



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Využití testování HPV ve screeningu análního
karcinomu – porovnání dvou molekulárně
biologických metod detekce HPV**

**Application of HPV testing in anal cancer
screening – comparison of two molecular
biological methods of HPV detection**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Ing. Jana Kvirencová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Šmahelová

Kladno 2020



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kvirencová** Jméno: **Jana** Osobní číslo: **474110**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Využití testování HPV ve screeningu análního karcinomu - porovnání dvou molekulárně biologických metod detekce HPV

Název bakalářské práce anglicky:

Application of HPV testing in anal cancer screening - comparison of two molecular biological methods of HPV detection

Pokyny pro vypracování:

Infekce lidskými papilomaviry (HPV) v oblasti análního kanálu je v obecné populaci velmi častá a klinicky asymptomatická. Je však prokázáno, že persistentní infekce vysoce rizikovými typy HPV především genotypy HPV 16 a 18, je etiologicky spojena se vznikem análních premaligních lezí (AIN) a análního karcinomu (AK). V poslední době incidence AK stoupá, a to zejména v určitých rizikových skupinách. Vzhledem k úspěšnosti preventivních programů nádorů hrdla děložního v gynekologii je zaváděn obdobný screeningový přístup založený na hodnocení cytologických změn vyvolaných infekcí HPV ve stěrech anální sliznice. Nedostatkem tohoto vyšetření je jeho nízká citlivost a specifita. Použití citlivých molekulárně biologických metod detekce HPV ve stěrech exfoliovaných buněk anální sliznice by mohlo vést ke včasnému zachytu rizikových jedinců, a tedy i ke zlepšení managementu a léčby AIN a AK. Cílem bakalářské práce je porovnat dvě molekulárně biologické metody detekce HPV ve stěrech buněk análního kanálu ve screeningové populaci mužů v České republice.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Clarke MA, Wentzensen N. , Strategies for screening and early detection of anal cancers: A narrative and systematic review and meta-analysis of cytology, HPV testing, and other biomarkers, Cancer Cytopathol, číslo Review. doi: 10.1002/cncy.22018. , 2018, 126(7) s.
- [2] Poljak M, Kocjan BJ, Oštrbenk A, Seme K. , Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. J Clin Virol. , číslo Suppl 1:S3-S13. doi: 10.1016/j.jcv.2015.10.02, 2016, 76 s.
- [3] Wang CJ, Sparano J, Palefsky JM, Human Immunodeficiency Virus/AIDS, Human Papillomavirus, and Anal Cancer. Surg Oncol Clin N Am, číslo Review. doi: 10.1016/j.soc.2016.07.010., 2017, 17-31 s., 26(1)

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Jana Šmahelová

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: **23.09.2019**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem: „Využití testování HPV ve screeningu análního karcinomu – porovnání dvou molekulárně biologických metod detekce HPV“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 27. 5. 2020

.....
Ing. Jana Kvirencová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala mé vedoucí bakalářské práce RNDr. Janě Šmahelové za cenné rady, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala a snahu předat mi co nejvíce zkušeností ze svého oboru. Dále děkuji RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D., za to, že mi umožnila práci ve svých laboratořích a za konstruktivní připomínky k práci, Blance Langové a Bc. Pavlíně Jarolímkové za názornou ukázkou a následnou pomoc při mém vlastním realizování experimentů, a RNDr. Kateřině Černé, Ph.D., RNDr. Janě Němcové, Ph.D., a MUDr. Ondreji Ondičovi, FIAC, za velmi přínosnou exkurzi do Bioptické laboratoře v Plzni. Všem jmenovaným děkuji za to, že byli ochotní do bakalářské práce poskytnout data z projektu „Validace analýzy metylace promotorů TSG spojených s HPV indukovanou karcinogenezí jako screeningového vyšetření análního karcinomu v rizikové populaci“, který byl finančně podpořený grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví AZV 17-317777A.

ABSTRAKT

Incidence análních premaligních lézí a karcinomu anu v poslední době stoupá, a to zejména mezi rizikovými skupinami populace. V současné době v České republice neexistuje žádný preventivní screeningový program, ale do budoucna se předpokládá jeho zavedení alespoň mezi rizikové skupiny populace. Teoretická část bakalářské práce seznamuje čtenáře s obecnými informacemi o lidských papilomavirech, ale i o způsobu jejich detekce a možné prevenci.

V experimentální části byly na výsledcích vzorků od 150 HIV pozitivních mužů majících sex s muži porovnány dvě metody, které by mohly být pro screening využity. Jako vhodnější se ukázala metoda Anyplex II HPV 28 před metodou GP5+/6+ RLB. Výhodou metody Anyplex II HPV 28 je možnost automatizace testu a fakt, že je vhodnější pro detekci vzorků s multiplicitními infekcemi HPV než metoda GP5+/6+ RLB. Obě tyto metody by však bylo vhodné používat pro triáž pacientů v uvažovaném screeningovém programu karcinomu anu.

Dále bylo zjištěno, že samotná detekce HPV není dostačující pro přesné určení diagnózy. Do uvažovaného screeningu bude tedy pravděpodobně nutné zařadit molekulárně biologickou detekci HPV spolu s cytologickým vyšetřením.

Bakalářská práce také potvrdila nutnost více propagovat primární prevenci, tedy očkování. V případě proočkovanosti sledované rizikové skupiny vakcínami dostupnými na českém trhu by se až 36 % sledovaných pacientů nyní nepotýkalo s infekcí vysoce rizikovými HPV typy.

Klíčová slova

lidské papilomaviry (HPV); anální karcinom; screening; HIV; muži mající sex s muži; GP5+/6+ RLB; Anyplex II HPV 28

ABSTRACT

Recently the incidence rate of anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma has been increasing mainly in the risk population. Even though no screening programme used for prevention is currently available in the Czech Republic, its implementation into the risk populations is expected in the future. The theoretical part of the bachelor thesis presents general information about *Human papillomaviruses* as well as methods of their detection and possibilities of prevention.

The results of the two perspective screening methods from 150 HIV positive men having sex with men were compared in the experimental part of the thesis. The Anyplex II HPV 28 method has proved to be more eligible than the GP5+/6+ RLB testing considering the possibility of automation and capability of detection of multiple HPV infections. However, both methods are adequate for triage in the screening programme for anal cancer.

Furthermore, it has been found out that HPV detection alone is not sufficient for an accurate diagnosis. Therefore, it will be necessary to include another molecular biological detection method of HPV together with a cytological examination of risk patients in the screening.

The bachelor thesis also has confirmed the necessity to promote primary prevention, especially vaccination. It has been concluded that up to 36 % of subjects from the monitored risk group of patients would not have suffered from high-risk HPV type infection if they have been vaccinated with prophylactic vaccines available in the Czech market.

Keywords

human papillomavirus (HPV); anal cancer; screening; HIV; men having sex with men; GP5+/6+ RLB; Anyplex II HPV 28

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce	11
3	Přehled současného stavu	12
3.1	Lidský papilomavirus	12
3.1.1	Základní informace.....	12
3.1.2	Taxonomie HPV	12
3.1.3	Životní cyklus viru	14
3.1.4	Klinické projevy infekce.....	15
3.1.4.1	Karcinom děložního čípku	16
3.1.4.2	Karcinom anu	17
3.1.4.2.1	Incidence a mortalita zhoubného karcinomu anu a análního kanálu v České republice.....	18
3.2	Prevence.....	21
3.2.1	Očkování.....	21
3.2.2	Screening	23
3.2.2.1	Cervikální screening	23
3.2.2.2	Anální screening.....	27
3.3	Metody testování HPV	29
3.3.1	Screeningové testy	29
3.3.1.1	Test založený na hybridizaci a amplifikaci signálu (Hybrid Capture-2).....	29
3.3.1.2	Polymerázová řetězová reakce s použitím primerů GP5+/6+	30
3.3.1.3	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	30

3.3.2	Triážové testy	31
3.3.2.1	Detekce mRNA.....	31
3.3.2.2	Methylace DNA.....	32
4	Metodika.....	33
4.1	Použité přístroje a materiál	33
4.1.1	Přístroje a zařízení	33
4.1.1.1	Bioptická laboratoř	33
4.1.1.2	NRL pro papilomaviry a polyomaviry.....	33
4.1.2	Pomůcky a chemikálie.....	34
4.1.2.1	Bioptická laboratoř	34
4.1.2.2	Dermatovenerologická klinika Nemocnice na Bulovce	34
4.1.2.3	NRL pro papilomaviry a polyomaviry.....	35
4.2	Obecné informace o analyzovaných vzorcích.....	36
4.3	Odběr vzorků	37
4.4	Analýza vzorků.....	38
4.4.1	Bioptická laboratoř v Plzni.....	38
4.4.1.1	Cytologické vyšetření	38
4.4.1.2	Molekulárně-genetické vyšetření.....	39
4.4.2	Národní referenční laboratoř pro papillomaviry a polyomaviry	40
4.5	Vyhodnocení dat.....	49
4.5.1	Rozdělení HPV typů dle rizikovosti	49
4.5.2	Výpočet procentuální shody výsledků metod RLB a Anyplex....	49
4.5.3	Výpočet ukazatelů správnosti testu	49
5	Výsledky	51

5.1	Charakterizace vyšetřovaného souboru pacientů.....	52
5.2	Výsledky cytologického vyšetření.....	55
5.3	Výsledky genotypizace	57
6	Diskuze	73
7	Závěr	78
8	Seznam použitých zkratk	79
9	Seznam použité literatury	80
10	Seznam použitých obrázků.....	85
11	Seznam použitých tabulek	87

1 ÚVOD

Infekce lidskými papilomaviry je v populaci běžná, díky mediální propagaci ji však většina lidí má spojenou pouze s karcinomem děložního čípku a málokdo tuší, že tyto viry jsou zodpovědné za mnohem více onemocnění. Smyslem této práce má být seznámení čtenáře se základními informacemi o lidských papilomavirech, o jejich životním cyklu, o tom, za jaká onemocnění jsou zodpovědná, jak je možné těmto onemocněním předcházet a jak lze tyto problémy včas odhalit.

Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi komplexní problematiku, je práce více zaměřena na prekancerózní léze a karcinom anu, který se čím dál častěji objevuje u rizikové populace, kterou mohou být například pacientky s již dříve diagnostikovaným karcinomem děložního čípku nebo HIV pozitivní osoby, a to zejména muži mající sex s muži. Právě skupině HIV pozitivních mužů majících sex s muži se věnuje studie „Validace analýzy metylace promotorů TSG spojených s HPV indukovanou karcinogenezí jako screeningového vyšetření análního karcinomu v rizikové populaci“, která poskytla cenná data i do této bakalářské práce. Jedním z cílů této studie je propagace prevence u rizikových osob a zavedení co nejlepšího screeningového postupu pro včasné odhalení abnormalit v análních stěrech. Bakalářská práce je zaměřena na porovnání dvou molekulárně biologických metod, které by mohly v budoucnu sloužit právě pro detekci HPV v rámci screeningu rizikové populace.

2 CÍLE PRÁCE

Vzhledem ke zvyšující se incidenci prekancerózních lézí a karcinomu anu, a to zejména u určitých skupin, bude nutné v budoucnu zavést nový screeningový program, jehož obdoba funguje například v gynekologii jako prevence proti karcinomu děložního čípku, aby došlo k záchytu rizikových jedinců a včasnému zahájení léčby. Vzhledem k nízké citlivosti cytologického vyšetření bude pravděpodobně nutné do screeningu zahrnout i molekulárně biologické metody detekce HPV. Cílem této bakalářské práce je porovnat metody GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28, které by mohly být součástí screeningového programu.

Metody budou porovnány jak z hlediska náročnosti přípravy vzorků, tak na základě citlivosti a specifity testu a schopnosti detekovat multiplicitní infekce HPV ve vzorku. Díky dostupným datům z probíhající studie „Validace analýzy metylace promotorů TSG spojených s HPV indukovanou karcinogenezí jako screeningového vyšetření análního karcinomu v rizikové populaci“ bude metody možné porovnat i na základě reálných výsledků.

Dále bude možné porovnat i dva způsoby odběru vzorků z análního kanálu, tedy slepý odběr vzorku a odběr vzorku při anoskopii, a to z hlediska molekulárně biologického i cytologického vyšetření.

Díky dostupným datům bude možné posoudit, jaká by byla prevalence HPV u studované rizikové populace, kdyby byla v rámci preventivních programů včas proočkována, a na základě toho zjistit, zda by bylo vhodné více propagovat primární prevenci, tedy vakcinaci.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Lidský papilomavirus

Papilomaviry zahrnují rozmanitou skupinu virů infikujících epitelu vyšších obratlovců. Existují papilomaviry bovinní, králičí, křeččí, kozí, ovčí, psí, ptačí atd. Jejich vývoj probíhá již miliony let. Lidský papilomavirus (HPV, *Human papillomavirus*) je virus infikující, jak vyplývá z názvu, pouze člověka [1-3].

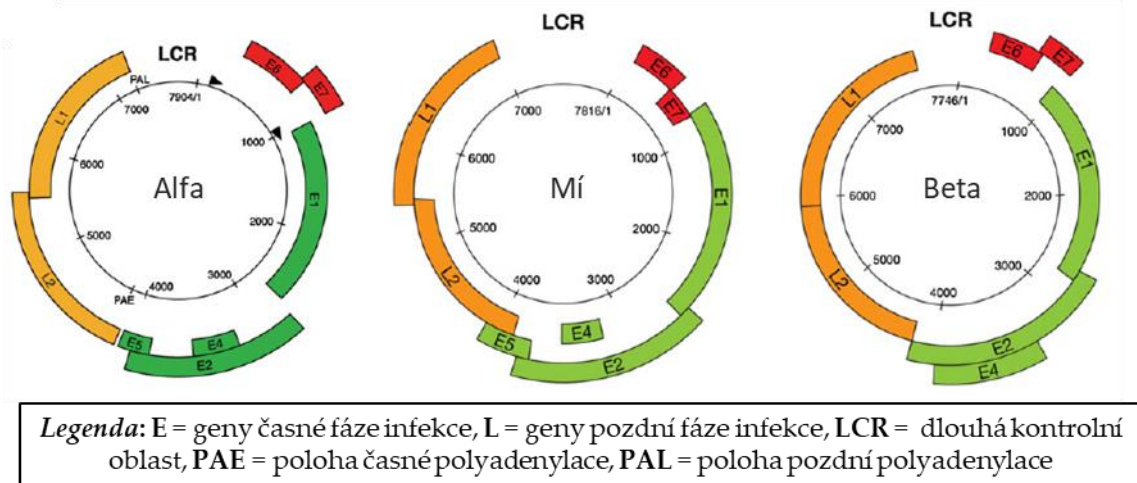
3.1.1 Základní informace

Lidský papilomavirus je malý neobalený virus s dvouřetězcovou DNA vyskytující se po celém světě. Patří do čeledi *Papillomaviridae*. Je přenášen přímým kontaktem, nejčastěji se jedná o sexuální styk. HPV patří mezi nejčastěji pohlavně přenosné infekce. Přenáší se jak vaginálním, tak análním i orálním sexem. K přenosu může méně často docházet i z infikované těhotné matky na potomka během porodu, případně pouhým kontaktem kůže a sekretu infikovaného jedince nebo kontaminovanými předměty. Papilomaviry infikují epitelu kůže nebo sliznice. Mezi obecné rizikové faktory pro infekci HPV patří brzký počátek sexuálního života, větší počet sexuálních partnerů, promiskuita a také imunitní stav jedince [3-10].

3.1.2 Taxonomie HPV

Papilomaviry se dělí dle různých kritérií na několik skupin. Nejznámější je dělení na nízké rizikové typy neboli neonkogenní typy, a na vysoce rizikové neboli onkogenní typy. Mezi nízké rizikové LR (z angl. low risk) HPV typy patří např. typy 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 a 81. Mezi vysoce rizikové HR (z angl. high risk) HPV typy se řadí nejznámější typy 16 a 18 a dále typy 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 59 [2-4, 8, 11-13].

Bylo identifikováno již více než 200 typů lidských papilomavirů, u nichž je známa jejich sekvence DNA. Právě na základě rozdílů v jejich sekvencích byly HPV rozděleny do pěti rodů – Alfa, Beta, Gama, Mí a Ný. Na Obrázku 1 je znázorněna typická organizace genomu Alfa, Mí a Beta HPV [1, 2].

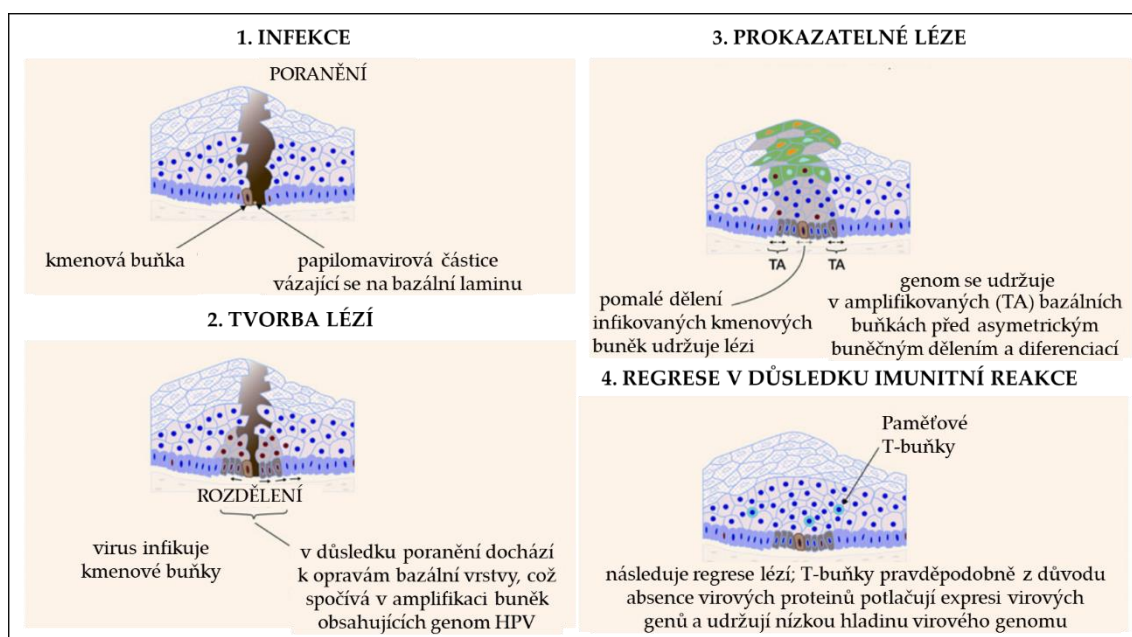


Obrázek 1 – Typická organizace genomu Alfa, Mí a Beta HPV [1]

Papilomaviry Alfa napadající sliznice zahrnují LR HPV typy, nejčastěji způsobující genitální bradavice, i HR HPV typy, které jsou zodpovědné za vznik anogenitálních neoplázií. Beta a Gama typy jsou nejčastěji detekovány na kůži a ve vlasových cibulkách a většinou nezpůsobují žádné onemocnění, pouze přežívají a množí se v buňkách hostitele. Bylo izolováno více než 40 typů Beta HPV a 50 typů Gama HPV a jejich počet neustále roste. Tyto typy se často spolu s nízkými rizikovými typy Alfa vyskytují na kůži lidí, kde jsou zodpovědné za většinu kožních bradavic na dlaních a chodidlech. Beta HPV jsou považovány za kofaktor vzniku karcinomu kůže. Ten se vyskytuje pouze ojediněle, a to zejména u lidí s oslabenou imunitou. Gama HPV mohou způsobovat benigní kožní léze. Některé Gama a Beta HPV typy byly detekovány i v ústní dutině. Bylo zjištěno, že i přes genetickou podobnost mezi některými typy HPV, může být jejich patologie velmi odlišná [1, 2, 6, 10, 14].

3.1.3 Životní cyklus viru

Papilomaviry infikují bazální vrstvy buněk epitelu, což je umožněno např. mikroporaněním. Lidské papilomaviry také často infikují tzv. transformační zónu, tedy místo, kde se setkávají dva epitely – dlaždicový a cylindrický, což je např. na děložním čípku nebo anu. Schematicky je postup infekce a rozšíření lézi naznačen na Obrázku 2 [1-3].



Obrázek 2 – Tvorba lézí v důsledku HPV infekce [1]

Vstup viru do buněk epitelu je umožněn po interakci virové kapsidy s primárním receptorem, heparin sulfátovými peptidoglykany, které rozpoznají obalový protein L1. Po konformační změně virového obalu jsou odhaleny místa pro interakci se sekundárním buněčným receptorem a virová kapsida se dostává do buňky. Po uvolnění virové DNA z kapsidy jsou nejprve exprimovány proteiny E1 a E2, které jsou nezbytné pro replikaci virového genomu. Dále dochází k expresi proteinů E6 a E7, které interagují s řadou buněčných proteinů a dokážou přimět bazální buňky k nekontrolované proliferaci. Protein E7 je schopen degradovat proteiny p105 a p107, které kontrolují vstup buněk do buněčného cyklu v bazální vrstvě, a protein p130, který je zodpovědný

za kontrolu vstupu do buněčného cyklu v horních epitelálních vrstvách. Protein E6 dokáže navodit degradaci nádorového supresorového proteinu p53 a tím inhibovat apoptózu. Proteiny E6 a E7, virové onkoproteiny, jsou důležité pro řízení buněčné proliferace u HR HPV typů a určují jejich nádorový potenciál. Rozdíly ve vlastnostech proteinů E6 a E7, jako je například schopnost inhibice apoptózy, schopnost inhibice interferonové zánětlivé odpovědi, aktivace signálních buněčných kaskád atd., jsou zodpovědné za odlišné klinické projevy infekcí LR a HR HPV typy. Ve vyšších vrstvách epitelu s postupující diferenciací keratinocytů dochází ke zvyšování hladiny proteinů důležitých pro amplifikaci virové DNA, zvyšuje se exprese proteinu E4 a obalových proteinů L1 a L2. Ve svrchních vrstvách epitelu dochází ke skládání virové kapsidy a sbalení virového genomu. Virové partikule jsou uvolňovány z povrchu epitelu s odlupujícími se terminálně diferencovanými keratinocyty [1, 2, 9, 14, 15].

3.1.4 Klinické projevy infekce

Již na začátku 80. let minulého století bylo zjištěno, že karcinogenní buňky děložního čípku obsahují DNA lidského papilomaviru. V roce 2008 obdržel německý vědec Harald zur Hausen Nobelovu cenu ve fyziologii a lékařství právě za zjištění, že lidské papilomaviry způsobují karcinom děložního čípku [4, 16].

Přestože je výskyt infekce lidskými papilomaviry poměrně častý, onemocnění naštěstí nejsou tak běžná. Bylo zjištěno, že většina těchto virů v populaci přetrvává jakožto komenzálové, tudíž nezpůsobují patologické změny. U zdravých jedinců dochází většinou k odstranění viru pomocí imunitního systému cca do dvou let od nákazy. U některých lidí, zejména těch s oslabeným imunitním systémem, kdy imunitní odpověď organismu na virovou infekci není dostatečná, může infekce přejít do persistentní formy. V těchto případech se zvyšuje riziko vzniku neoplastických změn a progresu lézí a vznik karcinomu [1-4, 8, 11, 17].

