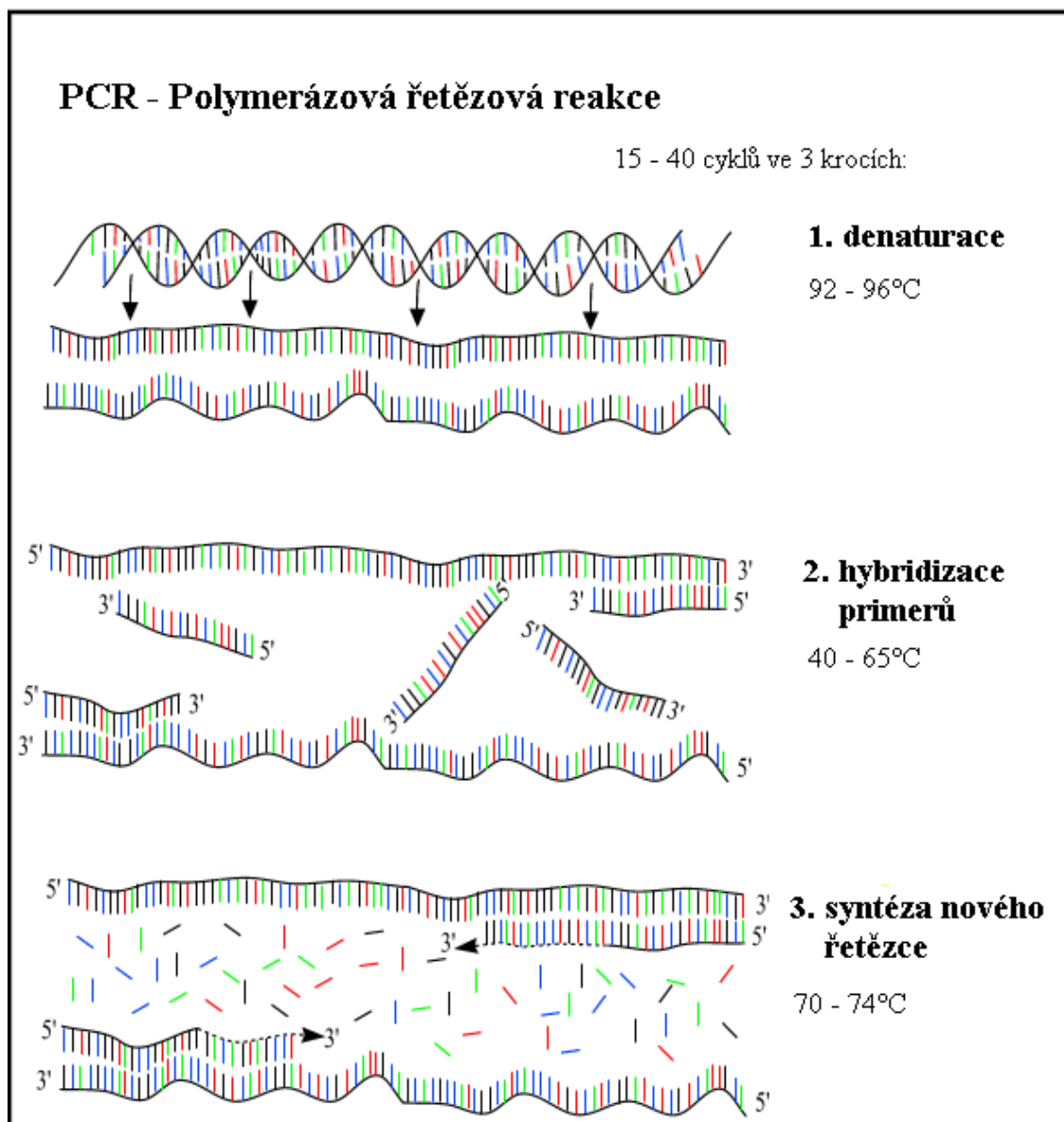
Obr. č. 4 Odběrová souprava HC Cervical Sampler (DIGENE).

2.3 Principy metod

2.3.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR slouží ke zmnožení, neboli amplifikaci, specifických úseků DNA. Amplifikační proces vyžaduje několik základních komponent: templát, Taq polymerázu (DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*), primery, 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) a vhodný pufr. Templát slouží jako vzor pro syntézu nových molekul DNA. Oligonukleotidové sondy (primery) jsou obvykle dlouhé 20 – 25 pb, vymezují syntetizovaný úsek a slouží jako počátek pro syntézu. Termostabilní DNA polymeráza syntetizuje novou DNA ve směru 5'-3' podle templátu. dNTP: 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) jsou stavebními kameny pro syntézu nového řetězce DNA. Pracovní pufr zajišťuje optimální podmínky pro aktivitu příslušné DNA polymerázy. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler, který je programovatelný pro teplotní režim a automatické střídání jednotlivých teplotních kroků reakce.

Princip metody PCR spočívá ve třech teplotních krocích. (Obr. č. 5) Prvním krokem je denaturace templátové DNA při teplotě nad 90°C, při které dochází k přerušení vodíkových můstků mezi bázemi a k vzájemnému uvolnění obou polynukleotidových vláken. V následujícím kroku, při snížení teploty na 50 – 60°C, v závislosti na počtu GC párů v primerech, dojde k jejich připojení ke komplementárním úsekům templátu. Následuje fáze elongační, spočívající v prodloužení nového řetězce DNA od primeru ve směru 5'-3' na druhý konec vymezeného amplifikovaného úseku za optimální pracovní teploty pro Taq polymerázu při 72°C. Za předpokladu 100% účinnosti, lze opakováním teplotních cyklů vytvořit až 10^9 kopií původní molekuly DNA. Lze vypočítat, že z jedné molekuly o délce 200 pb po 30 cyklech získáme až 0,24 ng DNA. Podstatnou podmínkou pro použití metody PCR je znalost sekvence aspoň hraničních úseků oblasti, kterou chceme syntetizovat, aby bylo možné matematickým programem navrhnout a optimalizovat sekvenci a chemickou syntézou připravit oligonukleotidy.⁽¹⁰⁾



Obr. č. 5 Princip PCR (převzato VIERSTRAETE a spol. 1999 a upraveno).

