



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Jana Cimická**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY VE  
VIROLOGII**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Švecová

PLZEŇ 2017

zde vložit místo této stránky zadání BP s razítkem

zde vložit místo této stránky zadání BP s razítkem

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3. 2016

.....

vlastnoruční podpis

## Poděkování

Děkuji RNDr. Janě Kašpírkové Ph.D za její čas, odborné konzultace, poskytnuté materiály a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále děkuji Biotické laboratoři s.r.o. za poskytnutí materiálu a prostoru pro vykonání praktického výzkumu.

# ANOTACE

Příjmení a jméno: Cimická Jana

Katedra: Teoretických oborů

Název práce: Molekulárně biologické metody ve virologii

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Švecová

Počet stran – číslované: 35

Počet stran – nečíslované: 21

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 22

Klíčová slova: Molekulární genetiky, HPV, karcinom děložního čípku, Hc2, APTIMA, PCR, hybridizace, screening

## Souhrn:

Tato bakalářská práce se věnuje porovnání dvou doporučených screeningových metod pro průkaz lidského papilomaviru, Hc2 a Aptima HPV Assay. V teoretické části je detailně rozepsán lidský papilomavirus (pro následné lepší pochopení principů metod) a molekulárně genetické metody, jimiž se prokazuje. Praktická část se věnuje vlastnímu stanovení HPV a jeho typu ve vzorcích s prokázaným vysokým stupněm cervikální léze. Tato studie prokázala, že obě metody mají srovnatelné výsledky průkazu HR-HPV typů ve vzorku. Neshodují se ale v genotypizačním stanovení, kde po ověření specifickými genotypizačními testy metoda Aptima HPV Genotyping 16, 18/45 poskytla ve 100 % správné hodnoty, kdežto Hc2 ukázala nízkou specifitu genotypizační sondy HPV 16/18/45 a správné výsledky poskytla jen z 84 %.

# ANNOTATION

Surname and name: Cimická Jana

Department: Theoretical Fields

Title of thesis: Molecular biology techniques in virology

Consultant: MUDr. Miroslava Švecová

Number of pages – numbered: 35

Number of pages – unnumbered: 21

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 22

Key words: Molecular genetic, HPV, cervical carcinoma, HC2, APTIMA, PCR, hybridization, screening

## Summary:

This thesis compares two recommended screening methods for detection human papillomavirus, Hc2 and Aptima HPV Assay. Theoretical part describes in detail human papillomavirus (for better understanding principles of methods) and molecular genetic methods for to prove them. Practical part deals with own detection of HPV and its type in samples with confirmed high-grade cervical lesion. This study has proven that both methods have comparable results for detection HR-HPV types in sample. But they disagree in genotyping determination where, after verification by genotypically specific tests method Aptima HPV genotyping 16, 18/45 gave 100 % correct values, while Hc2 has shown low specificity for genotyping probe HPV 16/18/45 and correct results has provided only in 84 %.



# OBSAH

ÚVOD .....	10
TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1 LIDSKÝ PAPILOMAVIRUS .....	11
1.1 Taxonomie .....	11
1.2 Rozdělení HPV podle onkologického potenciálu .....	12
1.3 Patogeneze .....	12
1.4 Genetika lidských papilomavirů .....	13
1.4.1 Stručný přehled funkce virových proteinů .....	14
1.4.2 Mechanismus působení onkoproteinů E6 a E7 u HR-HPV typů .....	14
1.5 Lidský papilomavirus a rakovina .....	15
1.5.1 Karcinom děložního čípku .....	16
2 SCREENINGOVÉ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY PRO PRŮKAZ HR-HPV TYPŮ .....	17
2.1 Hybrid Capture 2 HR-HPV DNA test (Qiagen) .....	18
2.2 Aptima HPV Assay .....	19
3 HPV GENOTYPIZAČNÍ TESTY .....	20
3.1 Polymerázová řetězová reakce .....	20
3.1.1 Multiplex PCR .....	21
3.1.2 PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery .....	22
3.1.3 Detekce PCR produktů .....	22
3.2 Hybridizační metody .....	22
3.2.1 In situ hybridizační HPV test .....	23
PRAKTICKÁ ČÁST .....	25
4 FORMULACE PROBLÉMU .....	25
4.1 Cíle výzkumu .....	25
5 STUDIJNÍ SKUPINA (MATERIÁL) .....	26
6 METODY VÝZKUMU .....	29
6.1 Digene Hybrid capture 2 HR-HPV DNA test (Qiagen) .....	29
6.2 Aptima HPV Assay .....	30
6.3 PCR pE6/E7 – HPV typy 16, 18, 45 .....	30
6.4 Linear array HPV genotyping test (Roche) .....	32