Nízce rizikové typy způsobují nejčastěji genitální bradavice. Mohou být ploché i vystouplé, samostatně se vyskytující nebo ve skupinách. Objevují se na vulvě, v nebo kolem vagíny, na análním otvoru, děložním čípku, penisu, šourku, ale i na stehnech či třísech. Za genitální bradavice je v 90 % případů zodpovědný HPV typ 6 nebo 11. Výjimečně může docházet k přenosu těchto typů HPV během porodu a poté se mohou na dýchacích cestách dětí ve věku od narození zhruba do šesti let objevit bradavice či papilomy. V tom případě se jedná o velmi vzácné, ale závažné chronické onemocnění, rekurentní laryngeální papilomatózu, které se projevuje opakujícím se růstem papilomů v hrtanu, případně i na hlasivkách nebo průdušnici. Papilomy nejprve způsobují chrapot, kašel a dušnost, ale postupem času mohou zapříčinit až úplnou obstrukci dýchacích cest, kdy jedinou léčbou je jejich opakované chirurgické odstranění [1, 3-5, 7, 8].

Vysoce rizikové neboli onkogenní typy HPV jsou nejčastěji spojovány s karcinomem děložního čípku. Dále způsobují i karcinom vulvy, vagíny, penisu, anu a část karcinomů hlavy a krku, zejména orofaryngu. Tato onemocnění jsou sice méně častá než karcinom děložního čípku, ale rozhodně ne méně závažná [1, 4, 7].

3.1.4.1 Karcinom děložního čípku

Karcinom děložního čípku je jedním z nejčastějších onkogenních onemocnění žen na světě. V České republice bylo v období 2007 - 2017 zaznamenáno 7 - 10 případů zhoubného karcinomu děložního čípku na 100 000 obyvatel ročně a 3 - 4 ženy na 100 000 obyvatel ročně tomuto onemocnění podlely. Dle studií, v 99 % sledovaných případů karcinomu děložního čípku byla potvrzena přítomnost HR HPV typů. U poloviny případů se jednalo přímo o typ 16, u 70 % případů byla potvrzena přítomnost typu 16 nebo 18 [3-5, 8, 11, 17-20].

3.1.4.2 Karcinom anu

Počet případů karcinomu anu je v porovnání s karcinomem děložního čípku ojedinělý, konkrétně v České republice byly v období deseti let mezi roky 2007 - 2017 zaznamenány přibližně 1 - 2 případy zhoubného karcinomu anu nebo análního kanálu na 100 000 obyvatel ročně a polovina z nich tomuto onemocnění podlela. Dle literatury je téměř 90 % případů karcinomu anu zapříčiněno infekcí HPV. I přes to, že karcinom anu není běžné onemocnění, existuje několik rizikových skupin, kde je pravděpodobnost vzniku nádoru vyšší. Rizikovým faktorem je např. přítomnost cervikální prekancerózy či karcinomu nebo vulvární prekancerózy v anamnéze. Je to proto, že za 90 % análních intraepiteliálních lézí a análních karcinomů jsou zodpovědné HPV typy 16 a 18, které se velmi často vyskytují i u karcinomu a prekancerózních lézí děložního čípku. Více ohroženy jsou skupiny lidí s vrozeným nebo získaným imunodeficitem [1, 3-5, 9, 17, 18, 20-29].

Velkou rizikovou skupinu představují HIV pozitivní pacienti, a to zejména MSM, tedy muži mající sex s muži (z angl. men having sex with men). V publikaci obsahující data ze 13 studií probíhajících v Severní Americe (10 v USA a 3 v Kanadě) v letech 1996 – 2007 byla na 148 449 případech sledována míra výskytu karcinomu anu. Z celkového počtu bylo 114 260 pacientů HIV negativních, z nich 90 % byli muži a 10 % ženy. HIV pozitivních pacientů ve studii bylo 34 189, z nichž 55 % patřilo do skupiny MSM, 19 % tvořili ostatní muži nepatřící do kategorie MSM a 26 % ženy. Výsledkem studie bylo zjištění, že incidence karcinomu anu přepočítaná na 100 000 osob za rok byla 131 případů u skupiny HIV pozitivních MSM, 46 případů u ostatních HIV pozitivních mužů nepatřících do skupiny MSM, 2 případy u mužů HIV negativních a 30 případů u HIV pozitivních žen. U sledovaných případů HIV negativních žen nebyly pozorovány žádné případy karcinomu anu. Výsledkem studie je tedy zjištění, že karcinom anu se vyskytuje mnohem častěji u HIV pozitivních jedinců oproti

jedincům neinfikovaným tímto virem. Největší výskyt karcinomu anu byl zaznamenán u HIV pozitivních MSM [29, 30].

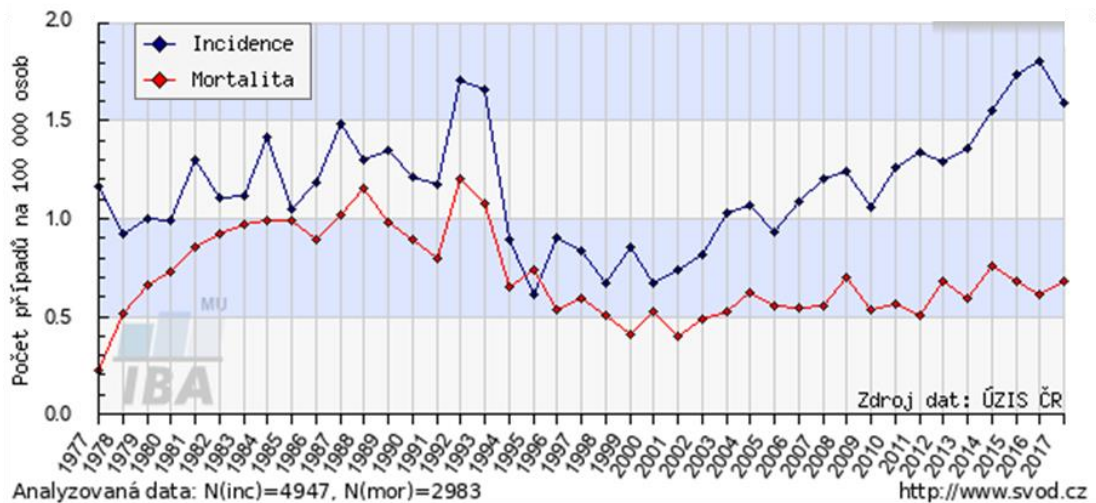
3.1.4.2.1 Incidence a mortalita zhoubného karcinomu anu a análního kanálu v České republice

Na základě validovaných epidemiologických dat Národního onkologického registru, který je spravován Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR, zpracovává webová stránka www.svod.cz za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR přehledné grafy o incidenci a mortalitě zhoubných karcinomů v České republice. Portál „Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice“ byl vytvořen autory z Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a Masarykova onkologického ústavu v Brně [20].

Na grafech na Obrázcích 3-5 jsou zobrazena data z let 1977 až 2017, která jsou zpracována pomocí analytického a prezentačního softwaru SVOD, systému pro vizualizaci onkologických dat. Nutno podotknout, že následující grafy se netýkají pouze karcinomu anu spojeného s infekcí HPV, ale naopak se jedná o všechny zhoubné karcinomy anu a análního kanálu. Jak již ale bylo zmíněno, celkově 90 % případů karcinomu anu je spojeno s přítomností HPV. Dále je nutné zmínit, že dané grafy odráží i další vlivy související se sledováním a registrací karcinomů, jako je například změna v diagnostice nebo v histologické klasifikaci karcinomů [20, 23].

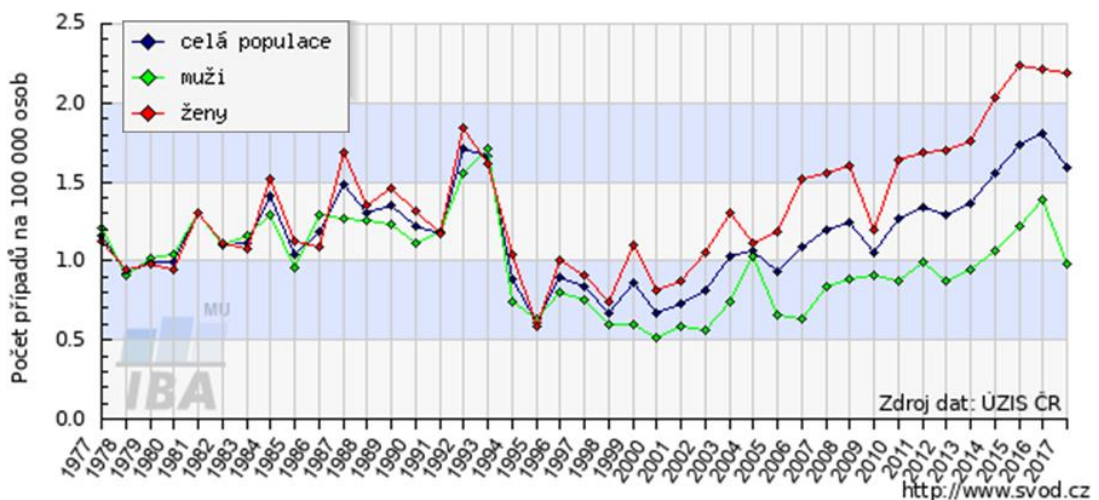
Jak je patrné z grafu na Obrázku 3, počet úmrtí je za posledních 12 sledovaných let víceméně konstantní, ale incidence karcinomů anu se v tomto období poměrně prudce zvyšuje. Z grafu také vyplývá, že mortalita se i přes narůstající počet karcinomů oproti dřívějším letům snižuje. Za posledních 10 sledovaných let byl tento typ karcinomu v České republice diagnostikován u 1 až 2 osob na

100 000 obyvatel ročně, z nichž polovina v tomto časovém úseku tomuto onemocnění podlela [20].



Obrázek 3 – Počet výskytů zhoubného karcinomu anu a análního otvoru na 100 000 osob v České republice – vývoj v čase [20]

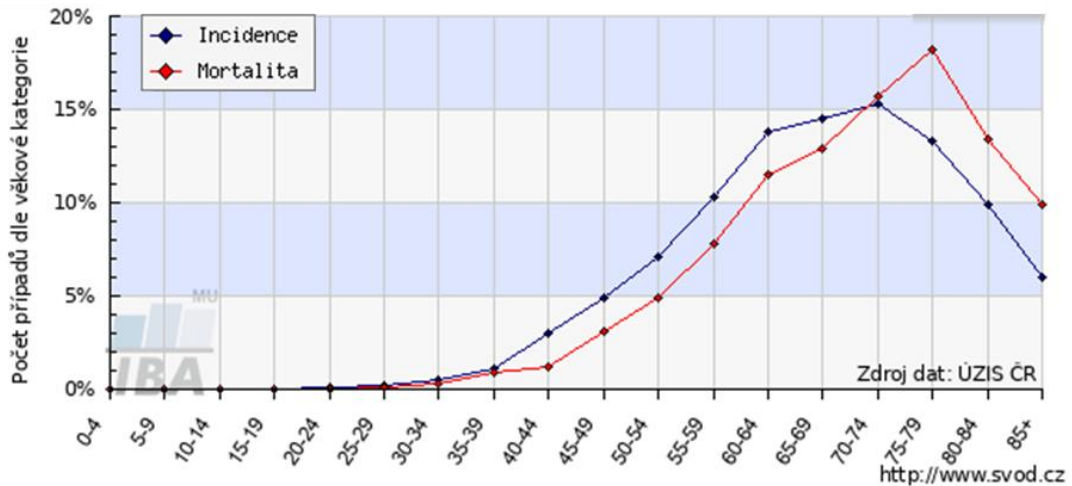
Z grafu na Obrázku 4 na první pohled vyplývá, že počet zhoubných karcinomů anu a análního kanálu je v posledních 20 sledovaných letech častější u žen než u mužů, i když rozdíl je malý - jeden případ na 100 000 osob ročně [20].



Obrázek 4 – Počet výskytů zhoubného karcinomu anu a análního otvoru na 100 000 osob v České republice – časový vývoj incidence u žen a mužů [20]

Z grafu na Obrázku 5 je patrné, že za sledovaných 40 let počet zhoubných karcinomů i mortalita stoupá s věkem. Nejčastěji se tento typ karcinomů vyskytuje u osob v rozmezí 70 – 74 let, kdy tato věková skupina tvoří 15 % všech nemocných. Více jak polovina lidí se zhoubným karcinomem anu nebo análního

kanálu je starší 70 let a více jak polovina úmrtí, následkem tohoto onemocnění, je u osob starších 75 let. Nicméně případy zhoubného karcinomu anu a análního kanálu byly evidovány i u osob ve věku 20 - 24 let a 0,5 - 1 % nemocných tvoří lidé ve věkové kategorii 30 – 34 let [20].



Obrázek 5 – Počet případů zhoubného karcinomu anu a análního otvoru dle věkové kategorie osob v České republice z období let 1977 – 2017 [20]

3.2 Prevence

Jak již bylo uvedeno, infekce HPV často probíhá asymptomaticky a většina infekcí HPV spontánně vymizí. Dosud neexistuje léčba, která by trvale odstranila virus z těla. Léčí se pouze klinické projevy, které byly infekcí vyvolány. K rozvoji prekanceróz a karcinomu dochází velmi dlouho, proto by měl být kladen důraz na prevenci, která může včas odhalit blížící se zdravotní problém [5, 8].

Nejrizikovějším faktorem nákazy HPV je nechráněný pohlavní styk. Bylo zjištěno, že používání kondomu může snížit přenos viru téměř o 60-70 %, ale nemůže jeho přenosu zabránit úplně. Případný monogamní vztah riziko nákazy značně eliminuje, ale nevylučuje [3-5, 24].

Preventivní opatření se dělí na dvě kategorie. Primární prevenci neboli očkování a sekundární prevenci neboli screening.

3.2.1 Očkování

V současné době jsou na českém trhu k dispozici tři vakcíny. Všechny tři jsou neživé a obsahují morfologicky a antigenně podobné kapsidy HPV, čímž je dosaženo určité ochrany i proti typům HPV, na které není očkování přímo cíleno. Konkrétně se jedná o L1 protein ve formě viru podobných částic (VLP, z angl. virus-like particles), který je vyrobený rekombinantní DNA technologií v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Silgard, Gardasil) nebo za použití bakulovirového expresního systému (Cervarix). Vakcíny vyvolají produkci vysokého ochranného titru anti-HPV IgA a IgG protilátek, které blokují vstup viru do hostitelských buněk. Všechny tři vakcíny jsou zaměřeny na dva nejrizikovější typy HPV, tedy 16 a 18. První vakcína „Gardasil“ dostala od amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv FDA (z angl. Food and Drug Administration) licenci v roce 2006 a postupem času byla dostupná ve více než

100 zemích světa. V České republice byla registrována 20. 9. 2006 nejprve pod názvem „Silgard“, později byla dostupná právě pod názvem „Gardasil“. V současné době je již nahrazována vakcínou Gardasil 9. Vakcína Gardasil je kvadrivalentní, zabraňuje infekci 4 typy HPV. Konkrétně se jedná o typy 16, 18, které nejčastěji způsobují karcinomy asociované s HPV a typy 6 a 11, které jsou nejčastěji zodpovědné za tvorbu genitálních bradavic. V roce 2007 byla FDA schválena další, tentokrát bivalentní vakcína „Cervarix“, která chrání proti HR HPV typům 16 a 18. V České republice byla registrována 20. 9. 2007. Zatím poslední vyvinutou vakcínou, která dostala v roce 2014 licenci v USA, je „Gardasil 9.“ V České republice byla registrována 10. 6. 2015. Tato vakcína je nonavalentní, chrání tedy proti 9 typům HPV. Základem jsou samozřejmě typy 16, 18, 6 a 11 a navíc 5 dalších HR HPV typů (31, 33, 45, 52 a 58), které, jak bylo zjištěno, jsou v České republice zodpovědné za 16 % karcinomů a 18 % prekancerózních lézí anogenitálního traktu mužů a žen. Zpočátku byly všechny tři vakcíny podávány ve třech dávkách, aby se vytvořila dostatečná hladina protilátek. V současnosti se očkuje pouze dvěma dávkami u osob, které zahájily očkování před 15. narozeninami a třemi dávkami u osob starších či těch s určitými imunitními omezeními. Vakcíny nejsou účinné při léčbě již existujících infekcí HPV, proto je prevence očkováním zaměřena na mladé osoby, které zatím nezahájily sexuální život. V České republice dle Zákona č. 48/1997 Sb. o veřejném zdravotním pojištění a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů podle §30 odstavce 2 b) patří mezi hrazené služby „očkování a úhrada léčivých přípravků obsahujících očkovací látky v provedení nejméně ekonomicky náročném proti lidskému papilomaviru, je-li očkování zahájeno od dovršení třináctého do dovršení čtrnáctého roku věku“ [4, 5, 7, 11, 17, 31-35].

3.2.2 Screening

3.2.2.1 Cervikální screening

Cílem cervikálního screeningu je včas zachytit ženy v riziku rozvoje karcinomu děložního čípku a s přednádorovými změnami a tím snížit jejich nemocnost a následné komplikace v důsledku tohoto onemocnění. Tento screening je prováděn v rámci preventivních vyšetření žen u gynekologa. K prevenci karcinomu děložního čípku se využívá cytologické vyšetření, testování HPV nebo kombinace obou těchto metod. V České republice dle Zákona č. 48/1997 Sb. o veřejném zdravotním pojištění a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů podle §29 odstavce 3 jsou „hrazenými službami preventivní prohlídky, které se provádějí v oboru gynekologie a porodnictví při ukončení povinné školní docházky a dále počínaje patnáctým rokem věku jedenkrát ročně.“ Dle Vyhlášky č. 70/2012 Sb. o preventivních prohlídkách podle §7 je obsahem gynekologické preventivní prohlídky mimo jiné „prohlídka kůže a palpační vyšetření mizních uzlin v oblasti pohlavních orgánů, vyšetření v zrcadlech a kolposkopické vyšetření a odběr materiálu z děložního čípku k cytologickému, případně bakteriologickému nebo virologickému vyšetření.“ Ženy ve věku 25-60 let, které 2 roky nebyly na preventivní gynekologické prohlídce, jsou informovány svou zdravotní pojišťovnou o možnosti využít tohoto hrazeného vyšetření [7, 11, 35-37].

Cytologické vyšetření spočívá v tom, že je pomocí světelného mikroskopu hodnocen obarvený preparát získaný stěrem nebo výtěrem z genitálního traktu ženy. Preparáty se barví standardním postupem dle Papanicolaoua nebo jeho modifikací. Barvení umožňuje hodnotit změny jaderného chromatinu buňky. Nevýhodou Papanicolaova testu (Pap test) je poměrně dlouhé barvení (20-30 minut) a velká spotřeba materiálu. Metoda také nemá dobrou reprodukovatelnost, zejména kvůli nerovnoměrnému rozložení buněk

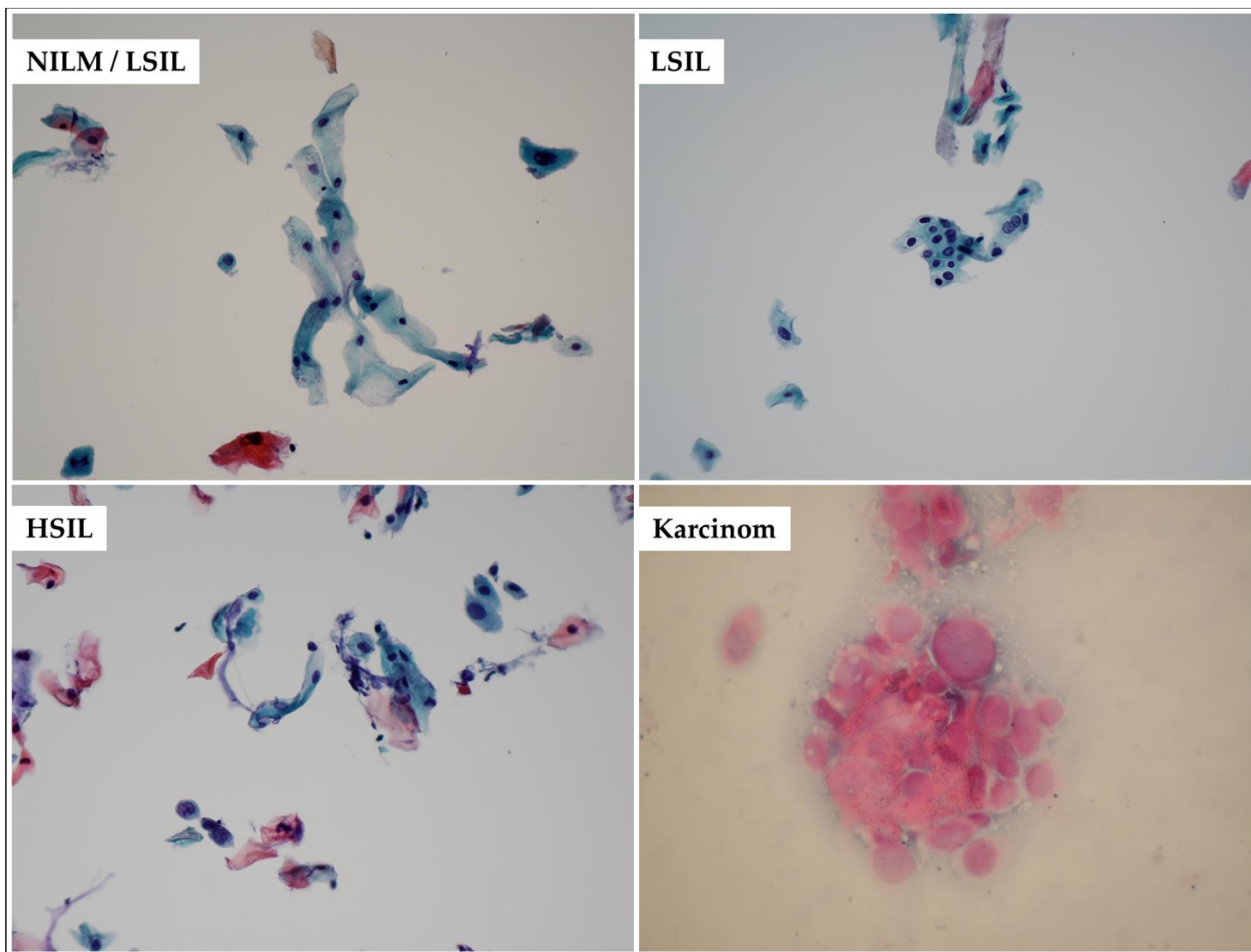
v důsledku nanášení vzorku rovnou na mikroskopické sklíčko. Výsledek testu může být ovlivněn i přítomností krve či hlenu nebo nedokonalou fixací. Nejčastějším problémem je nekvalitně provedený odběr vzorku [7, 11, 37].

Aby se eliminovaly nedostatky Pap testu, bylo vyvinuto hned několik dalších metod se zkrácenou dobou barvení nebo s úplně jinou technikou barvení. Tyto metody jsou buď rychlejší, méně nákladné nebo ekologičtější, než klasický Pap test a zároveň není ohrožena kvalita výsledků. Alternativní screeningovou metodou je cytologie do tekutého média (LBC, z angl. liquid based cytology). K odběru vzorku se v tomto případě používá kartáček, který je následně vložen do speciálního média. To je hlavní rozdíl oproti klasickému Pap testu, kdy se vzorek nanáší přímo na mikroskopické sklíčko. Velkou výhodou je, že do tekutiny jsou převedeny všechny odebrané buňky, oproti klasicky provedené cytologii, kde některé buňky mohou zůstat na kartáčku či jiném nástroji pro odběr vzorku. Výhodou je i možnost dalších vyšetření ze zbytku tekutiny, například je možné dodatečně provést detekci HPV nebo bakteriologické vyšetření. Nevýhodou LBC oproti Pap testu jsou vyšší náklady, ať už prvotní investice pro vybavení laboratoře, tak i náklady na provoz [11, 38].