2.3.2 Elektroforéza

Elektroforéza slouží k rozdělení DNA fragmentů o nestejně délce. DNA má celkově slabě negativní náboj a v elektrickém poli putuje ke kladné elektrodě. Rychlost putování je závislá na její celkové délce a struktuře. Vzorky jsou nanášené na horizontální gel, který je ponořený do vhodného pufru v elektroforetické vaničce mezi elektrodami. V gelu u záporné elektrody jsou jamky, do kterých se vzorek DNA nanese, po zavedení elektrického proudu se fragmenty rozdílných délek a struktury po čase rozdělí. K vizualizaci fragmentů se nejčastěji používá barvení etidium bromidem

(EtBr), který se interkaluje mezi páry bazí dvoušroubovice a při vlnové délce UV světla kolem 300 nm fluoreskuje. K barvení se používá buď lázeň o koncentraci EtBr 0,5 µg/ml, nebo lze přímo přidat EtBr do gelu. Dokumentace je prováděna fotograficky.⁽¹¹⁾

2.3.3 Southern blotting

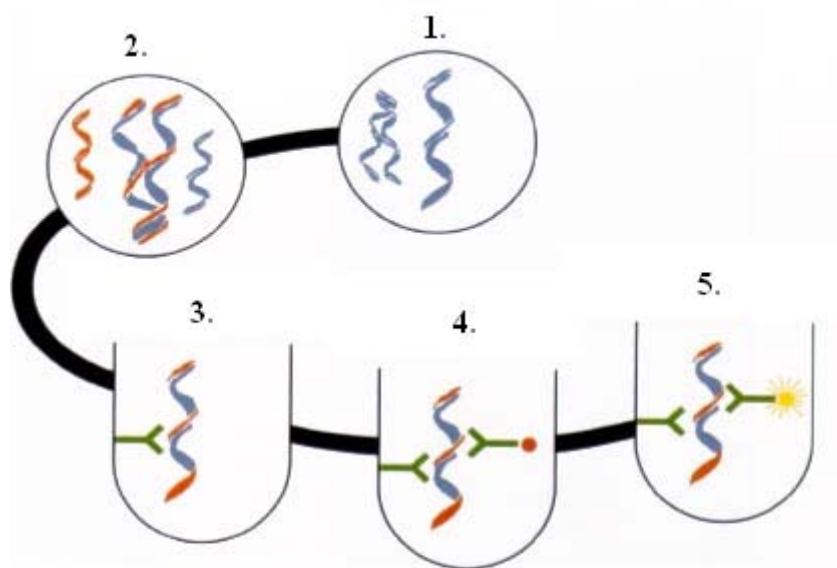
PCR produkty jsou přeneseny (přepijákovány) z elektroforetického gelu na nylonovou membránu a zakotveny v denaturovaném stavu na membráně a tak jsou připraveny k následné hybridizaci s příslušnou sondou, komplementární k analyzované sekvenci.⁽¹¹⁾

2.3.4 DNA test hc2 HPV

DNA test hc2 HPV používá techniku imobilizace hybridů. (Obr. č. 6) Jde o hybridizační test využívající protilátek navázaných na mikrodestičce s amplifikací signálu a chemiluminiscenční detekcí. Vzorky, obsahující cílovou DNA, hybridizují se směsí HPV specifických RNA sond. Výsledné hybridy RNA:DNA jsou zachyceny protilátkami, specifickými pro hybridy RNA:DNA, kterými je potažen povrch jamek mikrodestičky. Zachycené hybridy potom reagují s protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou, specifickými pro hybridy RNA:DNA, a jsou detekovány chemiluminiscenčním substrátem. Na každou protilátku je konjugováno několik molekul alkalické fosfatázy. Mnohonásobně konjugované protilátky se váží ke každému zachycenému hybridu, což má za následek velikou amplifikaci signálu. Substrát je štěpen konjugovanou alkalickou fosfatázou a dojde k vyzáření světla. Světelné kvantum je měřeno luminometrem a vyjádřeno v relativních světelných jednotkách (RLU). Intenzita vyzářeného světla indikuje přítomnost či nepřítomnost cílové DNA ve vzorku.

Výsledek měření RLU, shodné či větší než hodnota hranice positivity, znamená přítomnost sekvencí DNA HPV ve vzorku. Je-li hodnota RLU nižší než hodnota hranice positivity, znamená to, že specifická testovaná sekvence DNA HPV není přítomna, nebo že množství přítomné ve vzorku je pod detekčním limitem metody.

Tento test detekuje typy HPV s nízkým rizikem 6, 11, 42, 43, 44 a typy HPV s vysokým rizikem 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, ale rozliší pouze LR a HR skupinu, nerozliší již jednotlivé typy uvnitř těchto skupin.



Legenda:

1. denaturace vzorku
2. hybridizace s HPV RNA sondou
3. zachycení hybridů RNA:DNA za použití monoklonálních protilátek navázaných na stěnách mikrodestičky
4. reakce s protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou
5. alkalická fosfatáza štěpí chemiluminiscenční substrát za produkce světla

Obr. č. 6 Princip DNA test hc2 HPV (převzato firma DIGENE a upraveno).

2.4 Zpracování cervikálních stěrů pro detekci HPV metodou PCR

Vzorek v transportním médiu jsme důkladně promíchali a do mikrozkušavky odebrali 200 μ l. Buňky z těchto 200 μ l jsme sedimentovali 30 min při 14 000 ot. a +4°C. Následně jsme je resuspendovali v 50 μ l lyzačního pufru K (50 mmol Tris-HCl; 1 % Tween-20; 5 mmol EDTA; pH 8,0) se 100 μ g/ml proteinasy K (Fermentas). Lýze probíhala 2 hod při 56°C, pak při 37°C přes noc a vzorek jsme inaktivovali 10 min při 96°C. Takto připravené hrubé lyzáty jsme skladovali při teplotě -20°C.