7	INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	35
7.1	HR-HPV Hybrid capture 2 .....	37
7.2	Genotypizační detekce HPV typů 16/18/45 Hybrid capture 2 .....	37
7.3	HR-HPV Aptima Assay .....	38
7.4	Genotypizační detekce HPV typů 16, 18/45 Aptima .....	38
7.5	Porovnání metod Hc2 a APTIMA na úrovni HR-HPV sondy .....	39
7.6	Porovnání metod Hc2 a APTIMA na úrovni genotypizační sondy 16/18/45... ..	39
7.7	Zjistění specifity stanovení metod Hc2 a APTIMA .....	40
7.7.1	Souhlasné vzorky – potvrzení typově specifickou multiplex PCR ....	40
7.7.2	Nesouhlasné vzorky – rozšířená genotypizace za použití metody Linear array .....	40
7.8	Celkové shrnutí .....	41
	DISKUSE .....	42
	ZÁVĚR .....	44
	POUŽITÁ LITERATURA .....	45
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	49
	SEZNAM TABULEK .....	50
	SEZNAM GRAFŮ .....	51
	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	52
	SEZNAM PŘÍLOH .....	53
	PŘÍLOHY .....	54

# ÚVOD

Tato bakalářská práce je zaměřená na metody molekulární genetiky s využitím pro virologii, konkrétně pro lidský papilomavirus (HPV).

HPV jsem si jako zástupce virů vybrala pro jeho schopnost karcinogeneze a vzrůstající počet incidence tohoto viru u mladých osob. Dlouhodobá infekce spolu s rizikovými faktory, jako je například rizikové sexuální chování nebo kouření, vede až ke vzniku nádorového onemocnění. Jelikož karcinom děložního čípku je druhým nejčastějším zhoubným nádorem u žen po celém světě, je třeba se věnovat screeningu, léčbě a možnostem monitorace onemocnění. Molekulárně genetické metody jsou pro tyto účely vhodné.

Hlavním tématem této práce je porovnání dvou nejvíce používaných screeningových metod. Tyto metody jsou velmi odlišné. První metoda Hybrid capture 2 je nejdéle používanou metodou ve screeningu vysoce rizikových HPV typů (HR-HPV) a je založená na průkazu DNA viru. Oproti ní stojí relativně mladá metoda APTIMA založená na průkazu mRNA onkogenních proteinů E6/E7 viru, které přímo ukazují na probíhající infekci.

Pomocí vysoce specifických genotypizačních testů chceme prozkoumat, jaký HR-HPV typ způsobuje rozdílné výsledky mezi metodami Hc2 a APTIMA. A která z těchto metod je tedy vhodnější pro přesný screening karcinomu děložního čípku.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 LIDSKÉ PAPILOMAVIRY

Lidské papilomaviry (dále jen HPV) jsou neobalené viry, s vysokou rezistencí k vlivům prostředí. Mají kubickou kapsidu o průměru 55 nm složenou ze 72 kapsomér tvořených kapsidovými proteiny L1 a L2. Obsahují cirkulární dvouvláknovou DNA, jejíž délka se pohybuje od 7400 do 8200 páru bazí. (Bednář, 1996; Fait, 2009)

Papilomaviry obecně infikují řadu obratlovců a člověk v tomto případě není výjimkou. Předpokládá se, že papilomaviry se vyvíjely spolu se svými hostiteli. Ovšem ve dnešním světle molekulárně-biologických metod „*se ukazuje, že genomy papilomavirů jsou velmi stabilní a že mutace či rekombinace nukleotidových sekvencí jsou u nich velmi vzácné. Právě změny v nukleotidových sekvencích nejvíce konzervativního genu kódujícího protein L1, jsou základem taxonomické klasifikace HPV.*“ (Laco, 2012, s. 51).