Výsledek cytologie je hodnocen dle systému Bethesda 2001, který je souhrnně využíván pro rozlišení stupně lézí v anogenitálním traktu. Prvním stupněm tohoto systému je typická dlaždicová buňka bez intraepiteliálních změn a malignity **NILM** (z angl. negative for intraepithelial lesions or malignity). Jedná se o normální nález. Dalším stupněm, již abnormálním, jsou atypické dlaždicové buňky nejasného významu **ACS-US** (z angl. atypical squamous cells of undetermined significance), které jsou charakterizované zvětšením jader buněk nebo nepravidelnostmi chromatinu např. v podobě mírné hyperchromázie. Následuje nízký stupeň skvamózní intraepiteliální léze **LSIL** (z angl. low grade intraepithelial lesions). V tomto případě je patrná abnormální struktura

chromatinu, jádro buňky je zvětšeno a je hyperchromní, ovšem méně než u vysokého stupně skvamózní intraepiteliální neoplázie, cytoplazma je cyanofilní nebo eosinofilní. Nález atypické skvamózní buňky, které nevylučují přítomnost HSIL, **ACS-H** (z angl. atypical squamous cells – cannot exclude HSIL) je velmi ojedinělý. Vyskytuje se, když jsou přítomny dyskaryotické buňky nebo hyperchromní natěsnané skupiny buněk. Vysoký stupeň skvamózní intraepiteliální neoplázie **HSIL** (z angl. high grade intraepithelial lesions) se vyznačuje více granulárním a nepravidelně distribuovaným chromatinem. Jaderná membrána je nepravidelná, místy ztluštělá nebo obsahuje různé záhyby. Jádra jsou nejčastěji hyperchromní, ale není to nutnou podmínkou. Cytoplazma je spíše menší než v normálních intermediárních buňkách, někdy skoro vymizí. Posledním stupněm systému Bethesda 2001 je dlaždicobuněčný karcinom [9, 39, 40].

Na Obrázku 6 jsou zobrazeny fotografie cytologických nálezů ze stěru z análního kanálu a z děložního čípku, které do bakalářské práce poskytla Bioptická laboratoř. Na prvním snímku označeném NILM / LSIL je anální stěr obsahující skupinu normálních vyzrálých dlaždicových buněk a 2 lehce dysplastické buňky. Jedna je umístěna vpravo nahoře, druhá, na které je patrná i keratinizace cytoplazmy, je umístěna centrálně v dolní části fotografie. Na druhém snímku označeném LSIL je na análním stěru patrná skupina objemnějších buněk se zvětšenými tmavými jádry a dvoujaderná buňka. Na třetím snímku análního stěru hodnoceného jako HSIL jsou viditelné skupinky malých dysplastických buněk s tmavými jádry. Na poslední fotografii je částečně autolyzovaná skupina buněk s výraznou jadernou pleiomorfii. Jedná se o karcinom děložního čípku, karcinom anu by jakožto cytologický nález vypadal obdobně.



Obrázek 6 – Cytologické nálezy NILM, LSIL a HSIL získané ze stěru z análního kanálu a karcinom děložního čípku – zdroj: Bioptická laboratoř

Cervikální intraepiteliální neoplázie CIN (z angl. cervical intraepithelial neoplasia) se na základě histologického vyšetření dříve dělila do 3 kategorií. Kategorie CIN1 představuje lehkou dysplasií s dysplastickými buňkami ve spodní třetině epitelu, CIN2 středně těžkou dysplasií postihující dvě třetiny výšky epitelu a CIN3 těžkou dysplasií. U poslední kategorie již dochází k aneuploidii jader a atypickým mitózám. CIN2 a CIN3 může postupem času progredovat v karcinom. Dnes je závazná terminologie Bethesda 2001, kde CIN1 odpovídá LSIL a CIN 2 a 3 odpovídá HSIL [4, 15].

Kromě cytologických vyšetření je možné v rámci screeningu provádět i molekulárně biologické testy, např. detekci DNA lidských papilomavirů. Tyto testy jsou velmi citlivé, objektivní, mají velkou reprodukovatelnost a mohou být automatizované. Na rozdíl od cytologie je není nutné provádět tak často, protože k rozvoji karcinomu dochází až s několikaletým odstupem po infekci HPV. Podrobněji jsou jednotlivé možnosti detekce HPV ve vzorcích popsány v kapitole 3.3 Metody testování DNA [11, 37, 41].

3.2.2.2 Anální screening

V České republice doposud není zaveden anální screening. Z důvodu nízké incidence karcinomu anu v běžné populaci by byl pravděpodobně zaměřen pouze na osoby se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu anu, tedy zejména na HIV pozitivní osoby, pacienty s imunosupresivním onemocněním a skupinu MSM. Vzhledem k podobnosti mezi karcinomem anu a cervixu by byl anální screening velmi podobný tomu cervikálnímu [20, 23].

Osoby, u nichž by se prokázala abnormální cytologie, by mohly být podrobeny dalším testům a vyšetřením. Jedním z nich je například anoskopie, která podobně jako kolposkopie, slouží k lokalizaci podezřelých lézí, u kterých je následně v rámci tohoto vyšetření provedena probatorní biopsie. Lokalizace

podezřelých lézí je usnadněna použitím různých roztoků, například kyseliny octové nebo Lugolova roztoku, které jsou aplikovány na vyšetřované místo a odhalí abnormality. Biopsie podezřelé tkáně je zlatým standardem a potvrzením diagnózy. Velkou nevýhodou anoskopického vyšetření je fakt, že pacienti toto vyšetření hodnotí jako velmi nepříjemné, což by mohlo být překážkou v zavedení této metody do screeningu [7, 22, 23].

Další možnou metodou využívanou v případě podezření přítomnosti karcinomu anu je DARE (z angl. digital anal rectal examination), tedy digitální análně-rektální vyšetření. Jedná se o palpační vyšetření, které spoléhá na to, že většina invazivních karcinomů anu je hmatatelná prstem. Karcinom se projevuje například zatvrdnutím nebo zdrsněním kůže. Toto vyšetření je velmi levné a nevyžaduje žádné přístroje. Jeho velkou nevýhodou je ovšem fakt, že tímto vyšetřením lze odhalit karcinom v časném stadiu, ale ne prekancerózní léze [22, 42].

Dříve se anální intraepiteliální neoplázie AIN (z angl. anal intraepithelial neoplasia) dělily na základě histopatologického vyšetření do 3 kategorií. V současné době se od této terminologie upouští a upřednostňuje se systém Bethesda 2001, kdy AIN1 odpovídá cytologickému výsledku LSIL a AIN2 a AIN3 odpovídají HSIL. Souhrnný systém pro anogenitální trakt, Bethesda 2001, je podrobněji popsán v kapitole 3.2.2.1 Cervikální screening [12, 22, 25].

3.3 Metody testování HPV

Lidské papilomaviry se nedaří jednoduše kultivovat na buňkách. Klasické přímé virologické diagnostické metody, jako je elektronová mikroskopie a imunohistochemie, postrádají citlivost a specifitu pro detekci HPV. Sérologické testy pro detekci anti-HPV protilátek po přirozené infekci nejsou vhodné k diagnostice. Navíc je velkým problémem existence hned několika různých typů HPV, které je často potřeba rozlišit. V důsledku toho jsou více méně všechny moderní diagnostické testy založené na detekci nukleových kyselin papilomavirů. Vzhledem k velkému množství dostupných diagnostických testů je následující kapitola zaměřena pouze na vybrané metody, zejména ty, které jsou následně porovnávány v experimentální části práce [4, 10, 23, 43].

3.3.1 Screeningové testy

Existuje několik testů určených pro detekci HPV DNA, které by mohly být použity pro uvažovaný screening karcinomu anu. Metody, které jsou schválené pro využívání ve screeningu karcinomu děložního čípku musí splňovat několik kritérií. Musí být minimálně tak klinicky citlivé jako test Hybrid Capture-2 nebo GP5+/6+ PCR-EIA, měly by být reprodukovatelné a specifické pro rozlišení abnormálních cytologických nálezů. Validace nových metod probíhá za přesně stanovených podmínek. Pokud by byl zahájen screening karcinomu anu, je zřejmé, že by musel splňovat podobná kritéria těm výše zmíněným [44, 45].

3.3.1.1 Test založený na hybridizaci a amplifikaci signálu (Hybrid Capture-2)

V této metodě jsou exfoliované buňky ošetřeny denaturačním činidlem a vzorky jsou dále hybridizovány se směsí dlouhých typově specifických RNA sond. V případě vytvoření hybridu, RNA sonda – virová DNA, dojde k jeho navázání na povrch mikrodestičky potažené monoklonálními protilátkami

specifickými právě pro vzniklé hybridy, které jsou detekovány protilátkami s navázanou alkalickou fosfatázou. Po přidání substrátu dochází k reakci, při které se uvolňuje světlo, jež je měřeno. Limitací tohoto testu je fakt, že RNA sondy mohou nespecificky reagovat s dalšími typy HPV, na které není test přímo zaměřen. Výsledky tohoto testu tedy mohou být ovlivněny zkříženou reaktivitou. Test také nemá vnitřní kontrolu buněčnosti vzorku a výsledky mohou být i falešně negativní. I přesto zůstává zlatým standardem pro ověřování klinické validity dalších molekulárně biologických metod [10, 38].

3.3.1.2 Polymerázová řetězová reakce s použitím primerů GP5+/6+

Polymerázovou řetězovou reakci lze díky specifickým HPV primerům využívat pro přímou detekci HPV. Navržených systémů primerů existuje několik, často využívaným systémem je směs GP5+/6+ (5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3'/5'-AA AAATAAACTGTAAATCATATTC-3') cílená do oblasti genu L1 a poskytující amplikony o délce 150 bp. Aby mohla být provedena kromě detekce HPV i genotypizace, následuje enzymová imunoanalýza či reverzní hybridizace (RLB). Vizualizace produktů multiplexové PCR je možná díky primerům značeným např. biotinem [10, 15, 24, 43, 46-50].

3.3.1.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Pro detekci DNA lidských papilomavirů jsou komerčně dostupné i metody založené na PCR v reálném čase. Jednou z nich je například komerční Anyplex II HPV28, což je metoda využívající semikvantitativní PCR pro detekování a rozlišení 28 různých HPV typů. Jednotlivé typy HPV se v tomto testu rozlišují na základě PCR v reálném čase, protože jednotlivé použité primery jsou značeny každý jinou fluorescenční sondou. Podle provedených klinických studií je Anyplex velmi citlivou a specifickou metodou, která navíc vyžaduje méně času a méně

odborných znalostí než většina ostatních testů určených pro genotypizaci HPV, což je umožněno zejména automatizací testu [51, 52].

3.3.2 Triážové testy

V rámci screeningu jsou nezbytné triážové testy, které umožní vytypovat osoby se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu, protože roztrídí pacienty s pozitivním výsledkem primárního testu, většinou tedy cytologického vyšetření. Triážovým testem může být test založený na detekci virové DNA či RNA, metylaci virové DNA či promotorů nádorových supresorových genů, imunohistochemické detekci exprese proteinu p16 aj. V případě použití HPV testu jako primárního vyšetření, může být triážovým testem i cytologické vyšetření. Jak bylo zmíněno, HPV se v populaci vyskytuje velmi často, ale zřídka jeho přítomnost vede ke vzniku lézí či karcinomu. Testy založené na detekci HPV jsou tedy málo specifické pro rozlišení možného rizika, ale jsou velmi citlivé. V současné době je snaha právě z důvodu velké citlivosti těchto testů je zařadit jakožto primární a následně využívat specifičtější cytologii jako triážový test [12, 15, 38].

3.3.2.1 Detekce mRNA

Testy založené na detekci mRNA se konkrétně zaměřují na detekci transkriptů virových onkogenů E6 a E7. Detekce virové mRNA může být provedena reverzní transkripcí s následnou PCR nebo speciálně vyvinutou metodou izotermální amplifikace RNA, tzv. NASBA (z angl. nucleic acid sequence-based amplification). Existuje několik komerčních kitů využívajících tento princip, které jsou zaměřené na vybrané HR HPV typy. Jedním z takových testů je např. APTIMA HPV Assay, který umožňuje detekci transkriptů 14 typů HPV. Americkou FDA bylo schváleno použití tohoto testu i pro screeningové účely [10, 23, 38, 45].

3.3.2.2 Methylace DNA

DNA methylace spočívá v navázání methylové skupiny k cytosinu v CpG oblastech. Dochází k ní například při obraně buňky, umlčování cizí nukleové kyseliny nebo při vzniku karcinomů, kdy promotorové oblasti mnoha nádorových supresorových genů jsou specificky methylovány v karcinomech, ale v normálních tkáních nikoliv. To vede k potlačení exprese nádorových supresorových genů. Tento proces byl detekován ve většině typů malignit, ale methylované geny jsou specifické pro každý karcinom dle etiologie, takže ho lze specifikovat. Bylo zjištěno, že hladina vybraných methylovaných genů stoupá v čase u žen s přetrvávající infekcí HPV typem 16 a závažností nálezu u žen s neopláziemi a karcinomem děložního čípku. U pacientů s análním karcinomem nebo pokročilými análními lézemi HSIL byla detekována vyšší hladina methylace genů DAPK1, IGSF4 (TSLC1), MLH1, HIC1, RARB, p14, TP73, MGMT, RASSF1, APC, CDKN2A (p16) oproti zdravým jedincům. K analýze methylace DNA se využívá např. PCR v reálném čase a tato metoda může být využita pro triáž v rámci screeningu, ale je také důležitá pro získání znalostí o methylaci DNA při výskytu análních lézí, aby mohly být vyvinuty nové léčebné či preventivní postupy karcinomu anu [12, 23, 25, 26, 53].

4 METODIKA

4.1 Použité přístroje a materiál

4.1.1 Přístroje a zařízení

4.1.1.1 Bioptická laboratoř

- odstředivka (Hettich, Německo)
- termocykler CFX96 Real-Time PCR System (BIO RAD, Spojené státy americké)
- třepací termoblok (Biosan, Lotyšsko)
- ThinPrep (Hologic, Spojené státy americké)
 - Imager
 - Barvicí automat (Tissue-Tek Film)
 - Imaging System
 - Automatický mikroskop

4.1.1.2 NRL pro papilomaviry a polyomaviry

- analytické váhy (AND, Japonsko)
- automatické pipety 200 μ l (Gilson, Spojené státy americké)
- hybridizační pírka ProBlot (Labnet, Česká republika)
- inkubátor (Major Science, Spojené státy americké)
- mikrovlnná trouba (Professor, Čína)
- odstředivka (Hettich, Německo)
- stopky (Roth, Německo)
- termocykler (BIOER, Čína)
- termocykler (BIO RAD, Spojené státy americké)
- transiluminátor (UVP, Spojené státy americké)
- třepací bloček (Biosan, Lotyšsko)

- třepačka (P-LAB, Česká republika)
- vodní lázeň (Memmert, Německo)
- vortex (IKA, Čína)
- vyvolávací (Kodak, Spojené státy americké)
- zařízení na výrobu destilované vody (Goldman water, Česká republika)
- zdroj napětí pro elektroforézu (Major Science, Spojené státy americké)

4.1.2 Pomůcky a chemikálie

4.1.2.1 Biooptická laboratoř

- ethanol (Merck, Německo)
- QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Spojené státy americké)
 - kolonky QIAamp MinElute Columns
 - 2 ml mikrozkušavky
 - pufrý ATL, AW1, AW2
- plato 96 jamek pro PCR (Bio-Rad, Spojené státy americké)
- proteináza K (Sigma Aldrich, Německo)
- souprava Anyplex II HPV28 (Seegene, Jižní Korea)
 - primery: HPV28 A TOM, HPV28 B TOM
 - Anyplex PCR master mix
 - pozitivní kontroly 1, 2, 3
 - RNáza-free voda
- stripý 8 zkumavek (Bio-Rad, Spojené státy americké)
- ThinPrep filtry (Hologic, Spojené státy americké)
- ThinPrep mikroskopická sklíčka (Hologic, Spojené státy americké)

4.1.2.2 Dermatovenerologická klinika Nemocnice na Bulovce

- odběrový kartáček Anex Brush (Rovers, Nizozemsko)
- transportní médium PreservCyt Solution (Hologic, Spojené státy americké)

4.1.2.3 NRL pro papilomaviry a polyomaviry

- elektroforetická vana a hřeben (Thermo Scientific, Spojené státy americké)
- kádinky 250 ml (Simax, Česká republika)
- nástavec na skleněnou pipetu (Hirschmann Laborgeräte, Německo)
- odměrné válce 50, 100 a 500 ml (Simax, Česká republika)
- plastové mikrozkušavky a zkumavky (TRP, Švýcarsko)
- skleněné pipety 10 a 25 ml (Simax, Česká republika)
- zásobní láhve 250 a 500 ml (Simax, Česká republika)

- agarosa (Lonza, Švýcarsko)
- avidin (Invitrogen, Spojené státy americké)
- dihydrogenfosforečnan sodný (Roth, Německo)
- DNA away (Roth, Německo)
- dodecylsírán sodný (Roth, Německo)
- ECL Prime Western Blotting System (Merck, Německo)
- EDAC (Sigma Aldrich, Německo)
- EDTA (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- ethanol (Merck, Německo)
- GelRed® (Biotium, Spojené státy americké)
- hydrogenuhličitan sodný (Sigma Aldrich, Německo)
- hydroxid sodný pecky p. a. (Penta, Česká republika)
- chlorid sodný (Penta, Česká republika)
- isopropanol (Penta, Česká republika)
- MspI (BioLabs, Velká Británie)
- PureGene kit (QIAGEN, Spojené státy americké)
- TBE (Tris-borát-EDTA) pufr (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

4.2 Obecné informace o analyzovaných vzorcích

V bakalářské práci je pracováno s výsledky analýzy vzorků, které byly odebrány na Dermatovenerologické klinice Nemocnice na Bulovce v letech 2016 – 2017 se záměrem provedení studie na téma „Validace analýzy metylace promotorů TSG spojených s HPV indukovanou karcinogenezí jako screeningového vyšetření análního karcinomu v rizikové populaci“. Na studii se kromě zmiňované Dermatovenerologické kliniky na Bulovce podílí Národní referenční laboratoř pro papillomaviry a polyomaviry, Šiklův ústav patologie v plzeňské Fakultní nemocnici a Bioptická laboratoř v Plzni.

Všechny vzorky byly odebrány od HIV pozitivních mužů, kteří mají sexuální styk s muži (skupina MSM). Při vstupu do studie byli pacienti klinicky vyšetřeni, vyplnili dotazník a byl jim odebrán stěr z oblasti análního kanálu pro cytologické vyšetření. V případě souhlasu pacienti podstoupili i anoskopii. Podmínkou přijetí do studie je mimo jiné to, že pacienti nejsou očkováni vakcínami proti HPV infekcím.

4.3 Odběr vzorků

Jak již bylo zmíněno, vzorky byly odebírány na Dermatovenerologické klinice Nemocnice na Bulovce. V první fázi byl proveden slepý stěr z oblasti análního kanálu pomocí odběrového kartáčku na Obrázku 7.



Obrázek 7 – Odběrový kartáček Anex Brush

Štěteček byl následně opláchnut v tekutém LBC médiu PreservCyt a vyhozen. Vzorek v zavřené lahvičce s transportním fixačním médiem může být skladován při pokojové teplotě až 6 týdnů.

U pacientů, kteří s tímto vyšetřením souhlasili, byla následně provedena i anoskopie a byl znovu stejným způsobem udělán stěr, tentokrát však z vytypovaných podezřelých míst análního kanálu.

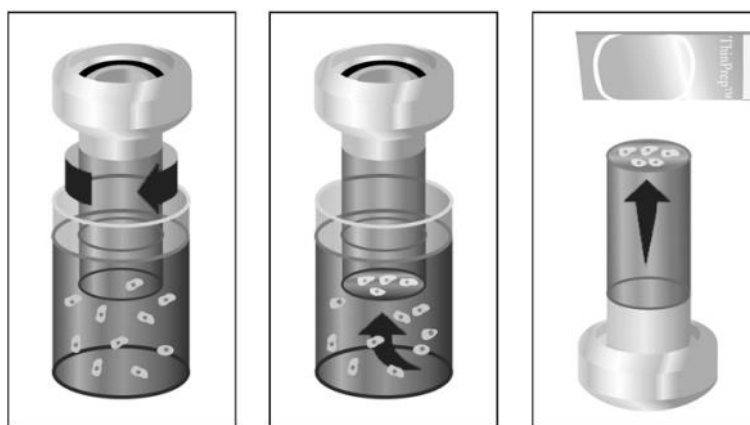
4.4 Analýza vzorků

Ze získaných stěrů byla prováděna detekce a genotypizace HPV DNA, a to současně v Národní referenční laboratoři (NRL) pro papillomaviry a polyomaviry v Praze a v Bioptické laboratoři v Plzni, kde bylo provedeno i cytologické vyšetření. Všechna tato vyšetření probíhala z fixačního roztoku, do kterého byl vzorek umístěn v Dermatovenerologické klinice po odběru. Vzorek po odběru putoval do Bioptické laboratoře, kde z něho byly odebrány 2 ml, které byly odeslány na vyšetření do NRL pro papilomaviry a polyomaviry. Další 2 ml byly odebrány na molekulárně-genetické vyšetření v Bioptické laboratoři. Zbytek tekutiny byl použit pro cytologické vyšetření.

4.4.1 Bioptická laboratoř v Plzni

4.4.1.1 Cytologické vyšetření

Každé lahvičce, tedy každému vzorku, byl přidělen unikátní QR kód. Lahvička byla vložena do prvního stroje ThinPrep Imager, kde docházelo k přenosu buněk na mikroskopické sklíčko označené stejným QR kódem. Nejprve v lahvičce došlo k jemné disperzi, která oddělila případný hlen nebo krev a promíchala buňky, které byly následně shromážděny na filtr. Během toho byla neustále monitorována rychlost toku skrz filtr, aby buněk na sklíčku nebylo příliš málo nebo příliš mnoho. Poté byl filtr otočen a tlačěn proti mikroskopickému sklíčku, kam byl obtisknut. Díky tomu byly buňky na sklíčku pouze v jedné vrstvě v ohraničené kruhové oblasti. Tento proces je schematicky zobrazen na Obrázku 8.



Obrázek 8 – Proces přenosu buněk z fixačního roztoku na mikroskopické sklíčko [54]

Sklíčka byla následně barvena modifikovanou Pap metodou v barvicím automatu a poté byla umístěna do dalšího z přístrojů od firmy ThinPrep tzv. Imaging Systemu, kde docházelo k označení 23 podezřelých bodů u každého vzorku. Pod automatickým mikroskopem laborant nejprve prohlédne všech 23 bodů, aby odsouhlasil, zda se skutečně jedná o podezřelé buňky, či nikoliv. Následně zkontroluje celé sklíčko a označí případné další podezřelé buňky. V případě nálezů podezřelých buněk byla sklíčka kontrolována lékařem, který dle systému Bethesda 2001 definoval stupeň lézí.