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce - postup

PCR je snadná a rychlá metoda, ale je nutné přísně dodržovat zásady, aby nedošlo ke kontaminaci. K detekci HPV bylo vyvinuto několik PCR systémů. Tyto systémy využívají buď typově specifické primery, nebo primery degenerované a

obecné. Degenerované a obecné primery dokáží zjistit široké spektrum HPV typů v jedné reakci. Typově specifické primery amplifikují pouze jeden konkrétní typ HPV. Výběr vhodného systému je dán:

- cílovou oblastí, kterou daný systém amplifikuje
- možností integrace HPV DNA do genomu hostitelské buňky (Pozn.: Během integrace dochází k přerušení či ztrátě genu E1, E2 nebo L1, ale geny E6 a E7 zůstávají vždy zachovány.)
- délkou amplifikované oblasti (Pozn.: Například při detekci HPV DNA v archivním materiálu izolovaném z parafinových bločků je lépe zvolit systém amplifikující fragmenty o délce kolem 200 pb, neboť DNA izolovaná z těchto materiálů bývá často degradovaná v důsledku nešetrné fixace a stáří materiálu.)
- specifita primerů (Pozn.: Pro detekci HPV dnes existují dva spolehlivé, dobře ověřené systémy, které v reakci zachytí všechny známé typy genitálních HPV. Oba tyto systémy amplifikují úsek v L1 genu, jehož sekvence je u většiny HPV typů značně konzervovaná.)

Ke zjištění HPV pomocí PCR je nutná i amplifikace pozitivní, negativní a tzv. vnitřní kontroly, nejčastěji β -globinového genu. Jestliže je amplifikace vnitřní kontroly negativní, a to i po případném přečištění vzorku, nelze tento vzorek metodou PCR hodnotit. Důvodem může být malé množství vzorku, nebo přítomnost inhibitorů.

K detekci HPV DNA v naší studii jsme využívali degenerované primery nazývané MY09 a MY11, které amplifikují 450 pb dlouhý úsek v L1 genu. Tyto primery umožňují identifikaci nejen všech známých genitálních lidských papillomavirů, ale i detekci a charakterizaci nových, dosud neznámých typů.

Sto μ l reakční směsi obsahovalo 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.5; 50 mmol/l KCl; 4 mmol/l $MgCl_2$; 0,2 mmol/l každého ze čtyř deoxynukleotidů (Fermentas); 0,5 pmol/l každého primeru MY09 a MY11 (Invitrogen) a 2,5 U Taq polymerázy (Fermentas). Jako kontrolu přítomnosti dostatečného množství DNA a nepřítomnosti inhibitorů PCR jsme do reakce přidali primery PC04 a GH20 (Invitrogen), specifické pro β -globinový gen. V každém běhu jsme zařazovali pozitivní kontrolu (SiHa buňky – buněčná linie odvozená z karcinomu děložního čípku, obsahující 1 - 2 kopie HPV 16 DNA) a negativní kontrolu (buněčná linie lidských plicních embryonálních fibroblastů). Reakce probíhala v termocykleru PTC 200 (MJ Research). Po počáteční denaturaci 5 min při

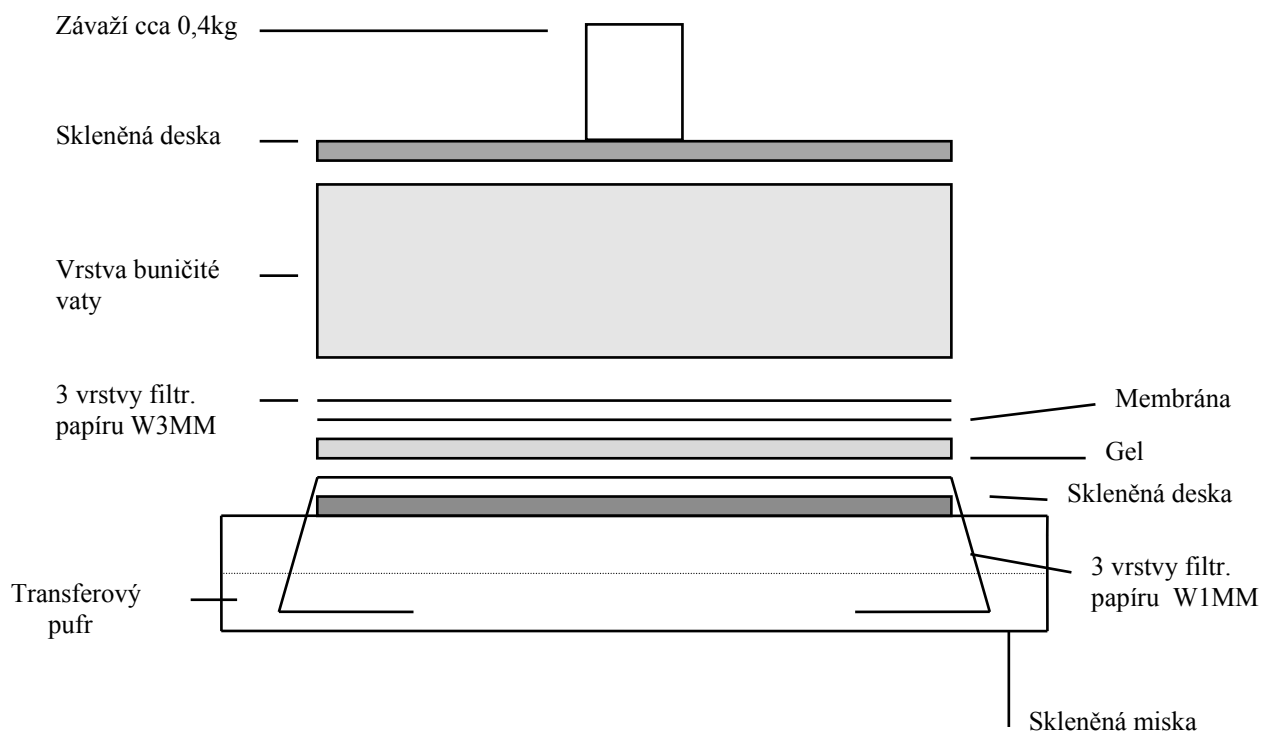
95°C se každý ze 40 cyklů PCR skládal z denaturace 1 min při 95°C, připojení primeru 2 min při 55°C a syntézy řetězce 2 min při 72°C. Pro dokončení syntézy všech řetězců jsme na závěr přidali 3 minutovou inkubaci při 72°C.