### 1.1 Taxonomie

Papilomaviry s polyomaviry kdysi byly příslušníky čeledi Papovaviridae, protože mají podobnou strukturu kapsidy. V 80. letech 20. století byla upřesněna stavba těchto virů do detailů. Zjistilo se, že papilomaviry mají větší kapsidu a přibližně o 3000 párů bazí delší DNA, která má navíc úplně odlišnou organizaci genomu. Papilomaviry proto v roce 2000 opustily čeleď Papovaviridae a utvořily novou rodinu Papilomaviridea. (Fait, 2009; Laco 2012)

Členění HPV probíhá na základě odlišností v nukleotidové sekvenci L1 genu:

**Rody** papilomavirů se od sebe liší o 40-55 % a označují se písmeny řecké abecedy. V rámci jednoho rodu se **druhy** papilomavirů od sebe liší o 30-40%. Příslušníci jednoho druhu mají mezi sebou obdobné biologické vlastnosti, díky tomu lze urychlit výzkum. **Typ** papilomaviru se od jiného typu liší o 10-25 %. Označují se HPV (číslo), např. HPV 16. V rámci jednoho typu rozlišujeme různé podtypy nebo varianty.

V současné době už je identifikováno přibližně 226 HPV typů.

**Podtyp** je odlišný o 2-10 % od jakéhokoliv jiného typu papilomaviru.

**Variantní** papilomaviry se liší o méně než 2 % od jakéhokoliv typu papilomaviru. Každý typ papilomaviru má 10-100 variant, lišících se zejména v nekódujících úsecích DNA. (Laco, 2012)

## 1.2 Rozdělení HPV podle onkologického potenciálu

V diagnostické praxi rozdělujeme lidské papilomaviry podle schopnosti vyvolat nádorové bujení podle klasifikace IACR z roku 2009:

Nízce rizikové, low-risk HPV (dále jen LR-HPV)

- 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 a 81

Vysoce rizikové, high-risk HPV (dále jen HR-HPV)

- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82
- Pravděpodobné HR-HPV typy – 66 a 68
- Ostatní typy mají možné vysoké riziko (possible HR)

## 1.3 Patogeneze

Přirozeným sídlem pro HPV infekci je dlaždicový epitel, na který je virus dokonale přizpůsoben. Viry infikují buňky v nejhlubší vrstvě (stratum basale) a k těm se dostanou zejména v tzv. transformační zóně, což je rozhraní mezi cylindrickým a dlaždicovým epitelem. (Fait, 2009)

„Dlouhou dobu se na základě výsledků studií *in vitro* předpokládalo, že se HPV váží přímo na bazální keratinocyty. Výsledky novějších studií *in vivo* však dokládají, že primárním místem vazby HPV je bazální membrána epitelu; k navázání viru na keratinocyty dochází až následně.“ (Laco, 2012, s. 63)

Životní cyklus HPV je úzce spjatý s diferenciací epitelové buňky. V bazální vrstvě stratum basale se epitelové buňky přirozeně v nadbytku dělí, aby nahradily odloupané vrstvy. Virus využívá replikačního aparátu buňky a tím se dostane i do buněk nově vzniklých (dceřiných). Pomocí nízké koncentrace virových proteinů E1 a E2 v jádře i cytoplazmě je uchovávan tento mód. Buňku může infikovat i několik typů HPV

najednou, ale do buněčné DNA se může integrovat jen jeden typ. Ostatní potom přežívají v episomální formě.

Ve stratum spinosum buňky již neproliferují. Buněčný cyklus se zastavil, aby se buňka mohla diferencovat. Virus ale potřebuje namnožit svou vlastní DNA a to je možné díky časným proteinům. Proteiny E1 a E2 se přímo podílejí na replikaci, kdežto virové onkoproteiny E6 a E7 inhibují tumor supresorové geny (p53 a pRb) hostitele. Časné proteiny tímto principem znovu aktivují syntézu a replikaci buněčné, a tak i virové, DNA. V buňce nyní vznikají tisíce kopií viru.