4.4.1.2 Molekulárně-genetické vyšetření

Izolace DNA byla v této laboratoři prováděna pomocí komerčního kitu QIAamp DNA Micro Kit. V prvním kroku byla silně protřepána mikrozkušavka obsahující vzorek ve fixačním médiu a zcentrifugována (7 000 g, 10 min). Po stočení bylo odebráno 1 900 μ l supernatantu. Dále bylo pracováno se zbylými 100 μ l peletu, ke kterému bylo přidáno 10 μ l proteinázy K a 100 μ l pufru AL. Směs se nechala inkubovat v třepacím termobloku 10 min při 56 °C, poté byla krátce stočena, přepipetována do kolonky s membránou a znovu zcentrifugována (6 000 g, 1 min). Kolonka byla umístěna do nové zkumavky, do které bylo napipetováno 500 μ l pufru AW1. Zkumavka byla zcentrifugována (6 000 g, 1 min), kolonka umístěna do nové zkumavky a do té bylo napipetováno 500 μ l pufru AW2. Zkumavka byla opět zcentrifugována (6 000 g, 1 min), kolonka

umístěna do nové zkumavky a znovu proběhla centrifugace (20 000 g, 3 min). Kolonka s membránou byla umístěna do čisté zkumavky, do středu membrány bylo napipetováno 60 μ l vody, zkumavka se nechala inkubovat 5 min při pokojové teplotě a následně byla stočena (20 000 g, 1 min). Pokud nebylo se vzorky pracováno ihned, byly uskladněny v mrazničce.

Ke genotypizaci HPV byla v této laboratoři využita metoda Anyplex II HPV 28 Detection, která umožňuje současnou amplifikaci i detekci 28 typů HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 82). Tyto typy jsou rozděleny do směsí A a B, každý vzorek je tedy analyzován ve dvou mikrozkušnicích na stripu, do kterých je napipetováno 5 μ l primeru HPV28 TOM A nebo B, 5 μ l Anyplex master mixu, 5 μ l vody prosté RNáz a 5 μ l DNA příslušného vzorku. Stejným způsobem jsou připraveny pozitivní kontroly, kde místo DNA vzorku se pipetuje 5 μ l příslušné kontroly 1, 2 a 3. Celkem je tedy připraveno 6 pozitivních kontrol, 3 s primerem A a 3 s primerem B. Tyto kontroly obsahují všechny detekované typy HPV. Průběh PCR reakce je následující: 50 °C / 4 min, 95 °C / 15 min, 50x (95 °C / 30 s, 60 °C / 1 min, 72 °C / 30 s), 55 °C / 30 s, křivky tání 55 °C – 85 °C. Detekce je provedena na základě různých křivek tání jednotlivých typů HPV.

4.4.2 Národní referenční laboratoř pro papillomaviry a polyomaviry

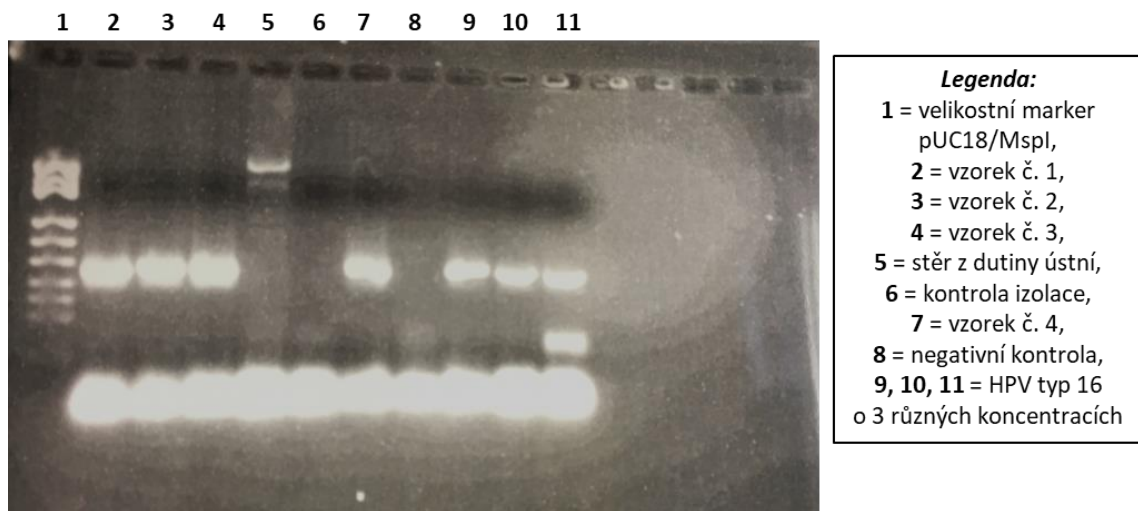
Izolace DNA byla v této laboratoři prováděna precipitační metodou Gentra Puregene. K dispozici byly 2 ml fixačního média se vzorkem, které byly centrifugovány (3 000 rpm, 5 min) a opatrně byl odstraněn supernatant. Ke stočeným buňkám bylo přidáno 300 μ l lyzačního pufru a 5 μ l proteinázy K, směs byla zvortexována a inkubována 1 hod při 55 °C v třepacím bločku. Poté se vzorky nechaly vytemperovat na pokojovou teplotu a následně se k nim přidá 100 μ l precipitačního roztoku a byly zvortexovány a inkubovány 5 min na ledu. Následně byly stočeny (14 000 rpm, 5 min) a supernatant přenesen do 2 ml

zkumavek obsahujících 300 μ l isopropanolu. Zkumavky byly promíchány jejich obracením a 5 min inkubovány. Poté byly stočeny (14 000 rpm, 15 min), supernatant odstraněn a k peletu přidáno 300 μ l 70% ethanolu. Zkumavky byly opět promíchány obracením a zcentrifugovány (14 000 rpm, 5 min). DNA se poté nechala vysušit v otevřené zkumavce. Po vysušení se k peletu přidalo 20 μ l hydratačního pufru a DNA se nechala rozpustit při 65 °C během 1 hod v bločku. Vyizolovaná DNA byla skladována v mrazničce. Během izolace DNA se provádí tzv. kontrola izolace neboli slepý vzorek. S kontrolou izolace je pracováno stejně jako se vzorkem, s tím rozdílem, že neobsahuje žádnou DNA. Tato kontrola sloužila k ověření, zda během izolace nedošlo ke kontaminaci.

Pro další analýzu bylo nutné DNA amplifikovat, k čemuž sloužila polymerázová řetězová reakce se směsí primerů GP5+/6+-bio. Pro kontrolu přítomnosti a čistoty lidské DNA sloužily PCR primery MS3/MS10-bio specifické pro lidský beta-globin. Obdobně jako u izolace byla i zde provedena negativní kontrola, kdy se opět se zkumavkou neobsahující DNA pracovalo stejně jako kdyby ji obsahovala. Tato kontrola sloužila k ověření, zda nedošlo během PCR reakce ke kontaminaci.

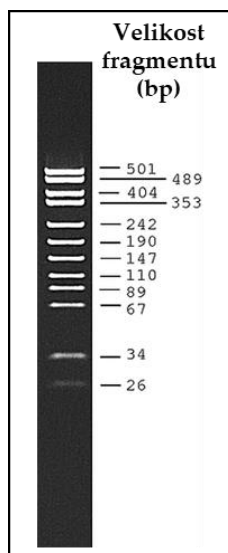
V dalším kroku byla provedena gelová elektroforéza. Gel byl připraven rozpuštěním 3 g agarózy ve 100 ml TBE pufru. Nejprve se nechala agaróza nabobtnat a následně byla rozpuštěna zahříváním v mikrovlnné troubě po dobu cca 2-3 min za občasného míchání. Roztok se nechal mírně zchladnout, přidaly se do něho 4 μ l barvičky GelRed® a poté byl přelit do elektroforetické vaničky s elektroforetickým hřebenem. Po ztuhnutí byl hřeben opatrně odstraněn a gel umístěn do elektroforetické vany a zalit roztokem TBE tak, aby byl celý ponořen a hladina byla těsně nad gelem. Do první jamky byly nanášeny 3 μ l velikostního markeru pUC18/MspI. Bylo smícháno 10 μ l PCR amplikonů určených pro detekci HPV s 3 μ l nanášecího pufru (0,2% bromfenolová modř, 0,2% xylen cyanol, 60%

glycerol, 60mM EDTA) a následně bylo vše naneseno do dalších jamek gelu. Elektroforéza probíhala při 150 V po dobu cca 50 min. Následně byl gel umístěn do transiluminátoru, kde byl pod UV světlem vyfocen. Jak je patrné na Obrázku 9, na elektroforézu se vždy kromě velikostního markeru a vzorků nanáší i kontrola izolace, negativní kontrola a HPV typ 16 o třech různých koncentracích. Stěr z dutiny ústní, umístěný na pozici 5, nemá souvislost s bakalářskou prací.



Obrázek 9 – Výsledek gelové elektroforézy – multiplexová PCR se směsí primerů GP5+/6+ specifickými pro HPV DNA

Elektroforéza byla vyhodnocena na základě znalosti velikosti jednotlivých fragmentů velikostního markeru, v tomto případě se jednalo o pUC18/MspI. Velikost fragmentů tohoto markeru je zaznamenána na Obrázku 10.



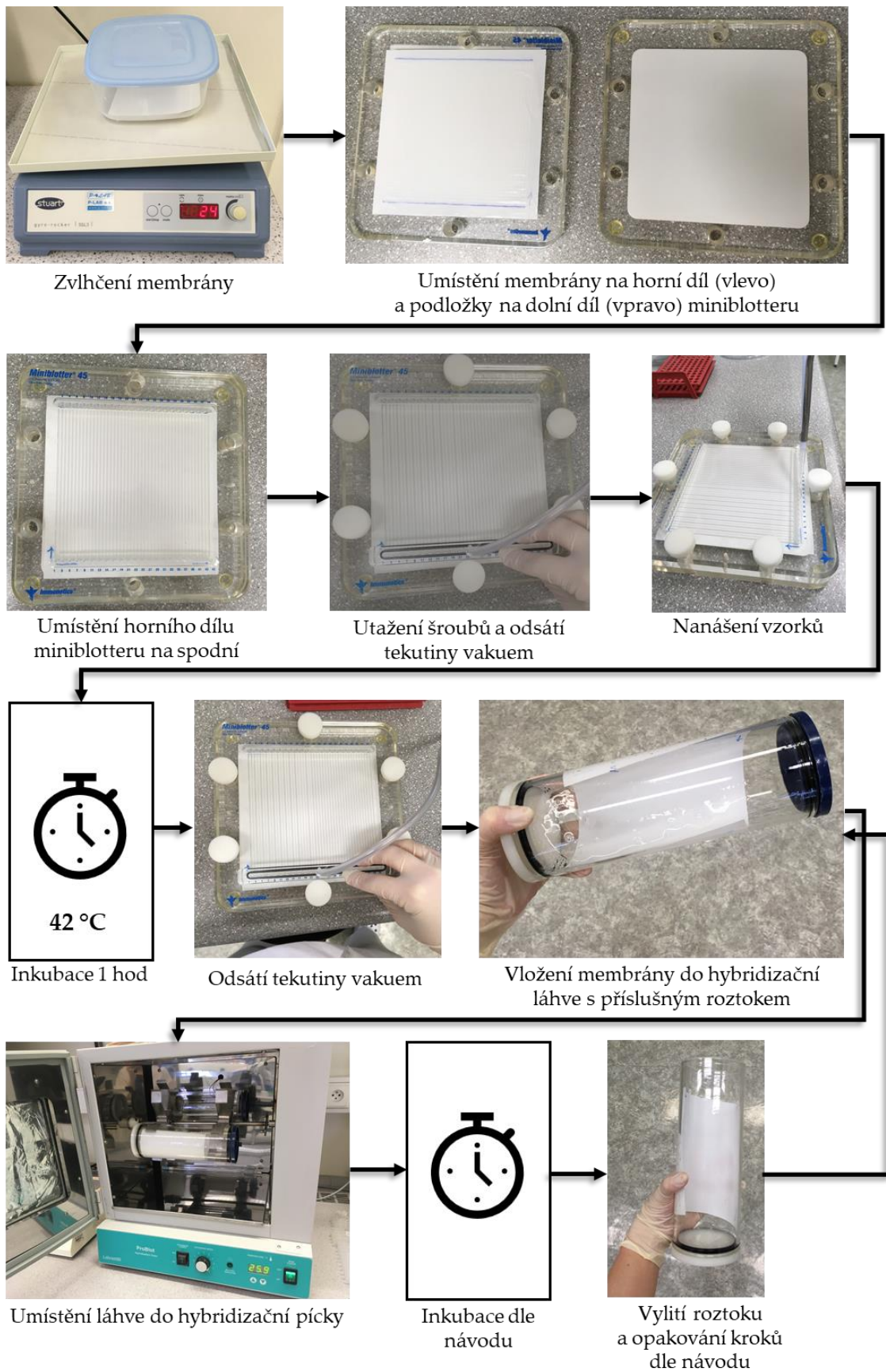
Obrázek 10 – Velikost jednotlivých fragmentů markeru pUC18/MspI [55]

Výsledkem elektroforézy je viditelný proužek DNA u pozitivního vzorku odpovídající určité velikosti markeru pUC18/MspI. V případě pozitivního nálezu HPV typu se jedná o fragment o velikosti 150 bp a v případě pozitivního nálezu β -globinu se jedná o fragment o velikosti 208 bp.

V první fázi metody reverzní hybridizace (RLB, z angl. reverse line blot) je nutné připravit si membránu Biodyne C pro detekci 34 typů HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84) a β -globinu, jejichž specifické próby jsou na ni kovalentně navázány.

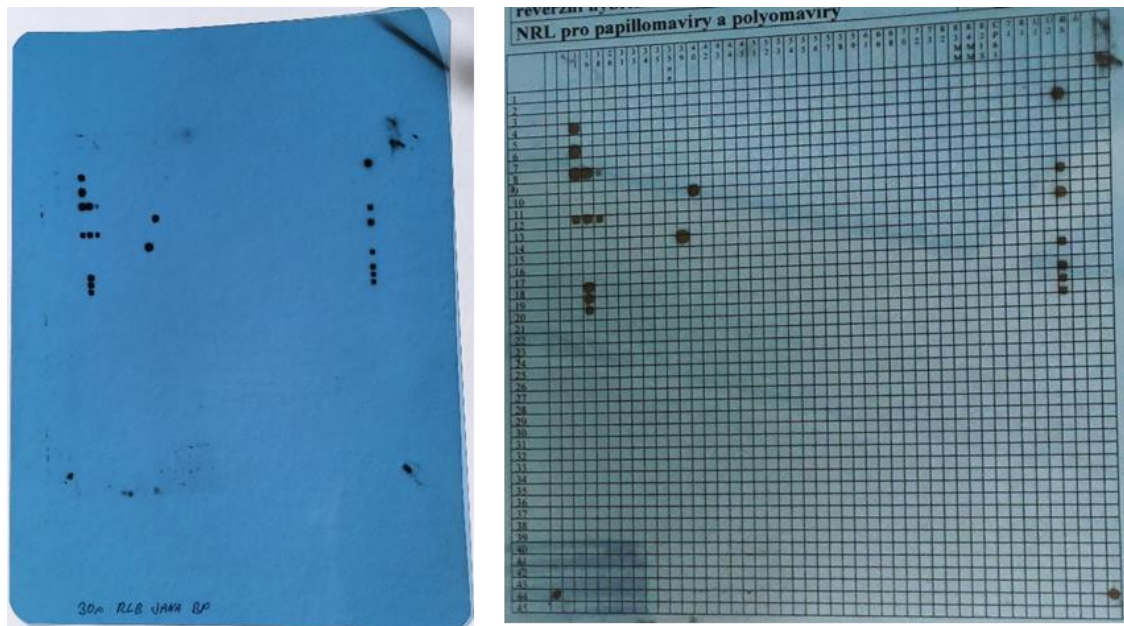
V druhé fázi bylo nutné analyzované vzorky naředit. Pipetovalo se 10 μ l PCR produktu do 200 μ l roztoku 2x SSPE a 0,1% SDS. Pokud nebyla analýza provedená hned, bylo možné vzorky uchovat do druhého dne v mrazáku. Následně se 200 μ l této směsi promíchalo pomocí vortexu, provedla se denaturace v termocykleru při 98 °C po dobu 10 min a vzorky byly umístěny na led. Během denaturace vzorků se membrána s nanesenými próbami inkubovala v misce kýváním na třepačce se 100 ml roztoku 2x SSPE a 0,1% SDS po dobu 5 min. Následně byla membrána umístěna na miniblotter kolmo ke směru dříve

nanesených prób. Poté byl šrouby spojen spodní díl miniblotteru s podložkou s horním dílem miniblotteru s membránou, byla odsáta veškerá tekutina a do jednotlivých řad s číslem 2 až maximálně 44 bylo nanášeno opatrně 150 μ l naředěného vzorku. Miniblotter byl následně umístěn do hybridizační píčky, kde po dobu 60 min při 42 °C probíhala ve tmě inkubace. Produkty byly vakuově odsáty a membrána byla umístěna do hybridizační láhve, kam se dvakrát přidalo 150 ml roztoku 2x SSPE a 0,5% SDS a láhev se vždy nechala ve tmě točit po dobu 10 min v hybridizační pícce při 51 °C. Poté byl napipetován 1 μ l 3x ředěného avidin-HRP (křenuv peroxidáza z angl. Horseradish Peroxidase) do 10 ml 2x SSPE a 0,5% SDS a tento roztok byl ve tmě inkubován s membránou v hybridizační láhvi umstn v hybridizační pícce po dobu 60 min při 42 °C. Membrána byla pt promyta 2x 150 ml roztoku 2x SSPE a 0,5% SDS v hybridizační pícce po dobu 15 min ve tmě při 42 °C a nsledn jst dvakrát promyta vždy 150 ml roztoku 2x SSPE opět v hybridizační pícce po dobu 5 min. V posledním kroku před vyvoláním snímku bylo nutné membránu v hybridizační láhvi nechat 5 min inkubovat se substrátem, který byl připraven smísením 3 ml komerčních roztoků Luminolu a peroxidu. Tato inkubace opět probíhala ve tmě v hybridizační pícce. Schematicky je tento proces naznačen na Obrázku 11.



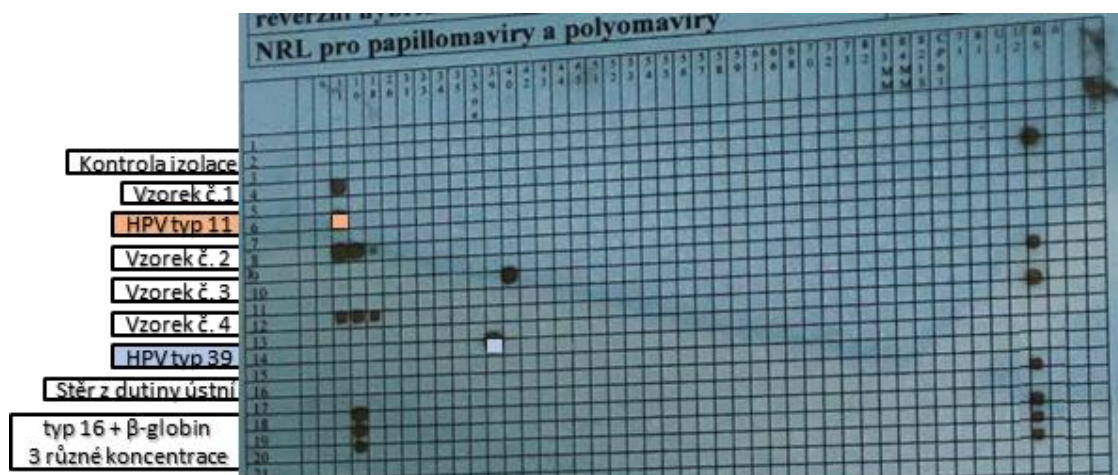
Obrázek 11 – Schématický postup druhé fáze metody reverzní hybridizace

Po inkubaci byla membrána vyjmuta z láhve, zabalena do Saran folie a umístěna do kazety, do které se v temné komoře přikládá vždy nový chemiluminiscentní film, který se nechával exponovat 5 s, 30 s a 5 min. Následně se nechaly filmy vyvolat a výsledek analýzy byl odečítán pomocí orientační mřížky na Obrázku 12.



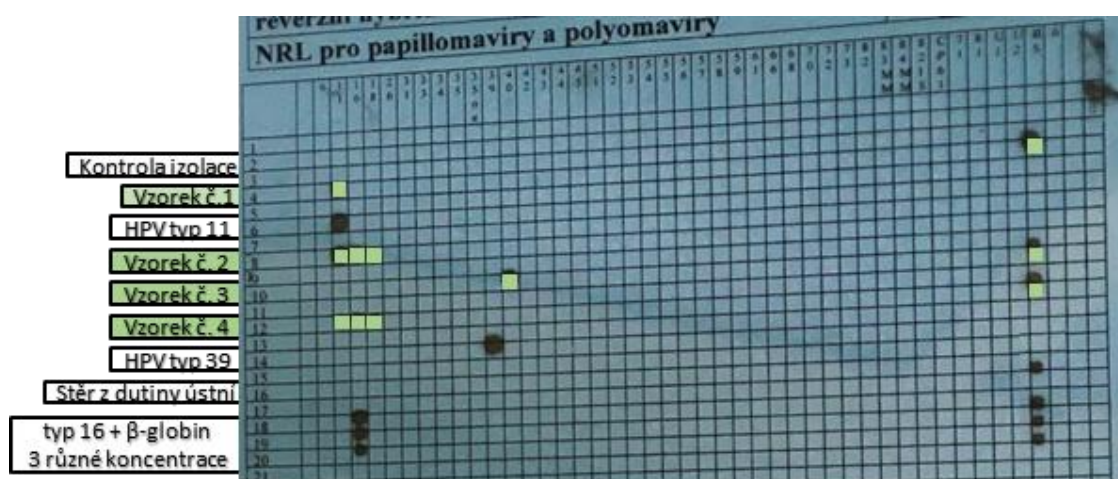
Obrázek 12 – Výsledek reverzní hybridizace

Ke správnému odečtení výsledku jsou na membránu naneseny pozitivní kontroly (známé typy HPV), které pomohou umístit mřížku na snímek správně. Na obrázku 13 to jsou konkrétně HPV typ 11 na šestém řádku a HPV typ 39 na 14. řádku. V řádku č. 2 byla kontrola izolace, která musí být negativní.