2.4.2 Elektroforéza - postup

Deset μl vzorku jsme upravili přidáním 3 μl nanášecího roztoku a nanесли do jamek 3% agarózového gelu (NuSieve 3:1, Sigma). Připojili zdroj stejnosměrného napětí a nastavili čas 50 minut a napětí 150 V. Po požadovaném rozdělení DNA jsme gel barvili 30 minut v lázni ethidium bromidu o koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Následně prohlédli na UV prohlížečce a fotograficky zdokumentovali.

2.4.3 Southern blot - postup

DNA byla depurinována (0,25 mol/l HCl) a ekvilibrována (0,6 mol/l NaCl; 0,4 mol/l NaOH) postupným ponořením agarózového gelu do roztoků na 10 minut. Následně byla DNA přenesena z gelu na Biotodyne B nylonovou membránu (Pall Biosupport) a to tak, že nad nádobu s pufrům (0,6 mol/l NaCl; 0,4 mol/l NaOH) jsme umístili filtrační papír, na něj gel. Membránu jsme položili na povrch gelu, potom 3 vrstvy filtračního papíru a dále pak vrstva buničiny. Vše jsme zatížili cca 0,4 kg závažím. (Obr. č. 7) Přenos vztlínáním probíhal přes noc. Po neutralizaci (1 mol/l Tris-HCl, pH 7,4; 1,2 mol/l NaCl) a opláchnutí membrány v roztoku 2xSSC (0,3 mol/l NaCl; 75 mmol/l citrát sodný; pH 7), obojí 15 minut, jsme DNA fixovali k membráně 2 hod při 80°C.

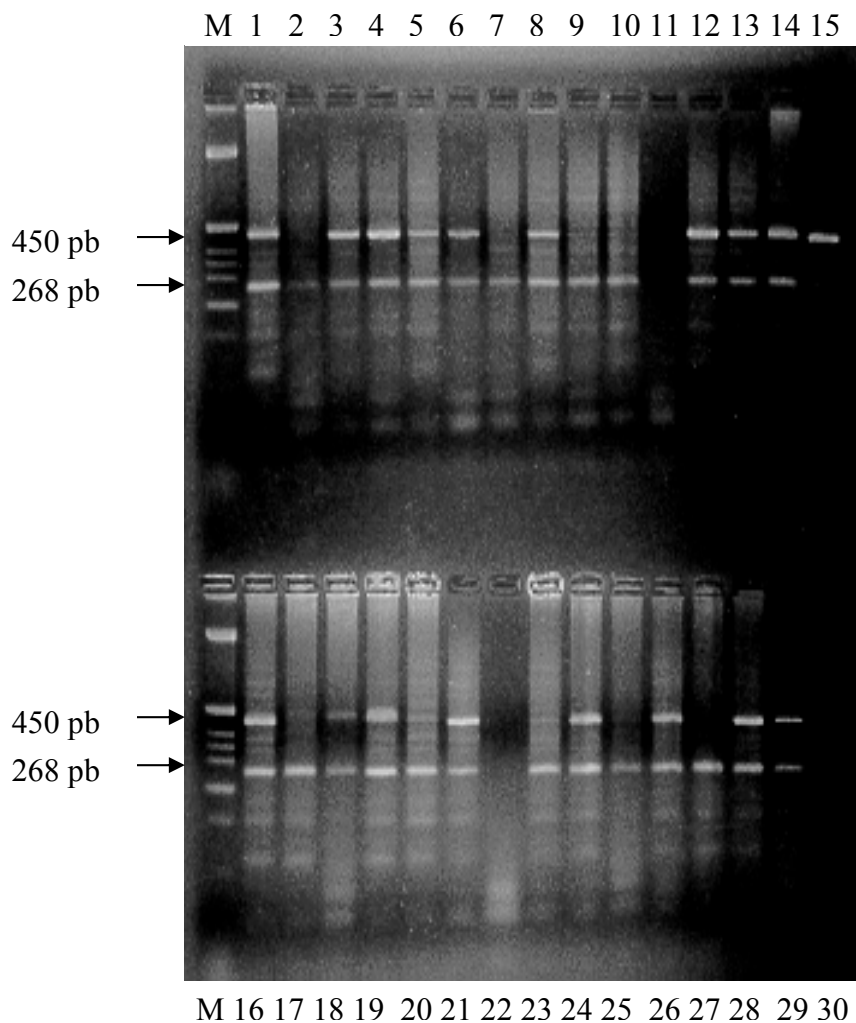


Obr. č. 7 Kapilární transfer (NRL pro PV).