Následně uhasíná aktivita časných proteinů a začínají se syntetizovat kapsidové proteiny L1 a L2. Tyto proteiny se syntetizují v cytoplazmě keratinocytů vrchních vrstev stratum granulosum.

V horních vrstvách, tedy ve stratum corneum, dochází k sestavení celého virionu. Jelikož virová DNA je uložena v jádře, kapsidové proteiny se musí transportovat za ní. V jádře se potom sestaví kompletní infekční partikule a je uvolněna z apoptizujícího keratinocytu do zevního prostředí. (Doorbar a kol, 2012)

Fait ve své knize celý proces shrnul takto: „*Infekce je tedy lokální, bez viremie, omezená na epitelální vrstvu, není doprovázena zánětem, který by imunitní systém varoval. Od primární infekce ke vzniku infekčního potomstva uplyne dlouhá doba (6-12 týdnů, než buňka projde všemi fázemi diferenciací), a protože viry/virově specifické proteiny na povrchu infikovaných buněk velice špatně aktivují buňky imunitního systému, odpověď hostitele je nedostatečná.*“ (Fait, 2009, s. 16)

Průběh infekce je přehledně zaznamenán v příloze č. 1.

## 1.4 Genetika lidských papilomavirů

Genom HPV tvoří tři hlavní oblasti:

- Regulační region – označován z anglického upstream region (URR), nebo long control region (LCR). Je tvořen 400 – 700 páry bazí, které nekódují proteiny, ale jsou vazebným místem pro virové proteiny E1 a E2, transkripční faktory a regulační proteiny. Dále obsahuje promotory a začíná zde replikace virové DNA.
- Časný region – má šest a více čtecích rámců pro virové proteiny E1, E2, E3,

E4, E5, E6, E7, E8. Za časným regionem se vyskytuje tzv. časná polyadenylová oblast (poly-A).

- Pozdní region – má dva čtecí rámce pro kapsidové proteiny L1 a L2.

Schéma organizace genomu HPV je zobrazeno v příloze v příloze č. 2.

#### 1.4.1 Stručný přehled funkce virových proteinů

Funkce jednotlivých virových proteinů se mezi různými typy HPV mírně liší. Zde uvádím pro názorný příklad mechanismus působení virových proteinů u HPV typu 16.

E1 – enzym DNA helikáza, počátek replikace viru;

E2 – regulační protein transkripce i replikace, rovnoměrné rozdělení plazmidů do dceřiných buněk;

E3 – funkce neznámá;

E4 – časný gen, ale syntetizuje se až v nejpozdější fázi infekce a narušuje cytoskelet;

E5 – onkogen růstového faktoru, také narušuje expresi hlavního histokompatibilního komplexu I. i II. třídy a tím maskuje infikovanou buňku před imunitním systémem (konkrétně před cytotoxickými T-lymfocyty);

E6 – inhibuje buněčný protein p53 a aktivuje telomerázu;

E7 – reaktivace buněčného cyklu, degradace proteinu pRb;

E8 – podobný proteinu E5, přítomen jen u některých typů HPV;

L1 – major capsid protein, hlavní složka virové kapsidy;

L2 – minor capsid protein, udržuje tvar a stabilitu kapsidy.

(Ondruš a Dvořák, 2008; Laco, 2012)

#### 1.4.2 Mechanismus působení onkoproteinů E6 a E7 u HR-HPV typů

*„Hlavní funkcí virového proteinu E6, tvořeného přibližně 150 aminokyselinami (AMK), je inhibice funkce tumor supresorového proteinu p53, který kontroluje integritu buněčného genomu a při poškození genomu aktivuje opravu zjištěných genetických změn a/nebo apoptózu buňky. Protein E6 se prostředím ubikvitin-ligázy E6AP váže na protein p53, což následně vede k degradaci proteinu p53 v proteasomech.“*

(Laco, 2012, s. 54)

Další možná cesta k zablokování p53 je zamezení acetylace specifickými proteiny. Protein E6 také dovede degradovat GAP proteiny, čímž přeruší signální dráhu G-proteinů, ale také znovu aktivuje katalytické podjednotky telomerázy, což činí buňku nesmrtelnou. (Gomolčáková, 2015)