Obrázek 13 – Postup odečítání výsledků reverzní hybridizace 1. krok

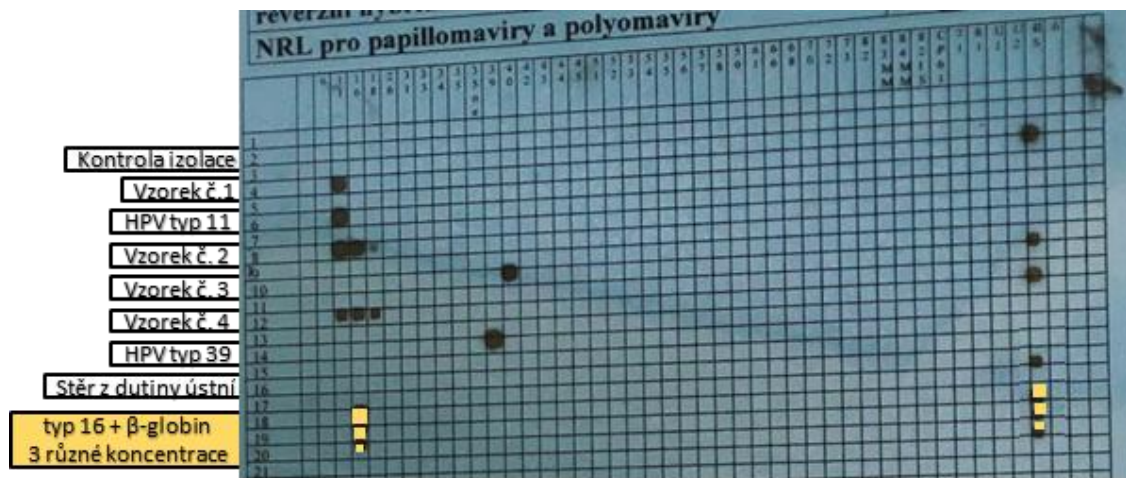
V druhém kroku byly odečteny výsledky daných vzorků 1-4 na Obrázku 14. U vzorku č. 1 byl detekován typ HPV 11, u vzorku č. 2 HPV 11, 16 a 18, u vzorku č. 3 typ 40 a u vzorku č. 4 typy 11, 16 a 18. U všech vzorků je kontrolována přítomnost β-globinu. V případě, kdy by byl vzorek negativní a nebyla by zaznamenána ani přítomnost β-globinu, bylo by nutné zopakovat izolaci DNA tohoto vzorku. Pokud jsou u vzorku detekovány HPV typy, ale β-globin ne, jako je tomu u vzorku č. 2 na Obrázku 13, je potom výsledek zapisován s poznámkou, že je vzorek pravděpodobně málo buněčný



Obrázek 14 – Postup odečítání výsledků reverzní hybridizace 2. krok

Na membránu byl také vždy nanášen HPV typ 16 o třech různých koncentracích (800, 160 a 32 kopií virových genomů) k ověření citlivosti metody

při opakovaném použití membrány. V tomto případě byly nanесeny do řádků 18, 19 a 20, jak je patrné na Obrázku 15.



Obrázek 15 – Postup odečítání výsledků reverzní hybridizace 3. krok

Jak bylo zmiňováno, chemiluminiscentní film byl s membránou exponován po dobu tří různých časových intervalů. Tímto způsobem jsou odečteny všechny tři membrány a výsledky se rozlišují na tři kategorie podle toho, zda jsou patrné již po 5 s, po 30 s nebo případně až po 5 min.

Membránu lze opakovaně použít, ale prvně je nutné odstranit (odmýt) amplikony. Membrána byla vložena do plastové misky spolu s 250 ml 1% SDS a při 80 °C se nechala po dobu 45 min inkubovat v hybridizační pídce. Následně byla membrána předána do jiné misky spolu s 250 ml 20 mM roztoku EDTA a nechala se kývat po dobu 15 min. Tento proces se opakoval celkem 2x a poté mohla být membrána skladována v lednici zabalená v Saran folii a následně znovu použita pro další RLB.

V případě pozitivního výsledku amplifikace na kontrolním gelu a negativního při použití reverzní hybridizace byla provedena následná sekvenace amplikonů.

4.5 Vyhodnocení dat

4.5.1 Rozdělení HPV typů dle rizikovosti

Rozdělení typů HPV bylo provedeno dle klasifikace Mezinárodní agentury pro výzkum karcinomu (IARC, z angl. International Agency for Research on Cancer). HPV typy byly rozděleny na LR HPV typy, HR HPV typy a pravděpodobně vysoce rizikové pHR HPV typy (z angl. probable/possible high risk) [13].

4.5.2 Výpočet procentuální shody výsledků metod RLB a Anyplex

Procentuální shoda je vypočtena na základě vzorce 1:

$$shoda = \frac{\text{počet}(+/+) + \text{počet}(-/-)}{\text{celkový počet detekcí oběma metodami}} \cdot 100 \quad (1),$$

kde (+/+) znamená, že výsledek byl pozitivní u obou metod a (-/-) znamená, že výsledek byl negativní u obou metod.

4.5.3 Výpočet ukazatelů správnosti testu

Metody detekce HPV byly porovnány na základě tzv. ukazatelů správnosti testu, tedy senzitivity, specifity a PPV, tedy prediktivní hodnoty pozitivního testu (z angl. positive predictive values) a NPV, tedy prediktivní hodnoty negativního testu (z angl. negative predictive values) [56].

Senzitivita testu je pravděpodobnost, že test bude pozitivní, když sledovaná osoba má skutečně mít pozitivní výsledek testu. Specifita testu je pravděpodobnost, že test bude negativní, když sledovaná osoba má skutečně mít negativní výsledek testu. Senzitivita tedy rozpoznává skutečně nemocné osoby a specifita naopak osoby bez nemoci [56].

PPV je pravděpodobnost, že sledovaná osoba má skutečně pozitivní výsledek testu, když test vyjde jako pozitivní. NPV je pravděpodobnost, že sledovaná osoba má negativní výsledek testu, když test vyjde jako negativní. Se snižující se hodnotou PPV či NPV, roste pravděpodobnost falešně pozitivního, resp. falešně negativního výsledku [56].

Senzitivita se vypočítá pomocí vzorce 2:

$$\text{senzitivita} = \frac{A}{A+C} \cdot 100, \quad (2)$$

specificita podle vzorce 3:

$$\text{specificita} = \frac{D}{B+D} \cdot 100, \quad (3)$$

PPV podle vzorce 4:

$$PPV = \frac{A}{A+B} \cdot 100 \quad (4)$$

a NPV podle vzorce 5:

$$NPV = \frac{D}{C+D} \cdot 100, \quad (5)$$

kde parametry A , B , C a D jsou dány Tabulkou 1 [56].

Tabulka 1 – Parametry potřebné pro výpočet senzitivity, specificity a prediktivních hodnot pozitivního a negativního testu [56]

		Výsledek cytologie	
		pozitivní nález	negativní nález
Výsledek molekulárně biologického vyšetření	pozitivní nález	A	B
	negativní nález	C	D

5 VÝSLEDKY

Veškeré výsledky, s kterými je v následujících kapitolách pracováno, byly poskytnuty z probíhající studie „Validace analýzy metylace promotorů TSG spojených s HPV indukovanou karcinogenezí jako screeningového vyšetření análního karcinomu v rizikové populaci“. V bakalářské práci byly získané výsledky zpracovány do tabulek a grafů, vyhodnoceny dle různých kritérií a porovnány s publikovanými studiemi.

Ke zpracování do bakalářské práce byly poskytnuty výsledky 186 pacientů. Ve třech případech nedošlo k předání vzorků mezi laboratořemi, v jednom případě byl místo cytologického odběru proveden odběr histologický, tito pacienti tedy byli z analýz pro bakalářskou práci vyřazeni. U některých vzorků se nepodařilo amplifikovat kontrolní beta-globinový gen pravděpodobně z důvodu nedostatečného množství biologického materiálu ve stěru, konkrétně šlo o 25 vzorků (13 %) u metody RLB a o 17 vzorků (9 %) u metody Anyplex. U 29 vzorků (16 %) nebyl pravděpodobně ze stejného důvodu určen cytologický nález. Z toho důvodu byly některé vzorky vyloučeny a do bakalářské práce tak byly zahrnuty pouze výsledky 150 pacientů, u nichž se podařilo amplifikovat beta-globinový gen pomocí metody RLB i Anyplex. Výsledky vzorků, u kterých nebylo možné určit cytologický nález, byly ponechány, protože hlavním cílem bakalářské práce je porovnat metody RLB a Anyplex, což je možné i bez znalosti cytologického výsledku.

5.1 Charakterizace vyšetřovaného souboru pacientů

Ke každému ze 150 vzorků je k dispozici na základě dotazníku získaná informace o věku pacienta, o počtu jeho sexuálních partnerů, v kolika letech zahájil sexuální život, jak dlouho je diagnostikován jako HIV pozitivní a zda u něho probíhá vysoce aktivní antiretroviróvá terapie. Dále byl u všech pacientů vyšetřen absolutní počet CD4+ T-lymfocytů.

V Tabulce 2 jsou zaznamenány průměrné výsledky a střední, minimální a maximální hodnota vycházející z výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření všech 150 pacientů.

Tabulka 2 – Charakteristika souboru 150 pacientů na základě výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření

	věk (rok)	délka HIV	absolutní počet CD4+ T-buněk v 1 mm ³ krve	podíl osob s probíhající antiretroviróvou terapií	počet sexuálních partnerů	první sex (rok)
průměr	37,8	5,4 let	846	92%	98	17,2
medián	37,0	4,0 let	826	-	30	17,0
minimum	22	1 měsíc	4	-	1	5
maximum	67	22 let	1920	-	3500	32

V Tabulce 3 jsou zaznamenány průměrné výsledky dotazníku pro jednotlivé skupiny pacientů na základě cytologického vyšetření slepého odběru vzorku.

Tabulka 3 – Charakteristika souboru 150 pacientů rozdělených dle různých cytologických nálezů na základě výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření – průměrné hodnoty sledovaných parametrů

	věk (rok)	délka HIV (rok)	absolutní počet CD4+ T-buněk v 1 mm ³ krve	podíl osob s probíhající antiretroviróvou terapií	počet sexuálních partnerů	první sex (rok)
NILM (n=53)	38,4	5,1	864	91%	71	17,2
ASC-US (n=25)	37,5	6,2	911	92%	215	17,5
LSIL (n=51)	36,7	5,3	814	92%	73	17,3
ASC-H / HSIL (n=7)	45,8	5,6	661	100%	299	15,9

V Tabulce 4 jsou zaznamenány průměrné hodnoty sledovaných parametrů z dotazníku pro jednotlivé skupiny pacientů rozdělené podle počtu detekovaných HPV typů oběma metodami.

Tabulka 4 – Charakteristika souboru 150 pacientů rozdělených dle počtu detekovaných HPV typů metodami GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28 u slepě odebraných vzorků na základě výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření – průměrné hodnoty sledovaných parametrů

		věk (rok)	délka HIV	absolutní počet CD4+ T-buněk v 1 mm ³ krve	podíl osob s probíhající antiretrovirovou terapií	počet sexuálních partnerů	první sex (rok)
RLB	negativní (n=16)	38,5	6,3	710	94%	316	18
	1 typ (n=53)	41,2	6,1	839	91%	72	17
	2 typy (n=36)	35,4	4,5	977	92%	56	17
	3 typy (n=29)	37,8	5,3	770	90%	83	17
	> 3 typy (n=16)	35,0	4,0	851	100%	94	16
ANYPLEX	negativní (n=10)	37,5	5,7	759	90%	106	19
	1 typ (n=28)	39,536	6,5	781	93%	198	17
	2 typy (n=33)	37,455	5,1	891	85%	52	17
	3 typy (n=24)	40,625	6,5	1007	100%	84	17
	> 3 typy (n=55)	35,527	4,3	799	93%	80	17

Jak vyplývá z Tabulky 2, u všech sledovaných parametrů byl velký rozdíl mezi maximální a minimální uváděnou hodnotou. Z Tabulky 3 a 4 je patrné, že tyto parametry nemají vliv na výsledek cytologického vyšetření ani na počet detekovaných HPV typů u pacientů, protože průměrné hodnoty všech sledovaných parametrů u jednotlivých cytologických nálezů i u různého počtu detekovaných HPV typů u pacientů jsou mezi sebou srovnatelné. Pouze v Tabulce 3 u cytologického nálezu ASC-H / HSIL je patrné, že v této kategorii byli pacienti v průměru starší než ti s jinými cytologickými nálezy, průměrný absolutní počet CD4+ T-buněk měli naopak nejnižší, léčbu antiretrovirovou terapií podstupovali všichni sledovaní pacienti s tímto nálezem, jejich průměrný počet sexuálních partnerů byl nejvyšší a pohlavní život průměrně zahájili v dřívějším věku oproti ostatním. Tato data ale mohou být ovlivněna nízkým počtem (n = 7) pacientů s cytologickým nálezem ASC-H / HSIL, a tudíž se na základě těchto výsledků nedá vyvozovat žádný závěr. Skupina 150 pacientů je

z pohledu sledovaných parametrů homogenní a věk pacienta, délka infekce HIV, absolutní počet CD4+ T-buněk, probíhající antiretrovirová léčba, počet sexuálních partnerů ani věk v době prvního pohlavního styku nemají vliv na cytologický nález ani na počet detekovaných HPV typů.

5.2 Výsledky cytologického vyšetření

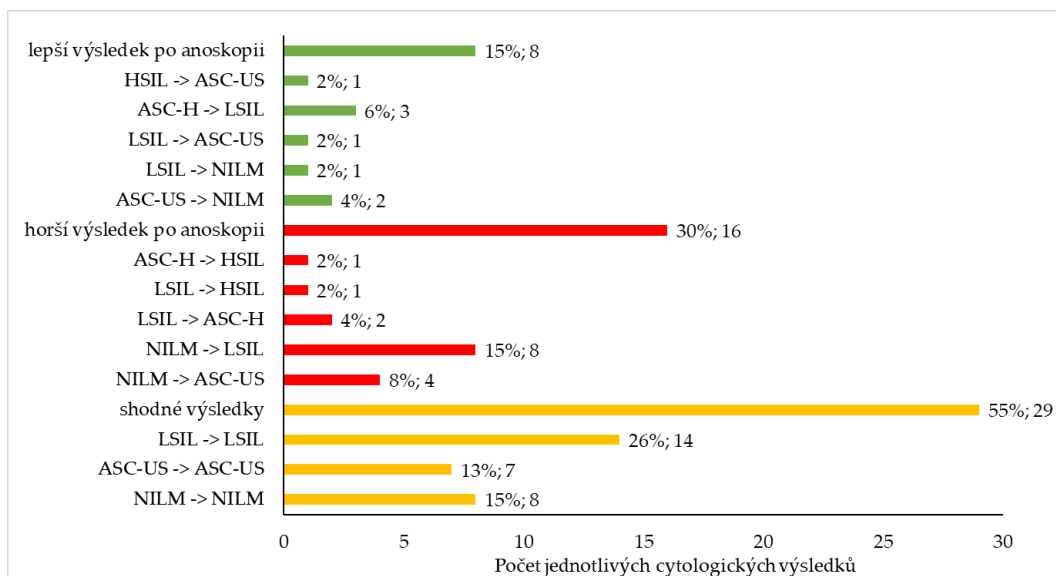
V Tabulce 5 je zaznamenán počet a procentuální zastoupení jednotlivých cytologických nálezů pro 150, resp. 63 vzorků, které byly do bakalářské práce zahrnuty. Vzhledem k nízkému počtu cytologických nálezů ASC-H (pro slepý odběr vzorku $n = 6$, pro odběr vzorku při anoskopii $n = 4$) a HSIL (pro slepý odběr vzorku $n = 1$, pro odběr vzorku při anoskopii $n = 2$) byly tyto kategorie sloučeny do jedné. Oba tyto cytologické výsledky jsou považovány za rizikové, tudíž by jejich sloučení nemělo ovlivnit další vyhodnocování dat.

Tabulka 5 – Přehled výsledků cytologických vyšetření análního stěru 150 sledovaných pacientů

cytologický nález	slepý odběr		odběr při anoskopii	
	počet	procentuální zastoupení	počet	procentuální zastoupení
celkový počet vzorků	150	-	63	-
NILM	53	35%	12	19%
ASC-US	25	17%	13	21%
LSIL	51	34%	25	40%
ASC-H / HSIL	7	5%	6	9%
nelze	14	9%	7	11%

Zastoupení jednotlivých cytologických výsledků mezi vzorky není podle očekávání rovnoměrné. Do kategorie ASC-H nebo HSIL patří pouze 5 % slepě odebraných vzorků a 9 % vzorků odebraných při anoskopii z celkového počtu. Karcinom anu nebyl diagnostikován u žádného z pacientů. Tato fakta mohou mírně ovlivnit výsledky závislé na cytologickém nálezu. Ovšem dalo se očekávat, že rizikové nálezy ASC-H / HSIL a karcinom anu se budou ve sledované populaci vyskytovat méně často než normální nález či mírné abnormality.

U 53 pacientů byl cytologický výsledek určen jak u slepého odběru, tak u odběru při anoskopii. U ostatních pacientů byl minimálně jeden ze vzorků hodnocen jako nedostatečně buněčný, případně nebyla anoskopie vůbec provedena. Na grafu na Obrázku 16 je zobrazena procentuální shoda či neshoda cytologického výsledku z obou odběrů.



Obrázek 16 – Procentuální zastoupení shodných a neshodných výsledků cytologického nálezu 53 vzorků odebraných při slepém odběru a odběru při cílené anoskopii

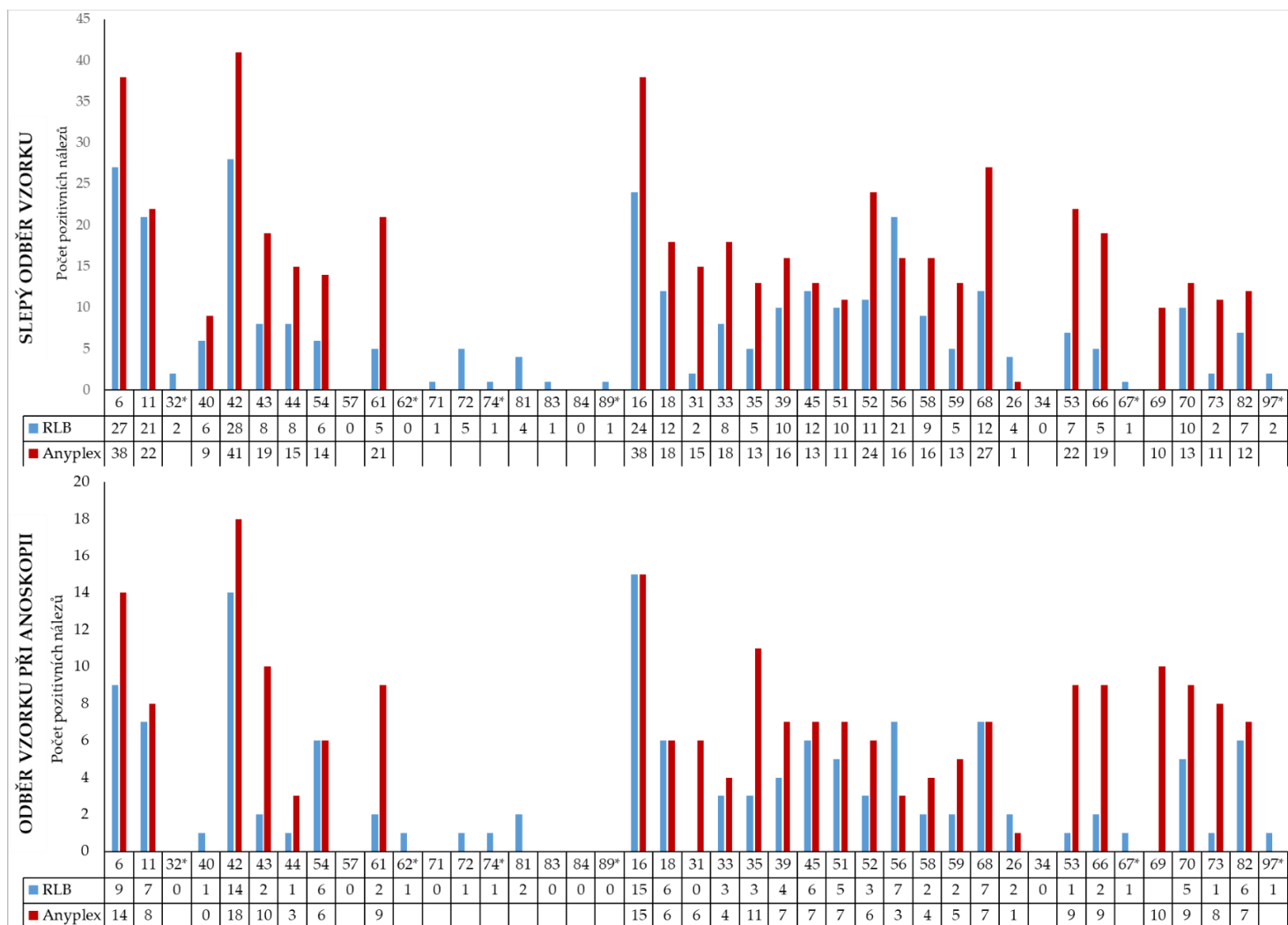
Z Obrázku 16 vyplývá, že 55 % výsledků bylo shodných pro oba odběry, 30 % pacientů mělo horší cytologický výsledek anoskopického odběru než slepého a 15 % pacientů naopak. Nejčastěji byl chybně určen normální nález, který byl po anoskopickém vyšetření u 15 % případů následně odečten jako LSIL a u 8 % případů jako ASC-US. Cytologické výsledky tak potvrzují domněnku, že odběr vzorku při anoskopii je specifitější než slepý odběr.

5.3 Výsledky genotypizace

U všech 150 slepě odebraných vzorků byla provedena genotypizace HPV pomocí metod GP5+/6+ RLB (dále v textu jako RLB) a Anyplex II HPV 28 (dále v textu jako Anyplex). U vzorků odebraných při anoskopii se genotypizace HPV pomocí obou metod povedla pouze u 49 pacientů, u ostatních pacientů nebyl anoskopický stěr proveden nebo se u odebraných vzorků nepodařilo amplifikovat kontrolní beta-globinový gen pravděpodobně z důvodu nedostatečného množství biologického materiálu ve stěru.

Pomocí metod RLB a Anyplex bylo celkem stanoveno 35 různých typů HPV, z nichž 14 (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 71, 72, 81, 83, 84) patří do kategorie LR HPV, 13 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) do kategorie HR HPV a 8 (26, 34, 53, 66, 69, 70, 73, 82) do kategorie pHR HPV typů. V NRL byly některé typy dodatečně určeny pomocí sekvenace PCR amplikonů, konkrétně LR HPV typy 32, 62, 74 a 89 a pHR HPV typy 67 a 97.

Na Obrázku 17 je na grafech znázorněno zastoupení všech detekovaných typů HPV ve stěrech odebraných při slepém odběru a při anoskopii. Červenou barvou jsou označeny výsledky metody Anyplex, modrou barvou výsledky RLB. Pokud je v tabulce pod grafem prázdné místo, znamená to, že daný genotyp není tato metoda schopná rozlišit. Typy označené hvězdičkou (např. 32*) byly určeny pomocí následné sekvenace.