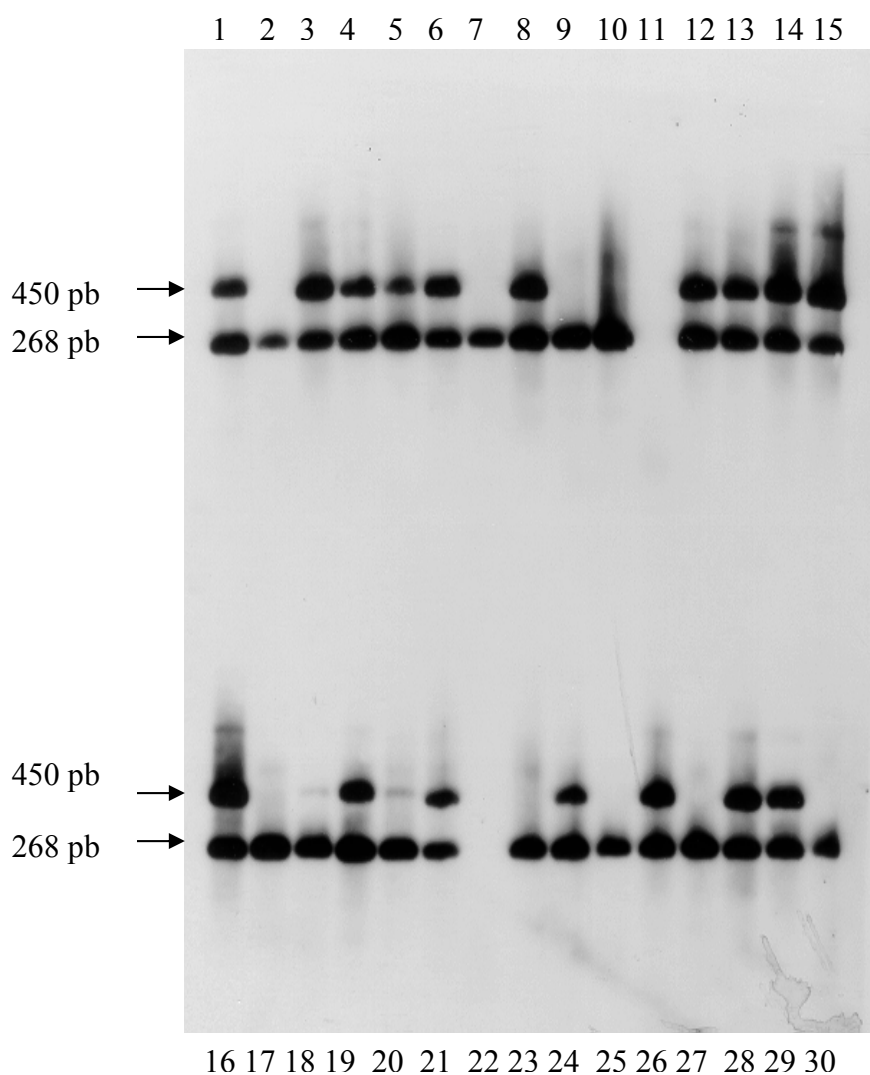
2.4.4 Hybridizace - postup

Hybridizaci jsme prováděli se směsí pěti 410 bp dlouhých prób pro HPV 11, 16, 18, 31, 51 a oligopróby specifické pro lidský β -globin. HPV próby jsme značili DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim), β -globinová próba byla označena na 5'-konci digoxigeninem. Membránu se vzorky jsme prehybridizovali 2 hod při 42°C v prehybridizačním pufru (0,75 mol/l NaCl; 75 mmol/l citrát sodný; 20% formamid; 0,1% ficoll; 0,1% BSA; 25 mmol/l NaH₂PO₄; 25 mmol/l Na₂HPO₄; 0,1 mg/ml Herring sperm DNA; 0,1% SDS; 2% blokovací roztok), ten vyměnili za prehybridizační pufr do kterého jsme přidali próby a membránu hybridizovali přes noc při 42°C. Nespecificky navázané próby jsme odmyli 2 x 5 min při laboratorní teplotě v roztoku A (2xSSC; 0,1% SDS) a dále 3x 30 minut při teplotě 50°C v roztoku B (0,5x SSC; 0,1% SDS). Membránu jsme ekvilibrovali při laboratorní teplotě v promývacím roztoku (WB) (0,1 mol/l kyselina maleinová; 0,15 mol/l NaCl; 0,3% Tween 20; pH 7,5), inkubovali 45 min v blokovacím roztoku (BS) (0,1 mol/l kyselina maleinová; 0,15 mol/l NaCl; 3,5%

blocking reagent) a poté 30 min ve stejném roztoku s Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche). Membránu jsme promyli 3 x 15 min ve WB roztoku, ekvilibrovali 5 min v detekčním roztoku (0,1 mol/l Tris-HCl; 0,1 mol/l NaCl; pH 9,5) a 5 minut inkubovali s 0,25 mol/l chemiluminiscenčním substrátem CSPD (Roche). Poté jsme membránu exponovali 30 min na Lumi-Film Chemiluminescent Detection (Roche), a dále pak podle intenzity výsledného signálu 2 hodiny nebo přes noc.



Obr. č. 8 Detekce HPV DNA pomocí primerů MY 09/11 a PC04/GH20. Primery MY 09/11 amplifikují 450 pb L1 genu a detekují HPV DNA. Primery PC03/GH20 amplifikují 268 pb dlouhý úsek β -globinového genu a ověřují kvalitu DNA ve vzorku. Na pozici M je hmotnostní marker pBR322/HinfI, pozitivní kontrola v jamce 29, negativní v jamkách 11 a 22 (NRL pro PV).



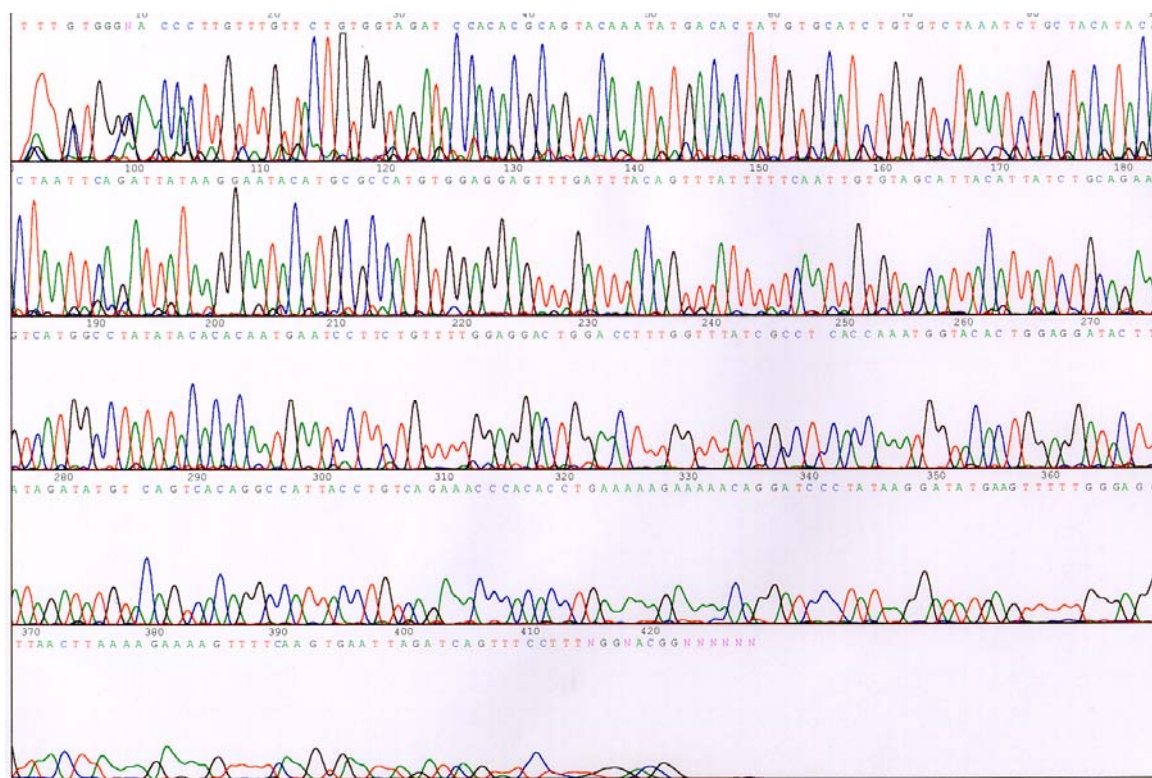
Obr. č. 9 Hybridizace produktů PCR se směsí prób HPV a oligopróby specifické pro lidský β -globin značených digoxigeninem a detekce HPV DNA. β -globin má délku amplifikovaného úseku 268 pb a délka amplifikovaného L1 genu HPV je 450 pb. Pozitivní kontrola je v pozici 29 a negativní kontrola v pozicích 11 a 22 (NRL pro PV).

2.4.5 Další vyšetření diskrepantních vzorků

U vzorků, u nichž jsme zjistili rozdílné výsledky, jsme dále určovali konkrétní typ HPV metodou sekvenační a metodou Reverse line blot assay.

2.4.5.1 Sekvenační Sangerova metoda

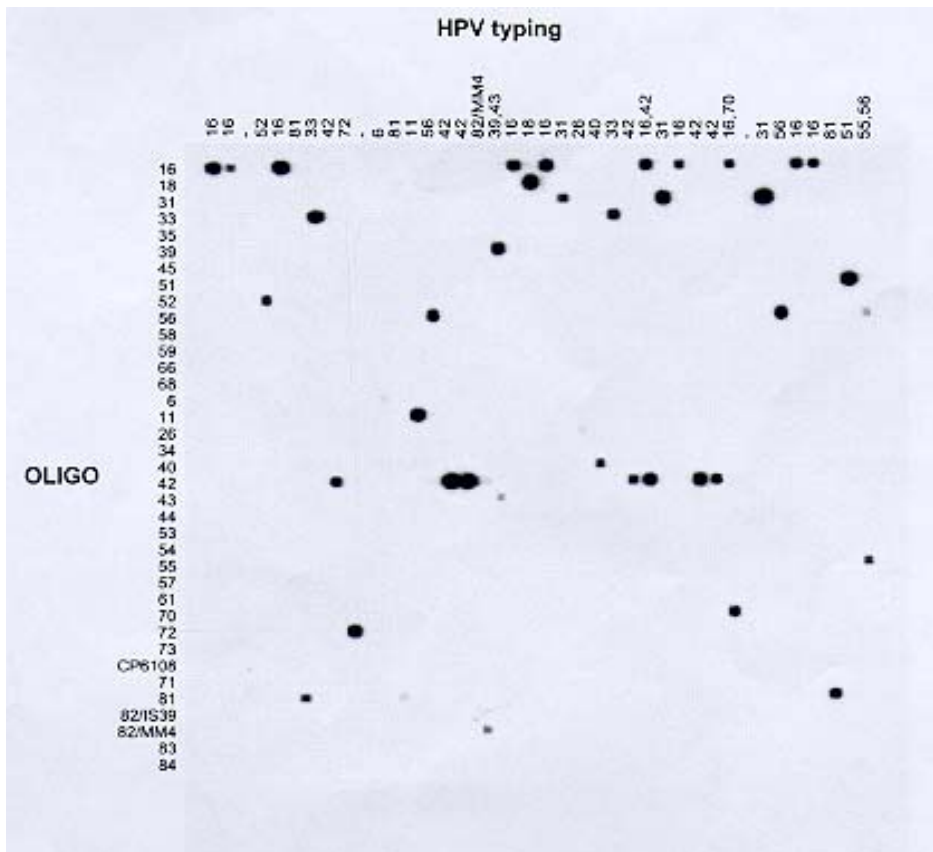
Sekvenační Sangerova metoda zařazuje fluorescenčně značené dideoxynukleotidy do nově amplifikovaných produktů během sekvenační reakce. Detekce se provádí na sekvenátorech, které jsou založeny na principu kapilární elektroforézy. Sekvenační produkt jsme připravili pomocí BigDye Terminator Primer Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems) a analýzu prováděli na přístroji ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).