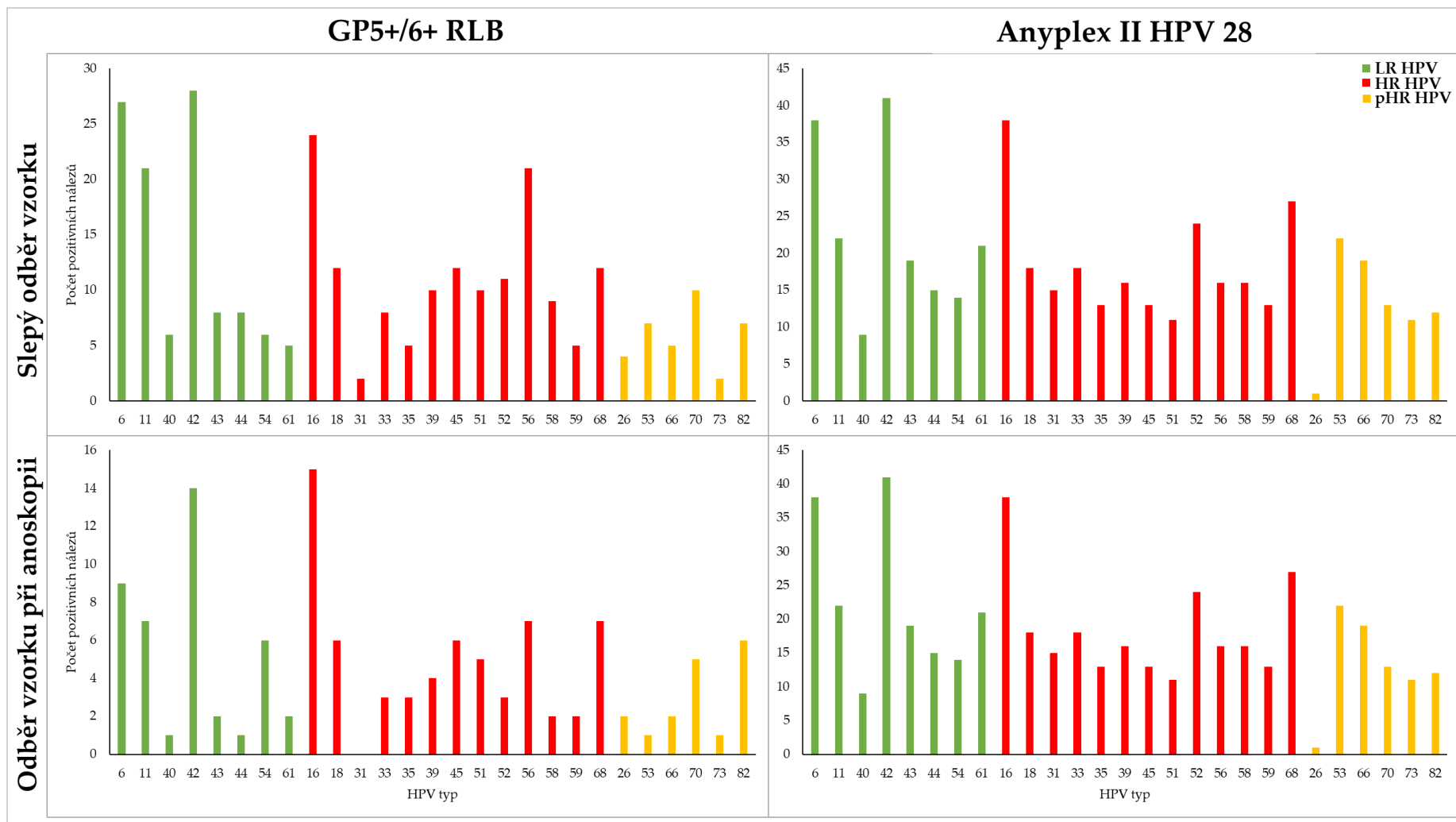
Obrázek 17 – Počet pozitivních nálezů HPV typů v análních stěrech odebraných při slepém odběru (n = 150) a při anoskopii (n = 49) detekovaných metodami GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28

Metodou RLB a následnou sekvenací bylo v analyzovaných vzorcích detekováno o 13 HPV typů více než metodou Anyplex. Z grafu na Obrázku 17 však vyplývá, že LR HPV typy 57, 71, 72, 81, 83 a 84 a pHR HPV typ 34, které jsou detekovány pouze metodou RLB, se ve vzorcích vyskytovaly v porovnání s ostatními typy velmi málo nebo vůbec. Co se týká HPV typů určených následnou sekvenací, ve vzorcích se objevily jednou, maximálně 2x, takže se jedná o zanedbatelný počet. Naopak pHR HPV typ 69, který je detekován pouze metodou Anyplex, se ve vzorcích objevoval poměrně často, u anoskopických odběrů byl dokonce z kategorie pHR HPV detekován nejčastěji.

Dále je z grafů na Obrázku 17 patrné, že metodou Anyplex byly jednotlivé HPV typy detekovány ve více vzorcích než metodou RLB. U slepých odběrů byl počet pozitivních nálezů HPV typů 43, 54, 61, 31, 33, 35, 52, 59, 68, 53, 66 a 73 detekovaných metodou RLB minimálně o polovinu menší než metodou Anyplex. U typů 31 a 73 to bylo dokonce o více než 80 %.

U vzorků získaných při slepém odběru byl oběma metodami nejčastěji detekován z kategorie LR HPV typ 42 a z kategorie HR HPV typ 16. Z kategorie pHR HPV byl metodou RLB nejčastěji detekován typ 70 a metodou Anyplex typ 53. U vzorků odebraných při anoskopii to bylo stejné, až na kategorii pHR HPV, kde metodou RLB byl nejčastěji detekován typ 82 a metodou Anyplex typ 69.

Hlavním cílem této práce je porovnání metod RLB a Anyplex. V následujících grafech a tabulkách jsou proto, pokud není uvedeno jinak, zahrnuty pouze HPV typy, které lze rozlišit pomocí obou těchto metod. Celkem se jedná o 27 HPV typů, jejichž detekovaný počet oběma metodami ve vzorcích ze slepého odběru i odběru při anoskopii je znázorněn v grafech na Obrázku 18. Jednotlivé typy jsou barevně rozlišeny dle kategorie rizikovosti – zeleně LR HPV typy, žlutě pHR HPV typy a červeně HR HPV typy.



Obrázek 18 – Počet pozitivních nálezů HPV typů rozdělených podle rizikivosti (zeleně LR HPV, červeně HR HPV, žlutě pHR HPV) v análních stěrech odebraných při slepém odběru (n = 150) a při anoskopii (n = 49) detekovaných metodami GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28

Celkový počet pozitivních výsledků detekce je zhruba o 40 % vyšší u metody Anyplex než u metody RLB, jak u slepě odebraných vzorků, tak u vzorků odebraných při anoskopii. Ve vzorcích odebraných při slepém odběru je procentuální zastoupení kategorií LR, HR a pHR HPV typů srovnatelné u obou metod.

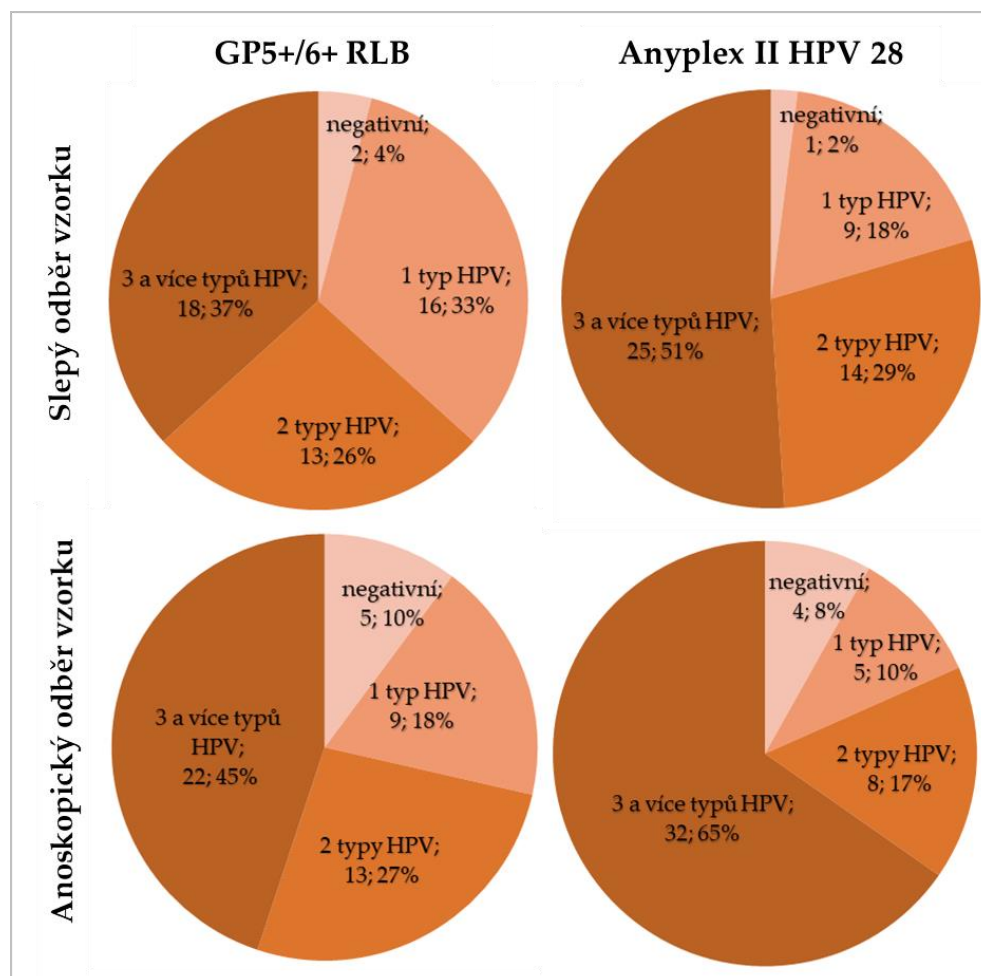
V Tabulce 6 je uvedena procentuální shoda výsledků stanovených metodou RLB a Anyplexem pro jednotlivé typy zvlášť, pro LR (zeleně), pHR (žlutě) a HR (červeně) HPV typy a pro všechny sledované HPV typy dohromady. Shoda je vypočtena na základě vzorce (1), kde kombinace výsledků +/+, +/-, -/+, -/- jsou zapisovány v pořadí RLB/Anyplex.

Tabulka 6 – Porovnání genotypově specifické detekce HPV typů u metod RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u slepého odběru vzorku (n = 150) a odběru při anoskopii (n = 49)

SLEPÝ ODBĚR						ODBĚR PŘI ANOSKOPII					
typ	+/+	+/-	-/+	-/-	shoda	typ	+/+	+/-	-/+	-/-	shoda
6	24	3	14	109	89%	6	8	0	6	35	88%
11	19	2	3	126	97%	11	7	0	0	42	100%
40	5	1	4	140	97%	40	0	0	0	49	100%
42	22	6	19	103	83%	42	12	1	5	31	88%
43	6	2	13	129	90%	43	2	0	8	39	84%
44	6	2	9	133	93%	44	1	0	2	46	96%
54	4	2	10	134	92%	54	4	1	1	43	96%
61	3	2	18	127	87%	61	1	0	6	42	88%
LR HPV	89	20	90	1001	91%	LR HPV	35	2	28	327	92%
26	1	3	0	146	98%	26	1	1	0	47	98%
53	5	2	17	126	87%	53	1	0	8	40	84%
66	5	0	14	131	91%	66	2	0	7	40	86%
70	6	4	7	133	93%	70	5	0	3	41	94%
73	2	0	9	139	94%	73	1	0	7	41	86%
82	5	2	7	136	94%	82	5	1	2	41	94%
pHR HPV	24	11	54	811	93%	pHR HPV	15	2	27	250	90%
16	23	1	15	111	89%	16	13	1	2	33	94%
18	10	2	8	130	93%	18	4	1	2	42	94%
31	1	1	14	134	90%	31	0	0	4	45	92%
33	7	1	11	131	92%	33	2	0	3	44	94%
35	5	0	8	137	95%	35	3	0	8	38	84%
39	9	1	7	133	95%	39	4	0	3	42	94%
45	8	4	5	133	94%	45	5	0	1	43	98%
51	7	3	4	136	95%	51	3	2	4	40	88%
52	11	0	13	126	91%	52	3	0	3	43	94%
56	13	8	3	126	93%	56	3	4	0	42	92%
58	9	0	7	134	95%	58	2	0	2	45	96%
59	5	0	8	137	95%	59	2	0	3	44	94%
68	10	2	17	121	87%	68	7	0	0	42	100%
HR HPV	118	23	120	1689	93%	HR HPV	51	8	35	543	93%
CELKEM	231	54	264	3501	92%	CELKEM	101	12	90	1120	92%

Celková genotypově specifická shoda mezi metodami byla 92 % jak pro slepý odběr vzorků, tak pro vzorky odebrané při anoskopii, jak je uvedeno v Tabulce 6. 100% shoda byla zaznamenána u tří typů HPV, a to pouze u vzorků odebraných při anoskopii. Z tabulky dále vyplývá, že v případě neshody u slepě odebraných vzorků byly dané typy ve více než 80 % případů detekovány pouze metodou Anyplex, u vzorků odebraných při anoskopii šlo téměř o 90 %.

Na Obrázku 19 je zobrazeno procentuální zastoupení negativních vzorků a vzorků, kde byl detekován 1, 2 nebo 3 a více typů HPV současně. Pro možné porovnání i slepých a anoskopických odběrů jsou do grafů zaneseny výsledky pouze 49 pacientů, u kterých byla provedena HPV detekce oběma metodami jak u slepě odebraného vzorku, tak u vzorku odebraného při anoskopii.

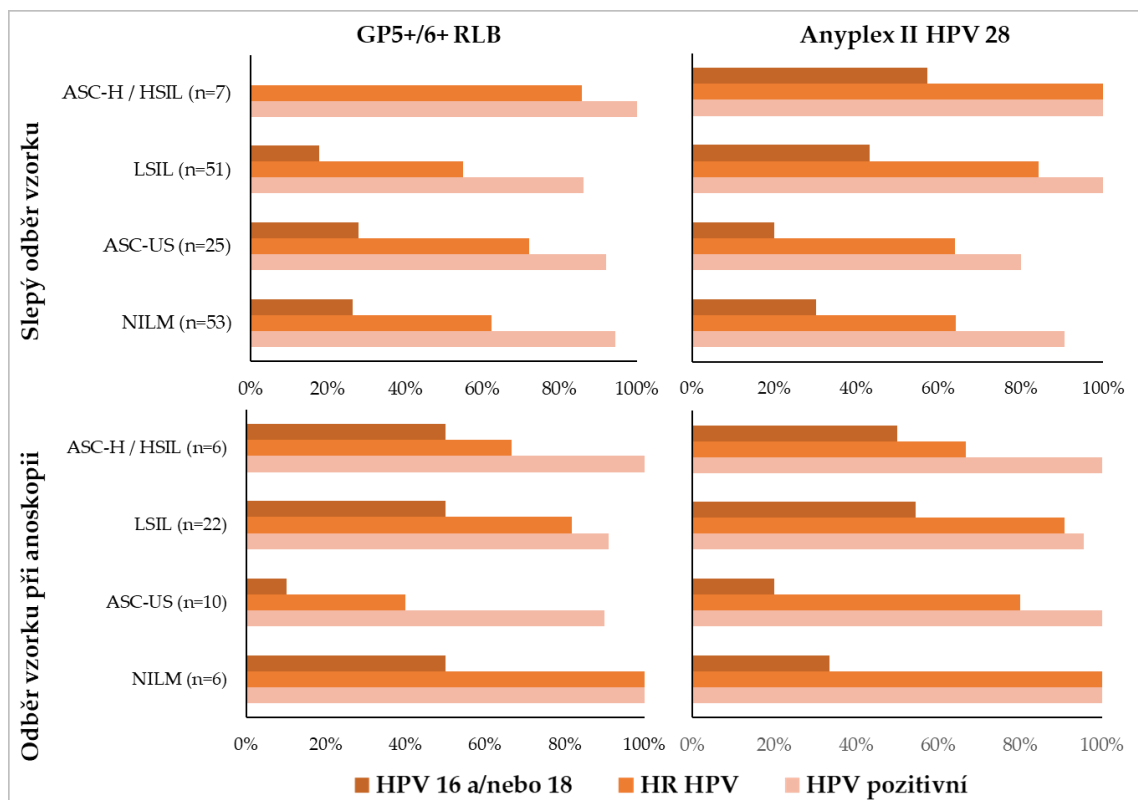


Obrázek 19 – Procentuální zastoupení vícenásobných infekcí HPV detekovaných metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 v análních stěrech odebraných 49 pacientům při slepém odběru a při anoskopii

Z grafů na Obrázku 19 vyplývá, že jak v případě slepého odběru, tak u vzorků odebraných při anoskopii, byly metodou Anyplex výrazně častěji detekovány vícečetné infekce. To souvisí s předchozím faktem, že metodou RLB byl detekován mnohem menší počet jednotlivých typů HPV oproti metodě Anyplex. Pouze u 7 – 10 % vzorků nebyl detekován žádný z 27 sledovaných HPV typů.

Dále je z Obrázku 19 zřejmé, že u anoskopických odběrů je nárůst multiplicitních infekcí (tedy současná přítomnost 2 a více typů) o 9 % oproti slepým odběrům u metody RLB a o 2 % u metody Anyplex. U metody Anyplex je velmi výrazný rozdíl u 3 a více detekovaných typů, konkrétně byl tento počet typů detekován u anoskopických odběrů o 14 % častěji než u slepých odběrů. Je tedy zřejmé, že u anoskopických odběrů je v jednotlivých vzorcích častěji detekováno více typů současně oproti slepému odběru. Zarážející je ovšem fakt, že při anoskopických odběrech bylo vyšší procento negativních výsledků než u slepých stěrů.

Na Obrázku 20 je zobrazeno procentuální zastoupení HPV typů, HR HPV typů a typů 16 a/nebo 18 s ohledem na cytologický nález pro obě metody detekce i pro oba způsoby odběry vzorku. Do grafu jsou zahrnuty pouze vzorky, u kterých se podařilo určit cytologický nález a provést genotypizaci HPV oběma metodami, konkrétně tedy 136 vzorků odebraných při slepém odběru a 44 vzorků odebraných při anoskopii.



Obrázek 20 – Prevalence HPV typů celkově, HR HPV typů a HPV typů 16 a/nebo 18 detekovaných metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u různých cytologických nálezů slepě odebraných vzorků ($n = 136$) a vzorků odebraných při anoskopii ($n = 44$)

Z grafů na Obrázku 20 je patrné, že u více jak 90 % pacientů byl detekován alespoň jeden HPV typ bez ohledu na cytologický nález. Z grafu je dále zřejmá souvislost mezi přítomností HR HPV typů a cytologickým nálezem u vzorků odebraných při slepém odběru. Výsledky jsou sice ovlivněny malým počtem vzorků s nálezem HSIL / ASC-H, ale i přesto je vidět zvyšující se prevalence HR HPV typů se zhoršujícím se cytologickým nálezem, a to zejména u výsledků metody Anyplex. U vzorků odebraných při anoskopii žádná souvislost mezi přítomností HR HPV typů a cytologickým nálezem není, ale to může být ovlivněno malým souborem vzorků ($n = 44$), na kterých byl tento trend sledován.

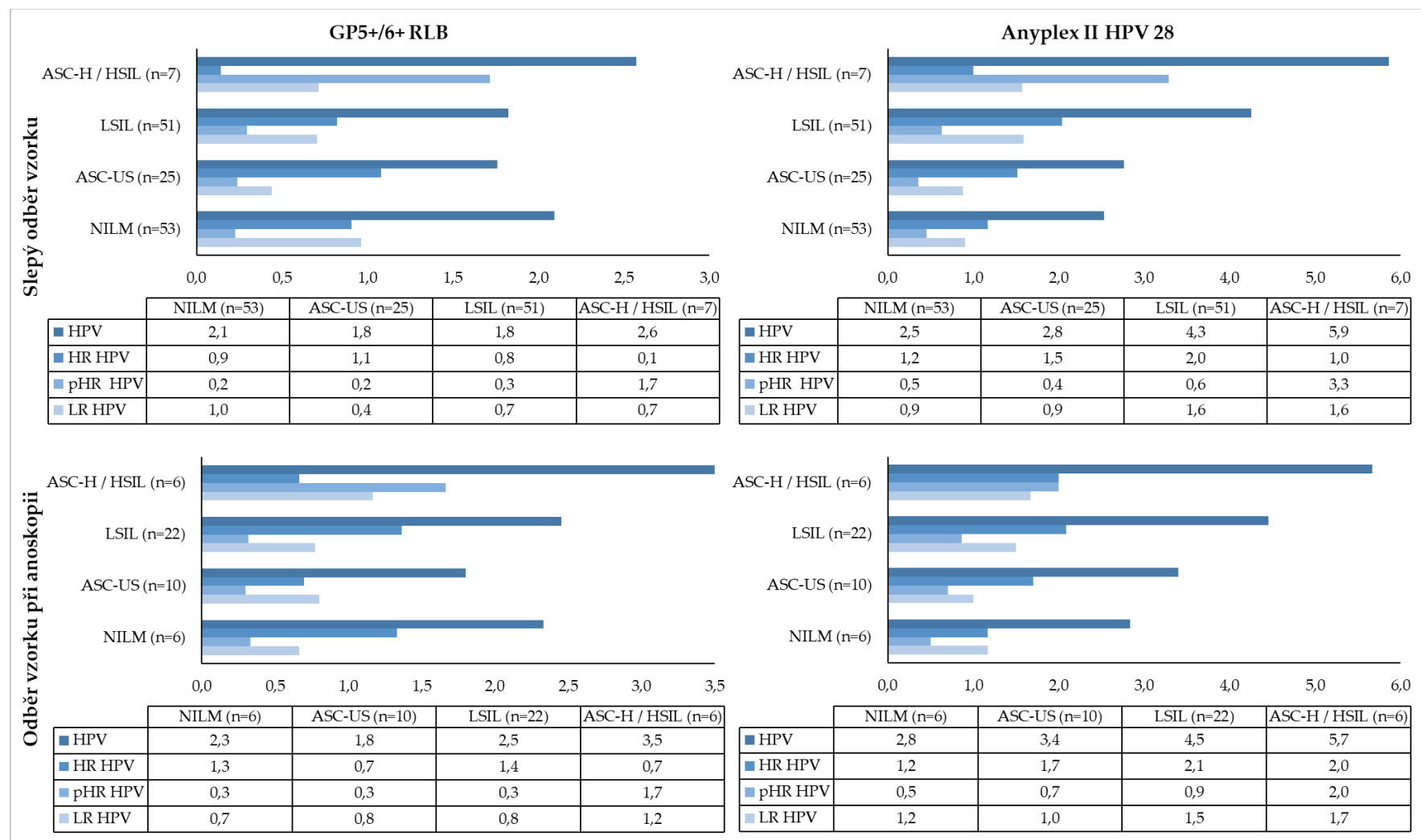
V Tabulce 7 je znázorněna prevalence jednotlivých 27 typů HPV detekovaných oběma metodami v závislosti na cytologickém nálezem. HPV typy jsou rozděleny do kategorií na LR HPV (zeleně), pHR HPV (žlutě) a HR HPV (červeně).

Tabulka 7 – Procentuální zastoupení pozitivních nálezů jednotlivých HPV typů detekovaných metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u různých cytologických nálezů slepě odebraných vzorků (n = 136) a vzorků odebraných při anoskopii (n = 44)

		6	11	40	42	43	44	54	61	26	53	66	70	73	82
RLB	NILM (n=53)	23%	21%	9%	26%	8%	6%	2%	2%	0%	4%	6%	4%	2%	8%
	ASC-US (n=25)	16%	12%	0%	8%	0%	0%	4%	4%	0%	4%	0%	12%	4%	4%
	LSIL (n=51)	20%	12%	2%	12%	6%	10%	6%	4%	8%	6%	4%	10%	0%	2%
	ASC-H / HSIL (n=7)	14%	0%	0%	57%	0%	0%	0%	0%	0%	14%	0%	0%	0%	0%
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	68	
	NILM (n=53)	19%	9%	0%	6%	4%	2%	13%	8%	6%	11%	6%	6%	2%	
	ASC-US (n=25)	20%	8%	4%	8%	4%	8%	0%	8%	16%	20%	12%	0%	0%	
	LSIL (n=51)	14%	4%	0%	6%	2%	10%	8%	4%	4%	14%	2%	0%	16%	
	ASC-H / HSIL (n=7)	0%	0%	0%	0%	14%	29%	0%	14%	14%	29%	29%	29%	14%	
ANYPLEX		6	11	40	42	43	44	54	61	26	53	66	70	73	82
	NILM (n=53)	21%	9%	4%	23%	9%	6%	9%	9%	2%	13%	15%	6%	4%	6%
	ASC-US (n=25)	12%	12%	8%	24%	12%	4%	0%	16%	0%	4%	8%	4%	12%	8%
	LSIL (n=51)	35%	18%	8%	37%	14%	14%	14%	20%	0%	20%	16%	10%	8%	10%
	ASC-H / HSIL (n=7)	43%	43%	0%	29%	14%	14%	14%	0%	0%	29%	0%	29%	29%	14%
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	68	
	NILM (n=53)	25%	11%	11%	6%	0%	8%	2%	6%	9%	9%	9%	6%	15%	
	ASC-US (n=25)	16%	4%	8%	20%	12%	8%	12%	12%	16%	4%	12%	16%	12%	
	LSIL (n=51)	33%	18%	10%	18%	14%	16%	8%	8%	27%	14%	8%	6%	25%	
ASC-H / HSIL (n=7)	43%	29%	14%	14%	43%	29%	29%	14%	0%	29%	29%	29%	29%		

Přítomnost typů 16 a 18 pravděpodobně nesouvisí s cytologickým nálezem, jak vyplývá z grafů na Obrázku 20 a z Tabulky 7, která zároveň ukazuje, že ani přítomnost většiny ostatních HPV typů nesouvisí s cytologickým nálezem. U výsledků metody Anyplex je zvyšující se prevalence vybraných HPV typů se zhoršujícím se cytologickým výsledkem patrná u více HPV typů než u metody RLB, s jistotou se ale nedá potvrdit, zda přítomnost jednotlivých typů má vliv na cytologický nález.

Na Obrázku 21 je zobrazen průměrný počet detekovaných HR, pHR a LR HPV typů na základě cytologického nálezu pro obě metody i pro oba způsoby odběru vzorku. V tabulkách pod jednotlivými grafy je uveden průměrný počet detekovaných typů. Do grafu jsou zahrnuty pouze vzorky, u kterých se podařilo určit cytologický nález a provést genotypizaci oběma metodami, konkrétně tedy 136 vzorků odebraných při slepém odběru a 44 vzorků odebraných při anoskopii.



Obrázek 21 – Průměrný počet detekovaných HR, pHR a LR HPV typů metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u různých cytologických nálezů slepě odebraných vzorků (n = 136) a vzorků odebraných při anoskopii (n = 44)

Z výsledků na Obrázku 21 vyplývá, že s rostoucím průměrným počtem detekovaných HPV typů se zhoršuje cytologický nálezn. Počet detekovaných HR HPV typů nesouvisí se zhoršujícím se výsledkem cytologického vyšetření. Počet pHR HPV typů je vyšší u kategorie ASC-H / HSIL než u méně vážných cytologických nálezů, ale tato data jsou ovlivněna malým počtem vzorků v této kategorii, tudíž se z toho nedá vyvozovat žádný závěr.

V Tabulce 8 jsou uvedeny parametry pro výpočet a samotné hodnoty senzitivity, specifity, PPV a NPV pro metody RLB a Anyplex, kdy jsou různě definované podmínky pozitivního nález. Tyto parametry byly vypočteny dle vzorců (2), (3), (4) a (5).

Co se týká cytologie, za pozitivní nálezn jsou v první části tabulky považovány všechny nálezn kromě NILM a v druhé části pouze kategorie ASC-H a HSIL, které jsou brány jako velmi rizikové. Co se týká molekulárně-biologického vyšetření, tabulka je rozdělena do tří částí. V první části je uvažována HPV pozitiva/negativita obecně, druhá část je zaměřena pouze na HR HPV typy a třetí část na nejrizikovější typy 16 a 18.

V Tabulce 8 jsou zpracovány pouze výsledky ze slepých odběrů vzorků. Vypočtené hodnoty senzitivity, specifity, PPV a NPV pro metody RLB a Anyplex na základě výsledků vzorků odebraných při anoskopii byly obdobné.

Tabulka 8 – Senzitivita, specificita a prediktivní hodnota pozitivního a negativního testu pro metody RLB 6P5+/6+ a Anyplex II HPV 28 za různě definovaných podmínek

	GP5+/6+ RLB		Anyplex II HPV 28		GP5+/6+ RLB		Anyplex II HPV 28	
	ACS-US LSIL ASC-H HSIL	NILM	ACS-US LSIL ASC-H HSIL	NILM	ASC-H HSIL	NILM ACS-US LSIL	ASC-H HSIL	NILM ACS-US LSIL
HPV pozitivní	74	50	78	48	7	117	7	119
HPV negativní	9	3	5	5	0	12	0	10
senzitivita	89%		94%		100%		100%	
specificita	6%		9%		9%		8%	
prediktivní hodnota pozitivního testu (PPV)	60%		62%		6%		6%	
prediktivní hodnota negativního testu (NPV)	25%		50%		100%		100%	
	ACS-US LSIL ASC-H HSIL	NILM	ACS-US LSIL ASC-H HSIL	NILM	ASC-H HSIL	NILM ACS-US LSIL	ASC-H HSIL	NILM ACS-US LSIL
HR HPV pozitivní	52	33	66	34	6	79	7	93
HR HPV negativní	31	20	17	19	1	50	0	36
senzitivita	63%		80%		86%		100%	
specificita	38%		36%		39%		28%	
prediktivní hodnota pozitivního testu (PPV)	61%		66%		7%		7%	
prediktivní hodnota negativního testu (NPV)	39%		53%		98%		100%	
	ACS-US LSIL ASC-H HSIL	NILM	ACS-US LSIL ASC-H HSIL	NILM	ASC-H HSIL	NILM ACS-US LSIL	ASC-H HSIL	NILM ACS-US LSIL
HPV 16/18 pozitivní	16	14	31	16	0	30	4	43
HPV 16/18 negativní	67	39	52	37	7	99	3	86
senzitivita	19%		37%		0%		57%	
specificita	74%		70%		77%		67%	
prediktivní hodnota pozitivního testu (PPV)	53%		66%		0%		9%	
prediktivní hodnota negativního testu (NPV)	37%		42%		93%		97%	

Z první části Tabulky 8, kde je jako pozitivní nález uvažována přítomnost jakéhokoliv HPV typu a rizikové cytologické nálezy ASC-H a HSIL, je zřejmé, že senzitivita testů byla velmi vysoká. To znamená, že v případě pozitivního cytologického nálezu, je velká pravděpodobnost, že bude pozitivní i HPV test. Specificita byla naopak velmi nízká. Z toho vyplývá, že pokud bude vzorek

hodnocen jako normální, i přes to u něho bude možné detekovat HPV typy. Vzhledem k tomu, že jsou zde uvažovány všechny HPV typy včetně nízkorizikových, které nejsou zodpovědné za cytologické abnormality, dá se tento fakt očekávat. Hodnota PPV byla v tomto případě velmi nízká, což znamená, že je velmi malá pravděpodobnost toho, že osoba, u které se prokáže přítomnost jakéhokoliv HPV typu, bude mít rizikový výsledek cytologie. To opět může souviset se zahrnutím všech HPV typů do výpočtů těchto parametrů. Hodnota NPV byla 100 %, což znamená, že v případě negativního HPV testu nemá daná osoba s jistotou cytologický výsledek ASC-H nebo HSIL. V případě uvažování kategorií ASC-US, LSIL, ASC-H a HSIL jako pozitivních, jsou výsledky o něco horší. Zvýší se sice PPV, ale ostatní hodnoty poklesnou.

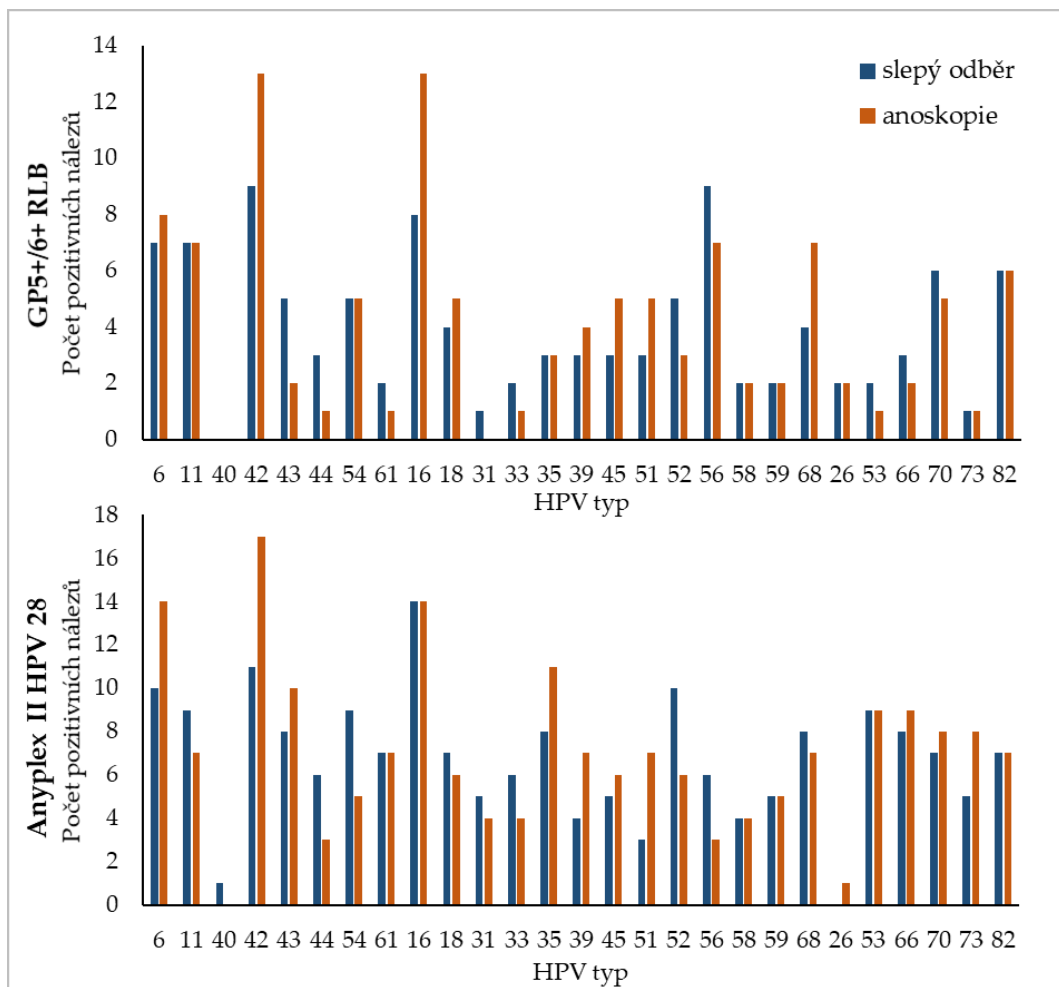
Pokud je jako pozitivní nález uvažována přítomnost HR HPV typů, výsledky jsou velmi obdobné jako v případě uvažování všech HPV typů. Oproti předchozímu vychází lépe specifita, ale pořád jsou to velmi nízké hodnoty. Při uvažování pouze kategorií ASC-H a HSIL jako rizikových byla senzitivita 86 % pro metodu RLB a 100 % pro metodu Anyplex. Specifita byla 39 %, resp. 28 %.

Ve chvíli, kdy jsou jako pozitivní uvažovány pouze HPV typy 16 a/nebo 18, jsou výsledky nejhorší. U slepých vzorků je senzitivita 0 % pro metodu RLB a 57 % pro metodu Anyplex, specifita je 77 %, resp. 67 %. Z těchto výsledků je zřejmé, že detekce HPV by neměla být zaměřena pouze na HPV typy 16 a 18, ale na více HPV typů z kategorie vysoce rizikových.

Z těchto dat vyplývá, že z výsledků detekce HPV typů není možné určit, zda se bude jednat o normální cytologický nález nebo budou přítomny mírné abnormality, tedy nález ASC-US či LSIL. V případě absence HR HPV typů je však velmi velká pravděpodobnost (98 – 100 %), že výsledek cytologie nebude rizikový, tedy, že se nebude jednat o nález ASC-H nebo HSIL. Metoda Anyplex

má větší senzitivitu než metoda RLB a metoda RLB má naopak větší specificitu než metoda Anyplex. Rozdíly mezi těmito hodnotami u obou metod jsou však většinou minimální.

Na Obrázku 22 je zobrazen počet pozitivních nálezů HPV typů v análních stěrech podle způsobu odebrání vzorku. Do grafů jsou zařazeny pouze výsledky 49 pacientů, u jejichž vzorků byla provedena genotypizace jak u slepého odběru vzorku, tak u vzorku odebraného při anoskopii.



Obrázek 22 – Počet pozitivních nálezů HPV typů v análních stěrech 49 pacientů podle způsobu odebrání vzorku (modře slepý odběr, oranžově odběr při anoskopii) stanovených metodou RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28

Z grafů na Obrázku 22 se nedá potvrdit, že je anoskopie lepší v porovnání se slepým odběrem. Někdy byly vybrané HPV typy vícekrát detekovány u vzorků

odebraných při anoskopii a někdy u slepě odebraných vzorků a obě situace se vyskytovaly zhruba stejně často. U metody RLB byly problematické zejména typy 42, 16, 45 a 68, které byly detekovány v anoskopických stěrech bez předchozí detekce ve slepém stěru a typ 43, který byl naopak detekován pouze ve slepých odběrech a následně nebyl potvrzen v odběrech anoskopických. U metody Anyplex byly problematické typy 6, 42, 73, 35, 39 a 51, které byly několikrát detekovány pouze v anoskopickém odběru a typy 44, 54 a 52, které naopak byly často detekovány pouze ve slepých stěrech. Celková shoda mezi detekovanými typy u slepého a anoskopického vzorku byla 93 % u metody RLB a 89 % u metody Anyplex.

V Tabulce 11 je zobrazena situace, jak by vypadaly výsledky této bakalářské práce v případě proočkovanosti sledované skupiny 150 HIV pozitivních MSM vakcínami dostupnými na českém trhu. Do tabulky je zahrnuto všech 41 HPV typů, které byly v rámci této práce detekovány metodou RLB, metodou Anyplex nebo následnou sekvenací.

Tabulka 9 – Počet a procentuální zastoupení pozitivních vzorků a průměrný počet detekovaných typů na vzorek v souvislosti s možným proočkováním sledované skupiny 150 pacientů

	HPV celkem	HR HPV	LR HPV	pHR HPV
	současné výsledky			
počet pozitivních vzorků	146	113	113	91
procentuální zastoupení pozitivních vzorků	97%	75%	75%	61%
průměrný počet detekovaných typů na vzorek	3,8	1,5	1,4	0,9
	výsledky v případě proočkovanosti vakcínou Cervarix			
počet pozitivních vzorků	144	95	113	91
procentuální zastoupení pozitivních vzorků	96%	63%	75%	61%
průměrný počet detekovaných typů na vzorek	3,5	1,2	1,4	0,9
	výsledky v případě proočkovanosti vakcínou Gardasil			
počet pozitivních vzorků	139	95	100	91
procentuální zastoupení pozitivních vzorků	93%	63%	67%	61%
průměrný počet detekovaných typů na vzorek	3,0	1,2	1,0	0,9
	výsledky v případě proočkovanosti vakcínou Gardasil 9			
počet pozitivních vzorků	130	59	100	91
procentuální zastoupení pozitivních vzorků	87%	39%	67%	61%
průměrný počet detekovaných typů na vzorek	2,4	0,5	1,0	0,9

Kdyby byli všichni pacienti ze studie v doporučeném období naočkováni, vzrostl by ve studii počet pacientů, u kterých by nebyl detekován žádný ze 41 sledovaných HPV typů. Ve studii jsou pouze 3 % pacientů ze 150 sledovaných s negativním nálezem HPV typů. V případě proočkovanosti vakcínou Cervarix by se jednalo o 4 %, vakcínou Gardasil o 7 % a vakcínou Gardasil 9 o 13 % negativních nálezů, jak vychází z Tabulky 11. Velký rozdíl je patrný u HR HPV typů, které byly detekovány v 75 % vzorků, ale kdyby byli pacienti proočkováni vakcínou Gardasil 9, potýkalo by se nyní s infekcí HR HPV typy jen 39 % pacientů z celkového počtu. Z tabulky je dále patrný úbytek průměrného počtu detekovaných typů na vzorek v případě proočkování pacientů, a to zejména u HR HPV typů.

6 DISKUZE

V této kapitole jsou diskutovány výsledky 150 pacientů z rizikové skupiny HIV pozitivních MSM, kterým byly odebrány vzorky z análního kanálu. U vzorků bylo provedeno cytologické vyšetření a detekce HPV pomocí dvou molekulárně biologických metod – GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28. Dále byly porovnány výsledky cytologického vyšetření a detekce HPV u vzorků získaných stěrem z análního kanálu naslepo a pod anoskopem.

V metaanalýze De Vuysta z roku 2009 obsahující výsledky análního stěru od 1280 pacientů z Asie, Evropy a Severní Ameriky, z nichž 805 patří do skupiny HIV pozitivních MSM, byly sledovány HPV typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 6 a 11 a studie dospěla k závěrům, že u skupin ASC-US a LSIL byly nejčastěji detekovány typy 16, 6, 18 a 11 a u skupin ASC-H a HSIL typy 16, 18, 33 a 58. Pokud by byly brány v potaz pouze vyjmenované typy, byly by v bakalářské práci u slepě odebraných vzorků nejčastěji detekované typy 6, 16, 56 a 11 metodou RLB a 16, 6, 68 a 52 metodou Anyplex. Výsledky metastudie a bakalářské práce se shodují pouze v časté detekci HPV typu 16, ale vzhledem k rozdílnému souboru pacientů nelze tato data srovnávat, protože ve zmiňované studii patřilo ze sledované skupiny pouze 63 % mezi HIV pozitivní MSM [57].

Ve stejné metastudii je dále uvedeno, že prevalence HPV typů byla 92,7 % u análních cytologických nálezů ASC-US, LSIL, ASC-H a HSIL dohromady, což odpovídá výsledku z bakalářské práce, kde, jak je uvedeno v grafu na Obrázku 20, byla prevalence HPV mezi 86 – 100 %. Ve studii od Burgose z roku 2017 byla u 606 HIV pozitivních MSM prevalence sledovaných HPV typů (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85, and 89) v análních stěrech 92,6 %, což je srovnatelné s výsledkem bakalářské práce [57, 58].

V metaanalýze od Lina publikované v roce 2017 obsahující výsledky 95 studií probíhajících v letech 1992 – 2017 po celém světě, bylo zjištěno, že prevalence HPV typu 16 stoupá se zhoršujícím se cytologickým nálezem HIV pozitivních mužů, kterých bylo ve studii 7579. Dále byla sledována souvislost prevalence HPV typů 18 resp. 31, 33, 45, 52 a 58 s cytologickým nálezem na 7560 resp. 3241 HIV pozitivních mužích. U všech těchto HPV typů byla prokázána zvyšující se prevalence se zhoršujícím se cytologickým nálezem, ale u karcinomu anu poklesla zhruba na úroveň normálního nálezu. Tento fakt nelze porovnat s výsledky bakalářské práce, protože ve výsledcích určených pro bakalářskou práci nebyl žádný pacient s diagnostikovaným karcinomem anu. Počet pozitivních nálezů HPV typu 16 rostl se zhoršujícím se cytologickým výsledkem i v metaanalýze od Marra z roku 2019 hodnotící výsledky 73 studií převážně z Evropy a Severní Ameriky věnujících se analýze análních stěrů od 12 758 HIV pozitivních MSM. Po rozdělení těchto pacientů dle cytologického vyšetření, byla prevalence HPV typu 16 u kategorie NILM 22 %, u kategorií ASC-US nebo LSIL 35 % a u kategorií ASC-H nebo HSIL 49 %. Výsledky tedy nejsou srovnatelné s výsledky bakalářské práce, protože v ní nebyla sledována zvyšující se prevalence HPV typu 16, 18, 31, 33, 45 ani 52, jak je patrné z Tabulky 7. U HPV typu 58 je patrný nárůst u cytologických nálezů ASC-H / HSIL, ale to může být ovlivněno malým počtem vzorků v těchto kategoriích [29, 59].

Z výsledků metody Anyplex vyplývá, že více jak polovina pacientů bez ohledu na cytologický nálezu byla infikována 3 a více HPV typy současně. Dva a více HPV typy byly detekovány u 74 % slepě odebraných vzorků a u 82 % anoskopických vzorků. V již zmiňované metaanalýze De Vuysta z roku 2009 se uvádí, že multiplicitní infekce byly zaznamenány u 65,9 % vzorků z celkového počtu 208 vzorků odebraných HIV pozitivním osobám s análním cytologickým výsledkem ASC-H nebo HSIL. Nutno zmínit, že ve studii nebyly odděleně hodnoceny vzorky mužů a žen, a navíc bylo pracováno pouze s typy 16, 18, 31,

33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 6 a 11. Pokud by byl sledován větší počet HPV typů, bylo by pravděpodobně více pozitivních vzorků s multiplicitními infekcemi a výsledky by tak byly srovnatelné s výsledky bakalářské práce [57].

V metaanalýze Clarka z roku 2018 zahrnující 8 studií s výsledky 671 pacientů z kategorie HIV pozitivních MSM s cytologickým výsledkem ACS-H a horším při uvažování přítomnosti HR HPV typů jakožto pozitivního nálezu vyšla senzitivita testů 95,4 % a specifická 23,8 % při využití více různých detekčních metod. Tyto výsledky jsou tedy srovnatelné s výsledky bakalářské práce. Ve studii od Burgose z roku 2017 sledující 692 HIV pozitivních MSM pacientů při sledování přítomnosti vybraných HPV typů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82) jakožto pozitivního výsledku vyšla senzitivita 90,9 % a specifická 24,4 % pro detekování kategorií ASC-H a HSIL ve stěru z análního kanálu při použití komerčního kitu CLART Genomica HPV2. Výsledky jsou opět velmi podobné těm z bakalářské práce. Tyto výsledky dále potvrzují fakt, že metody určené pro detekci HR HPV mají vysokou senzitivitu, ale nízkou specifickou. Proto by je bylo v uvažovaném screeningovém programu vhodné kombinovat např. se specifickějším cytologickým vyšetřením [23, 58].