Obr.č. 11 Výstup sekvenační metody (NRL pro PV).

2.4.5.2 Reverse line blot assay (RLB)

Principem RLB je obrácená hybridizace produktů amplifikace k pevně ukotvené próbě na membráně. Tímto testem lze detekovat 37 typů HPV a analyzovat 42 vzorků najednou. K přípravě PCR produktů jsme použili GP 5+/6+ bio primery, které amplifikují 150 pb.



Obr. č. 12 Výstup RLB metody (NRL pro PV).

2.5 DNA test hc2 HPV – pracovní postup

Vzorek po odebrání části materiálu na PCR reakci obsahoval 800 μ l. Buňky ve vzorku jsme denaturovali po dobu 45 minut při 65°C ve vodní lázni přidáním poloviny objemu (t.j. 400 μ l) denaturačního roztoku. Následně jsme 75 μ l vzorku přidali do mikrozkušavek a napipetovali 25 μ l sondy LR pro detekci nízkého rizika a 25 μ l sody HR do zkumavek pro detekci vysokého rizika. Vzorky jsme inkubovali ve vodní lázni 60 minut při 65°C. Obsah jsme převedli do jamek mikrodestičky a nechali třepat na rotační třepačce při 1100 rpm 60 minut. Poté jsme odstříknutím vylili obsah jamek a desku dobře osušili několikerým poklepáním, dnem vzhůru, na papírové ručníky. Přidali jsme 75 μ l konjugátu a inkubovali po dobu 30 minut. Mikrodestičku jsme 5x promyli a přidali 75 μ l substrátu. Po 15 minutové inkubaci jsme odečetli výsledky na přístroji Luminometr 2000 (DML 2000) od firmy Digene. Hranice positivity rovná 1pg/ml je ekvivalentní 100 000 HPV kopií/ml nebo 5000 HPV kopií na stanovení. Pomocí softwaru přístroje DML 2000 propojeného s PC bylo automaticky vypočítáno a vyhodnoceno, zda jsou ověřovací kritéria správná nebo nesprávná. Veškeré použité roztoky jsou součástí diagnostického setu. Součástí setu je i negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a vnitřní kontrola.



Obr. č. 10 Diagnostický set DNA test hc2 HPV (DIGENE).

3. VÝSLEDKY

V naší studii jsme vyšetřili 651 cervikálních stěrů současně amplifikační metodou PCR a hybridizační metodou DNA test hc2 HPV od firmy DIGENE.

Tab. č.2 Srovnání záchytu HPV infekce metodou hc2 a PCR.

	hc2		PCR	
	počet	%	počet	%
HPV DNA pozitivní	296	45,5	322	50,7
HPV DNA negativní	355	54,5	313	49,3
celkem	651		635 *	

* u 16 vzorků neamplifikovatelná DNA

V tabulce č.2 jsou shrnuty výsledky detekce HPV DNA zjištěné pomocí hc2 a PCR. Metodou PCR jsme detekovali HPV DNA u 50,7% vzorků, zatímco metodou hc2 jsme zjistili 45,5% vzorků jako HPV pozitivních. U 16 vzorků se nám nepodařilo připravit DNA, kterou bychom byli následně schopni amplifikovat pomocí PCR, pravděpodobně z důvodu nedostatečného množství materiálu, či přítomnosti inhibitorů reakce. Tyto vzorky byly vyloučeny z dalších analýz.

Tab. č.3 Rozložení HPV typů v HPV DNA pozitivních vzorcích v testu hc2.

hc2		
typ	počet	%
LR	10	3,4
HR	254	85,8
LR+HR	32	10,8

Metoda hc2 umožňuje určit přítomnost LR nebo HR HPV ve vzorku. Většina našich HPV DNA pozitivních vzorků obsahovala pouze vysoce rizikové typy HPV (85,8%). Deset žen (3,4%) z celkového množství bylo infikováno pouze nízko

rizikovými typy HPV, a u 32 pacientek (10,8%) byly diagnostikovány nízko i vysoko rizikové HPV typy. (Tab. č. 3)

Tab. č.4 Porovnání obou metod detekce HPV DNA.

		PCR	
		+	-
hc2	+	282	13
	-	40	300

	počet	%
shodné	582	91,6
rozdílné	53	8,4

Tabulka č.4 znázorňuje porovnání shodných a rozdílných výsledků detekce HPV DNA, získaných v obou testech na stejném materiálu. Obě metody se shodovaly v 91,6%, a lišily se v 8,4%.

U vzorků u nichž jsme zjistily rozdílně výsledky jsme dále určovaly konkrétní typ HPV metodou PCR s primery GP5+/6+ a RLB a metodou sekvenační. U 75% vzorků se nám podařilo typ určit.

Tab. č. 5 Přehled HPV DNA pozitivních výsledků ve věkových skupinách.

		PCR		hc2	
		počet	%	počet	%
věková skupina	celkový počet				
do 30 let	243	165	67,9	154	63,4
nad 30 let	408	157	38,5	133	32,6

Prevalence HPV v závislosti na věku se velmi lišila. U žen mladších 30ti let byla 67,9% a 63,4% metodou PCR a hc2, zatímco u žen starších 30ti let 38,5% a 32,6%. (Tab. č. 5)

4. DISKUSE

Výsledky naší studie ukazují, že metoda PCR je citlivější a umožňuje zachytit více typů HPV ve vzorku.

Prevalence HPV v populaci je závislá na věku a pohybuje se u žen bez cytologických abnormalit od 10 – 30%. V této studii byla prevalence vyšší – až 50%, protože se jednalo o ženy s původně suspektním cytologickým nálezem.

Mladší ženy jsou infikované častěji, ale lépe se infekce zbavují, aniž by u nich došlo ke vzniku závažných onemocnění. Jak se s věkem snižuje aktivita imunitního systému, roste i pravděpodobnost přetrvávání HPV infekce. Starší ženy jsou infikovány méně často (až 3%), ale jejich riziko vzniku onemocnění je vyšší. V naší studii byly mladší ženy 67,9% a starší v 38,5% HPV pozitivní pomocí PCR metody.

Typizace diskrepantních vzorků ukázala limitaci metody hc2, která ale neznamená omezení pro klinické využití. Metoda hc2 detekuje 13 nejčastějších HR typů, které mají prokázanou spojitost se vznikem KDC a má proto odpovídající klinickou citlivost.

Právě HPV je příkladem, kdy nejcitlivější metoda nemusí být pro klinickou praxi výhodnější.

U HPV je tedy zřejmé, že test na detekci DNA bude lépe vypovídat o riziku pro ženy starší 30ti let. Oba použité testy měly srovnatelnou citlivost i specifitu. Proto můžeme usuzovat, že oba by byly vhodné pro výběr rizikových žen s atypickým cytologickým nálezem .

HPV testace může usnadnit rozhodování o tom, zda má být pacientka léčena či nikoliv, je-li sledována pro hraniční nebo mírné cytologické změny, a tak pomoci v prevenci KDC.

5. ZÁVĚR

Ve vzorcích odebraných při vstupu do studie jsme detekovali přítomnost HPV DNA metodou PCR, která je obecně považována za nejcitlivější metodu a zároveň komerčně dostupnou hybridizační soupravou DNA test hc2 HPV, která je používána v rutinních virologických laboratořích k detekci HPV infekce v různých klinických materiálech. Oba testy jsme prováděli z jednoho vzorku. Těmito metodami jsme získali shodné výsledky v 91,6% případů.

Získané výsledky metodami DNA test hc2 HPV a PCR byly shodné ve více než 90% případů. Souprava DNA test hc2 HPV je proto vhodná pro vyšetření přítomnosti HPV DNA v cervikálních stěrech, neboť je srovnatelně citlivé jako PCR. Mimo to je z jiných studií známo, že má dokonce vyšší klinickou citlivost pro detekci žen s rizikem vzniku anebo zhoršení onemocnění, než PCR.

6. POUŽITÁ LITERATURA

1. **TACHEZY, Ruth.** Papillomaviry - věrní průvodci lidstva. *Živa*. 2004, roč. LII, č. 4, s. 146-149.
2. **VONKA, Vladimír.** Etiologie karcinomu děložního čípku - cesta k jejímu objasnění. *Moderní gynekologie a porodnictví : HPV a karcinom děložního čípku*. 2006, č. 4, s. 580-588.
3. **SLÁMA, Jiří.** Možnosti prevence a principy vakcinace proti HPV. *Farmakoterapie*. 2007, č. Review, s. 12-13.
4. **HAMŠÍKOVÁ, Eva, TACHEZY, Ruth.** Infekce HPV - epidemiologické a klinické souvislosti. *Farmakoterapie* . 2007, č. Review, s. 4-6.
5. **TACHEZY, Ruth.** Epidemiologie genitální papillomavirové infekce ve světě a ČR. *Moderní gynekologie a porodnictví : HPV a karcinom děložního čípku*. 2006, č. 4, s. 589-594.
6. **VONKA, Vladimír.** Lidské papillomaviry: jejich role při vzniku lidských nádorů a možnosti vývoje očkovacích látek. *Klinická mikrobiologie*. 1997, roč. 1, č. 7, s. 206-211.
7. **SALÁKOVÁ, Martina.** *Karcinom děložního čípku - HPV jako etiologický faktor a nádorové markery*. Praha, 1999. 96 s. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra molekulární biologie a virologie. Vedoucí diplomové práce Ruth Tachezy.
8. **HAMŠÍKOVÁ, Eva.** Imunologie papillomavirů. *Moderní gynekologie a porodnictví : HPV a karcinom děložního čípku*. 2006, č. 4, s. 595-599.
9. **TACHEZY, Ruth.** Molekulární diagnostika a molekulární epidemiologie papillomavirů. *Klinická mikrobiologie*. 1997, roč. 1, č. 7, s. 219-223.

10. VOJTÍŠKOVÁ, Marie. *Klinická molekulární genetika* . Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví , 1999 . 75 s. . ISBN 80-7013-292-2.

11. KRČMÁŘ, Martin, BŘICHÁČEK, Beda. *Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice* . Brno : IDV PZ , 1993 . 87 s. . (Knižnice Institutu pro další vzdělávání lékařů a farmaceutů) . ISBN 80-7013-143-8.

7. SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen-prezentující buňky
ASCUS/AGUS	atypické dlaždicovité buňky
BPV	bovinní papillomaviry
BSA	bovinní sérum albumin
CA	invazivní karcinom
CIN	prekancerózní stádium karcinomu děložního čípku
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
DB	Dot blot hybridizace
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
ELISA	enzymoimunoanalýza
EtBr	etidium bromid
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FISH	In situ hybridizace na filtru
HGL	léze vysokého stupně
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human papillomaviruses, lidské papillomaviry
HR	high risk, vysoko-ryzиковý typ
ISH	In situ hybridizace na sklíčku
KDČ	karcinom děložního čípku
LGL	léze nízkého stupně
LR	low risk, nízko-ryzиковý typ
mRNA	messenger RNA
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
ORF	otevřené čtecí rámce
p53	buněčný protein
PAIN	prekancerózní stádium karcinomu perianální oblasti

pb	páry bází
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIN	prekancerózní stádium karcinomu penisu
pRB	retinoblastomový protein
PV	papillomavirus
RLB	reverse line blot assay
RLU	relativní světelné jednotky
RNA	ribonukleová kyselina
RRP	rekurentní laryngeální papillomatóza
SB	Southern blot
SDS	sodium dodecylsulfate
STD	sexuálně přenosné onemocnění
UV	ultrafialové záření
VAIN	prekancerózní stádium karcinomu vagíny
VIN	prekancerózní stádium karcinomu vulvy
VLP	virus-like particles