Při hodnocení HPV typů 16 a/nebo 18 jakožto pozitivního nálezu v již zmiňované metaanalýze 5 studií od Clarka z roku 2018, tedy celkem 510 vzorků HIV pozitivních MSM s cytologickým nálezem ASC-H a horším vyšla senzitivita 39,9 % a specifická 74,3 %. Ve studii od Burgose z roku 2017 obsahující výsledky z vyšetření análních stěrů 691 HIV pozitivních MSM při zahrnutí HPV typů 16 a/nebo 18 vyšla senzitivita testu 56 % a specifická 63 %. Výsledky těchto studií jsou tedy velmi podobné s výsledky bakalářské práce. Metody zaměřené pouze na detekci HPV 16 a/nebo 18 jsou sice více specifické ale méně citlivé než ty zaměřené na všechny HR HPV typy. Do možného screeningového programu by

tedy bylo vhodnější zahrnout detekci více HR HPV typů a neomezovat se pouze na typy 16 a 18 [23, 58].

Pro zvýšení specifity vyšetření by bylo vhodné v budoucnu ověřit i jiné metody, například detekci mRNA, tedy aktivní infekce, nebo testy založené na detekci methylace vybraných genů. Tato vyšetření lze provést z již dříve odebraného vzorku z análního kanálu do LBC média, protože, jak bylo zmíněno, vzorek je při uchování v tomto médiu možné skladovat až 6 týdnů.

Výsledky bakalářské práce mohou být zkresleny tím, že pro analýzy oběma metodami byly odebírány pouze alikvóty vzorků. V případě, kdy by vzorek před alikvotací nebyl dostatečně promíchán, nebyly by analyzované vzorky homogenní a výsledky genotypizace by se tak mohly v důsledku toho lišit.

Dalším faktem je, že rozložení cytologických nálezů pacientů nebylo rovnoměrné, což se však dalo očekávat. Nejedná se o nic neobvyklého, se stejným problémem se potýkala i metaanalýza od Lina z roku 2017, která obsahuje data z 95 studií probíhajících v letech 1992 – 2017 po celém světě. V této studii byly hodnoceny výsledky cytologického stěru z anu od 12 850 mužů. U 12 % z nich byl potvrzen nálezh ASC-H nebo HSIL a u 8 % z nich byl diagnostikován karcinom anu. Co se týká přímo vzorků HIV pozitivních MSM, těch bylo ve studii 7807 a 14 % z nich patřily do kategorie ASC-H / HSIL a pouze u 0,2 % byl diagnostikován karcinom anu. Data v bakalářské práci jsou tak v souladu s touto studií. Podobné výsledky jsou i ve studii od Burgoše z roku 2017, kde jsou uvedena data z let 2009 – 2016 od 692 HIV pozitivních MSM. V tomto případě bylo po vyšetření análního stěru rozložení jednotlivých cytologických nálezů následující: NILM – 39 %, ASC-US – 27 %, LSIL – 30 % ASC-H / HSIL – 4 %. Stejně jako v případě bakalářské práce nebyl u žádného pacienta diagnostikován

karcinom anu a celkově je rozložení jednotlivých cytologických nálezů velmi podobné [29, 58].

Větším problémem je fakt, že u poměrně velkého souboru vzorků nebylo možné odečíst cytologický nález (u 16 % z původních 186 vzorků) nebo provést detekci HPV metodou RLB (u 13 % z původních 186 vzorků) či Anyplex (u 9 % z původních 186 vzorků). Je to pravděpodobně způsobeno špatně odebraným vzorkem. To svědčí o nutnosti volby vhodných odběrových sad, proškolení zdravotnického personálu a validace zvolených postupů pro daná laboratorní vyšetření.

7 ZÁVĚR

V rámci této práce byly porovnány dvě molekulárně biologické metody pro detekci HPV DNA – GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28. Výhodou RLB je, že lze současně sledovat přítomnost až 43 libovolných HPV typů. Naopak nevýhodou je poměrně složitý a zdlouhavý proces analýzy vyžadující několik mezikroků. Výhodou metody Anyplex je automatizace, díky které nejsou na obsluhující personál kladeny tak velké nároky na zkušenosti jako u analýzy vzorků a následném vyhodnocování výsledků při použití metody RLB. Metoda Anyplex nedokáže detekovat tolik HPV typů jako RLB, ale v rámci této práce bylo zjištěno, že typy, které jsou obsaženy navíc v metodě RLB, se ve vzorcích vyskytovaly pouze ojediněle, a kromě toho šlo převážně o LR HPV typy, které nejsou pro screening karcinomu anu podstatné. Anyplex je vhodnější metodou pro detekci vzorků s multiplicitními infekcemi HPV, protože se ukázalo, že metoda RLB v případě výskytu více HPV typů současně, nedokáže detekovat tolik typů jako metoda Anyplex. Vzhledem k vyjmenovaným skutečnostem se Anyplex jeví jako vhodnější, ale pro uvažovaný screening by mohly být využity obě metody, protože celková genotypově specifická shoda mezi nimi byla 92 %.

Dále bylo zjištěno, že samotná detekce HPV DNA nestačí k určení rizikových skupin pacientů a do uvažovaného screeningu bude pravděpodobně nutné zavést i další triážové testy, např. testy založené na detekci aktivní infekce nebo methylace vybraných genů.

Na základě cytologických výsledků bylo potvrzeno, že odběr vzorku při anoskopii je specifitější než slepý odběr. Anoskopie by měla být pacientům minimálně doporučována místo slepého odběru. Důraz by měl kladen i na prevenci, protože jak vyplývá z prezentovaných dat, v případě proočkovanosti této skupiny vakcínou Gardasil 9, bylo by ve studii o 36 % pacientů s HR HPV infekcí méně a lze předpokládat, že by se snížil i počet pacientů s análními neopláziemi a následně karcinomem anu.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ACS-H = atypické skvamózní buňky, které nevylučují přítomnost HSIL
- ACS-US = atypické dlaždicové buňky nejasného významu
- AIN = anální intraepiteliální neoplázie
- AK = anální karcinom
- CIN = cervikální intraepiteliální neoplázie
- DARE = digitální análně-rektální vyšetření
- DNA = deoxyribonukleová kyselina
- FDA = Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
- HIV = virus lidské imunitní nedostatečnosti
- HPV = lidský papilomavirus
- HR HPV = vysoce rizikový typ lidského papilomaviru
- HRP = křenová peroxidáza
- HSIL = vysoký stupeň skvamózní intraepiteliální neoplázie
- IARC = Mezinárodní agentura pro výzkum karcinomů
- IgG = imunoglobulin G
- LBC = cytologie do tekutého média
- LCR = dlouhá kontrolní oblast
- LR HPV = nízké rizikový typ lidského papilomaviru
- LSIL = nízký stupeň skvamózní intraepiteliální léze
- mRNA = mediátorová ribonukleová kyselina
- MSM = muži mající sex s muži
- NASBA = izotermální amplifikace RNA
- NILM = dlaždicová buňka bez intraepiteliálních změn a malignity
- NPV = prediktivní hodnota negativního testu
- NRL = národní referenční laboratoř
- PAE = místo časně polyadenylace
- PAL = místo pozdní polyadenylace
- PE = časný promotor
- pHR HPV = pravděpodobně vysoce rizikový typ lidského papilomaviru
- PL = pozdní promotor
- PCR = polymerázová řetězová reakce
- PPV = prediktivní hodnota pozitivního testu
- RLB = reverzní hybridizace
- USA = Spojené státy americké
- VLP = viru podobná částice

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Doorbar, J. a kol. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 2015. **25**(1), s. 2-23. ISSN: 1052-9276.
2. Doorbar, J. a kol. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 2012. **30**(5), s. 55-70. ISSN: 0264-410X.
3. Drlák, D. a Sehnal, B. Význam infekcí způsobených lidskými papilomaviry. *Časopis lékařů českých*, 2013. **152**(1), s. 15-19. ISSN: 1805-4420.
4. Hamborsky, J. a kol. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Washington D.C.: Public Health Foundation, 2015. ISBN: 978-0-9904491-1-9.
5. Mejilla, A. a kol. Human papilloma virus (HPV) vaccination: Questions and answers. *Canadian pharmacists journal*, 2017. **150**(5), s. 306-315. ISSN: 1715-1635.
6. Accardi, R. a Gheit, T. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Medicale*, 2014. **43**(12), s. 435-43. ISSN: 0755-4982.
7. Chin-Hong, P.V. a kol. Human papillomavirus infection in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *The Journal of Clinical and Translational Research*, 2019. **33**(9). ISSN: 0902-0063.
8. Mammas, I. a kol. Human papilloma virus (HPV) infection in children and adolescents. *European journal of pediatrics*, 2009. **168**, s. 267-273.
9. Wang, C.-C.J. a kol. Human Immunodeficiency Virus/AIDS, Human Papillomavirus, and Anal Cancer. *Surgical oncology clinics of North America*, 2017. **26**(1), s. 17-31. ISSN: 1055-3207.
10. Poljak, M. a Kocjan, B.J. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2010. **8**(10), s. 1139-1162. ISSN: 1478-7210.
11. Chrysostomou, A.C. a kol. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses*, 2018. **10**(12), s. 729. ISSN: 1999-4915.
12. Lorincz, A.T. a kol. Methylation of HPV and a tumor suppressor gene reveals anal cancer and precursor lesions. *Oncotarget*, 2017. **8**(31), s. 50510-50520. ISSN: 1949-2553.
13. Bouvard, V. a kol. A review of human carcinogens; Part B: biological agents. *The Lancet Oncology*, 2009. **10**(4), s. 321-322. ISSN: 1470-2045.
14. Golusiński, W. a kol. *HPV Infection in Head and Neck Cancer*. 2017. ISBN: 978-3-319-43578-7.
15. Jaworek, H. *Lidský papilomavirus a jeho význam pro diagnosticko-léčebnou rozvahu*. Olomouc, 2019. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta. Dostupné z: <https://theses.cz/id/9q3g06/>
16. *Harald zur Hausen - Facts. The Nobel Prize* [online]. 2020 [cit. 7. 3. 2020]. Dostupné z: <https://nobelprize.org/prizes/medicine/2008/hausen/facts/>

17. Wen, Y. a kol. Knowledge of human papillomavirus (HPV) infection, cervical cancer, and HPV vaccine and its correlates among medical students in Southwest China: a multi-center cross-sectional survey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014. **15**(14), s. 5773-5779. ISSN: 1513-7368.
18. Sias, C. a kol. Alpha, Beta, gamma human PapillomaViruses (HPV) detection with a different sets of primers in oropharyngeal swabs, anal and cervical samples. *Virology journal*, 2019. **16**(1), s. 27. ISSN: 1743-422X.
19. Snellenberg, S. a kol. Development of a multiplex methylation-specific PCR as candidate triage test for women with an HPV-positive cervical scrape. *BMC Cancer*, 2012. **12**, s. 551. ISSN: 1471-2407.
20. Dušek, L. a kol. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*. Masarykova univerzita, 2007 [cit. 11. 2. 2020]. Dostupné z: <http://svod.cz>
21. Hickman, R.A. a kol. A rare case of anal carcinosarcoma with human papilloma virus infection in both biphasic tumor elements: An immunohistochemical, molecular and ultrastructural study. *Papillomavirus Research*, 2016. **2**, s. 164-166. ISSN: 2405-8521.
22. Darragh, T.M. a Winkler, B. Anal cancer and cervical cancer screening: key differences. *Cancer Cytopathology*, 2011. **119**(1), s. 5-19. ISSN: 1934-662x.
23. Clarke, M.A. a Wentzensen, N. Strategies for screening and early detection of anal cancers: A narrative and systematic review and meta-analysis of cytology, HPV testing, and other biomarkers. *Cancer Cytopathology*, 2018. **126**(7), s. 447-460. ISSN: 1934-662x.
24. Heraclio, S.A. a kol. Anal prevalence of HPV in women with pre-malignant lesion or cancer in the cervix and anal canal simultaneously: cross-sectional study. *The International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2019. **147**(2), s. 225-232. ISSN: 0020-7292.
25. Zhang, J. a kol. DNA methylation in anal intraepithelial lesions and anal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(18), s. 6544-6549. ISSN: 1078-0432.
26. Hernandez, J.M. a kol. DNA methylation profiling across the spectrum of HPV-associated anal squamous neoplasia. *PloS ONE*, 2012. **7**(11), s. 50533. ISSN: 1932-6203.
27. Parisi, S.G. a Basso, M. Oral and anal high-risk human papilloma virus infection in HIV-positive men who have sex with men over a 24-month longitudinal study: complexity and vaccine implications. *BMC Public Health*, 2019. **19**(1), s. 645. ISSN: 1471-2458.
28. Nielsen, A. a kol. Trends in incidence of anal cancer and high-grade anal intraepithelial neoplasia in Denmark, 1978-2008. *The International Journal of Cancer*, 2012. **130**(5), s. 1168-1173. ISSN: 0020-7136.
29. Lin, C. a kol. Human papillomavirus types from infection to cancer in the anus, according to sex and HIV status: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2017. **18**(2), s. 198-206. ISSN: 1473-3099.

30. Silverberg, M.J. a kol. Risk of anal cancer in HIV-infected and HIV-uninfected individuals in North America. *Journal of Clinical Infectious Diseases & Practice*, 2012. **54**(7), s. 1026-1034. ISSN: 1058-4838.
31. Příbalový leták. Cervarix [online]. 2020 [cit. 19. 1. 2020]. Dostupné z: <https://pribalovy-letak.info/cervarix>
32. Příbalový leták. Gardasil 9 [online]. 2020 [cit. 19. 1. 2020]. Dostupné z: <https://pribalovy-letak.info/gardasil-9>
33. Příbalový leták. Gardasil [online]. 2020 [cit. 19. 1. 2020]. Dostupné z: <https://pribalovy-letak.info/gardasil>
34. Příbalový leták. Silgard [online]. 2020 [cit. 19. 1. 2020]. Dostupné z: <https://pribalovy-letak.info/silgard>
35. *Zákony pro lidi. Zákon č. 48/1997 Sb. Zákon o veřejném zdravotním pojištění a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů* [online]. 2010 - 2020 [cit. 19. 1. 2020]. Dostupné z: <https://zakonyprolidi.cz/cs/1997-48>
36. *Zákony pro lidi. Vyhláška č. 70/2012 Sb. Vyhláška o preventivních prohlídkách* [online]. 2010 - 2020 [cit. 19. 1. 2020]. Dostupné z: <https://zakonyprolidi.cz/cs/2012-70>
37. Kritéria a podmínky programu pro screening karcinomu děložního hrdla v ČR. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky* [online]. 7. 2007 [cit. 20. 2. 2020]. Dostupné z: https://mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik_3621_1772_11.html
38. Arbyn, M. a kol. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. *International Agency for Research on Cancer* [online]. 2008 [cit. 20. 2. 2020]. ISSN: 978-92-79-07698-5. Dostupné z: https://screening.iarc.fr/doc/ND7007117ENC_002.pdf
39. Čepický, P. a kol. *Kapitoly z diferenciální diagnostiky v gynekologii a porodnictví*. Vydání: 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2018. ISBN: 978-80-271-2346-9.
40. Herbert, A. *Cervikální cytologie*. 2015 [cit. 11. 2. 2020]. Dostupné z: <https://eurocytology.eu/cs/course/3>
41. Tachezy, R., Rob L. Skřínink pro prevenci karcinomu děložního hrdla v České republice. *Časopis lékařů českých*, 2007. **146**(12), s. 939-944. ISSN: 1805-4420.
42. Pernot, S. a kol. Comparison of anal cancer screening strategies including standard anoscopy, anal cytology, and HPV genotyping in HIV-positive men who have sex with men. *British Journal of Cancer*, 2018. **119**(3), s. 381-386. ISSN: 1532-1827.
43. de Roda Husman, A.M. a kol. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 1995. **76** (4), s. 1057-62. ISSN: 0022-1317.
44. Anttila, A. a kol. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. [online]. 2015 [cit. ISSN: 978-92-79-48538-1].

45. Arbyn, M. a kol. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clinical Microbiology and Infection*, 2015. **21**(9), s. 817-26. ISSN: 1198-743x.
46. van den Brule, A.J. a kol. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002. **40**(3), s. 779-87. ISSN: 0095-1137.
47. Jacobs, M.V. a kol. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. **35**(3), s. 791-795. ISSN: 0095-1137.
48. Le, H.H.L. a Bi, X. Low concordance of oral and genital HPV infection among male patients with sexually transmitted infections in Vietnam. 2019. **19**(1), s. 578. ISSN: 1471-2334.
49. *Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice*. 2nd edition. Geneva: World Health Organization, 2014 [cit. 18. 1. 2020]. Dostupné z: <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269619/>
50. Schmitt, M. a kol. Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5+ and GP6+ Primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. **46**(3), s. 1050.
51. Baasland, I. a kol. Clinical performance of Anyplex II HPV28 by human papillomavirus type and viral load in a referral population. *PloS ONE*, 2019. **14**(1). ISSN: 1932-6203.
52. Estrade, C. a Sahli, R. Comparison of Seegene Anyplex II HPV28 with the PGMY-CHUV assay for human papillomavirus genotyping. *Journal of clinical microbiology*, 2014. **52**(2), s. 607-612. ISSN: 0095-1137.
53. De Strooper, L.M. a kol. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prevention Research*, 2014. **7**(12), s. 1251-1257. ISSN: 1940-6215.
54. Hologic. *ThinPrep 2000 System: Instructions For Use*. 2017 [cit. 15. 3. 2020]. Dostupné z: https://hologic.com/sites/default/files/package-insert/MAN-02624-001_005_002.pdf
55. *pUC18 DNA Msp I Digest*. Sigma-Aldrich [online]. [cit. 23. 5. 2020]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d4797?lang=en®ion=CZ>
56. Jarkovský, J. *Matematická biologie. Senzitivita, specificita a prediktivní hodnoty* [online]. [cit. 30. 4. 2020]. Dostupné z: <https://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinickyh-a-biologickyh-dat--biostatistika-pro-matematickou-biologii--vztah-pravdepodobnosti-statistiky-a-biostatistiky--senzitivita-specificita-a-prediktivni-hodnoty>
57. De Vuyst, H. a kol. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina

and anus: a meta-analysis. *The International Journal of Cancer*, 2009. **124**(7), s. 1626-1636. ISSN: 0020-7136.

58. Burgos, J. a kol. The role of oncogenic human papillomavirus determination for diagnosis of high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected MSM. *Aids*, 2017. **31**(16), s. 2227-2233. ISSN: 0269-9370.

59. Marra, E. a kol. Type-Specific Anal Human Papillomavirus Prevalence Among Men, According to Sexual Preference and HIV Status: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases & Immune Therapies*, 2019. **219**(4), s. 590-598. ISSN: 0022-1899.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Typická organizace genomu Alfa, Mí a Beta HPV [1]	13
Obrázek 2 – Tvorba lézí v důsledku HPV infekce [1].....	14
Obrázek 3 – Počet výskytů zhoubného karcinomu anu a análního otvoru na 100 000 osob v České republice – vývoj v čase [20].....	19
Obrázek 4 – Počet výskytů zhoubného karcinomu anu a análního otvoru na 100 000 osob v České republice – časový vývoj incidence u žen a mužů [20]	19
Obrázek 5 – Počet případů zhoubného karcinomu anu a análního otvoru dle věkové kategorie osob v České republice z období let 1977 – 2017 [20].....	20
Obrázek 6 – Cytologické nálezy NILM, LSIL a HSIL získané ze stěru z análního kanálu a karcinom děložního čípku – zdroj: Bioptická laboratoř.....	26
Obrázek 7 – Odběrový kartáček Anex Brush.....	37
Obrázek 8 – Proces přenosu buněk z fixačního roztoku na mikroskopické sklíčko [54]	39
Obrázek 9 – Výsledek gelové elektroforézy – multiplexová PCR se směsí primerů GP5+/6+ specifickými pro HPV DNA.....	42
Obrázek 10 – Velikost jednotlivých fragmentů markeru pUC18/MspI [55]	43
Obrázek 11 – Schématický postup druhé fáze metody reverzní hybridizace..	45
Obrázek 12 – Výsledek reverzní hybridizace.....	46
Obrázek 13 – Postup odečítání výsledků reverzní hybridizace 1. krok	47
Obrázek 14 – Postup odečítání výsledků reverzní hybridizace 2. krok.....	47
Obrázek 15 – Postup odečítání výsledků reverzní hybridizace 3. krok.....	48
Obrázek 16 – Procentuální zastoupení shodných a neshodných výsledků cytologického nálezu 53 vzorků odebraných při slepém odběru a odběru při cílené anoskopii	56
Obrázek 17 – Počet pozitivních nálezů HPV typů v análních stěrech odebraných při slepém odběru (n = 150) a při anoskopii (n = 49) detekovaných metodami GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28.....	58

Obrázek 18 – Počet pozitivních nálezů HPV typů rozdělených podle rizikivosti (zeleně LR HPV, červeně HR HPV, žlutě pHR HPV) v análních stěrech odebraných při slepém odběru (n = 150) a při anoskopii (n = 49) detekovaných metodami GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28.....60

Obrázek 19 – Procentuální zastoupení vícenásobných infekcí HPV detekovaných metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 v análních stěrech odebraných 49 pacientům při slepém odběru a při anoskopii62

Obrázek 20 – Prevalence HPV typů celkově, HR HPV typů a HPV typů 16 a/nebo 18 detekovaných metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u různých cytologických nálezů slepě odebraných vzorků (n = 136) a vzorků odebraných při anoskopii (n = 44).....64

Obrázek 21 – Průměrný počet detekovaných HR, pHR a LR HPV typů metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u různých cytologických nálezů slepě odebraných vzorků (n = 136) a vzorků odebraných při anoskopii (n = 44)66

Obrázek 22 – Počet pozitivních nálezů HPV typů v análních stěrech 49 pacientů podle způsobu odebrání vzorku (modře slepý odběr, oranžově odběr při anoskopii) stanovených metodou RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28.....70

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Parametry potřebné pro výpočet senzitivity, specifity a prediktivních hodnot pozitivního a negativního testu [56]	50
Tabulka 2 – Charakteristika souboru 150 pacientů na základě výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření	52
Tabulka 3 – Charakteristika souboru 150 pacientů rozdělených dle různých cytologických nálezů na základě výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření – průměrné hodnoty sledovaných parametrů	52
Tabulka 4 – Charakteristika souboru 150 pacientů rozdělených dle počtu detekovaných HPV typů metodami GP5+/6+ RLB a Anyplex II HPV 28 u slepě odebraných vzorků na základě výsledků dotazníku a laboratorního vyšetření – průměrné hodnoty sledovaných parametrů	53
Tabulka 5 – Přehled výsledků cytologických vyšetření análního stěru 150 sledovaných pacientů.....	55
Tabulka 6 – Porovnání genotypově specifické detekce HPV typů u metod RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u slepého odběru vzorku (n = 150) a odběru při anoskopii (n = 49).....	61
Tabulka 7 – Procentuální zastoupení pozitivních nálezů jednotlivých HPV typů detekovaných metodami RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 u různých cytologických nálezů slepě odebraných vzorků (n = 136) a vzorků odebraných při anoskopii (n = 44).....	65
Tabulka 8 – Senzitivita, specifita a prediktivní hodnota pozitivního a negativního testu pro metody RLB GP5+/6+ a Anyplex II HPV 28 za různě definovaných podmínek	68
Tabulka 11 – Počet a procentuální zastoupení pozitivních vzorků a průměrný počet detekovaných typů na vzorek v souvislosti s možným proočkováním sledované skupiny 150 pacientů.....	71