*„Hlavní funkcí virového proteinu E7, tvořeného přibližně 98 AMK, je reaktivace buněčného cyklu v již diferencovaný keratinocytech dlaždicobuněčného epitelu, které tak znovu vstupují do S-fáze buněčného cyklu. Klíčovými regulačními proteiny, které blokují zahájení buněčného cyklu v keratinocytech jsou protein pRb a jemu příbuzné proteiny p107 a p130, na které jsou navázány transkripční faktory rodiny E2F, které jsou tímto způsobem inaktivovány. Po navázání virového onkoproteinu E7 na tyto komplexy dojde k jejich destabilizaci a k uvolnění navázaných transkripčních faktorů, které po transportu do jádra aktivují expresi genů nutných pro přechod buňky z G1- do S-fáze buněčného cyklu a buňka je schopna znovu zahájit buněčný cyklus. Virový protein dále indukuje degradaci proteinu pRb v proteasomech.“ (Laco, 2012, s. 55)*

V 1. fázi infekce v nediferencovaných buňkách protein E7 nepřímo aktivuje cyklin dependentní kinázy (CDK) 2, 4 a 6. Narušením dráhy proteinů pRb, p107 a p130 dojde ke zvýšené expresi proteinu p16, který by normálně inhibicí CDK 4 a 6 zastavil buněčný cyklus v G1 fázi. Kvůli celkově narušeným signálním drahám proteinem E7 to není možné. Pomocí imunohistochemie můžeme dobře vidět protein p16 v buňkách s aktivní infekcí HR-HPV typem. (Gomolčáková, 2015)

## **1.5 Lidský papilomavirus a rakovina**

Od roku 1995 jsou HR-HPV typy 16 a 18 oficiálně uznány organizací International Agency for Research on Cancer (IARC) jako karcinogenní pro člověka a jsou tedy zařazeny do skupiny 1 – lidské karcinogeny. Papilomová infekce je pro rozvoj karcinomu nezbytná, ale velkou roli hrají i další rizikové faktory. Mezi takové faktory patří například sexuální chování, kouření, polymorfismus p53, užívání orální antikoncepce nebo paralelní infekce dalšími mikroorganismy (*Chlamydia trachomatis*, Herpes simplex, HIV). HPV nejčastěji způsobuje karcinom děložního čípku, má ale na svědomí i karcinomy hlavy a krku, penisu, kůže, anální krajiny, dutiny ústní a orofaryngu a další... (Turyna, Sláma, Hejda, 2010)



### 1.5.1 Karcinom děložního čípku

Toto onemocnění je u žen celosvětově druhým nejčastějším zhoubným nádorem. Nejdůležitějším faktorem vzniku karcinomu je dlouhodobá infekce sliznice HR-HPV typem. Konečným a nejhorším stádiem dysplastických změn je invazivní dlaždicobuněčný karcinom jehož prekurzorem je tzv. cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) odstupňovaná podle stupně závažnosti, klasifikací nádorů podle WHO.

Pokud jsou infikovány buňky žláзовého epitelu, jedná se o tzv. cervikální glandulární intraepiteliální neoplazie (CGIN), které mohou přejít až v adenokarcinom in situ (AIS).

Nejlehčím stupněm je CIN1, kde na histologické úrovni jsou vidět známky poruchy maturace s jadernými atypiiemi v dolní 1/3 epitelu.

Přechodné stádium mezi lehkou a těžkou formou je nazýváno CIN2, charakterizované v dolních 2/3 známky poruchy maturace, jadernými atypiiemi a atypickými mitózami.

Nejtěžším případem je CIN3, který zahrnuje i dlaždicobuněčný karcinom in situ. Poruchy maturace se vyskytují ve všech vrstvách cervikálního epitelu s výraznými jadernými atypiiemi a četnými atypickými mitózami. (Cibula a Petruželka, 2009)

Rozvoj prekanceróz je zachycen na obrázku v příloze č. 3.

V poslední době se častěji používá klasifikace podobná cytologické, kde je rozdělení pouze na dva stupně – Low grade skvamózní inatraepiteliální léze (LG SIL nebo LSIL) a High grade skvamózní inatraepiteliální léze (HG SIL nebo HSIL).

Mezi třemi nejčastějšími se vyskytujícími histologickými typy karcinomu děložního hrdla je nejčastější dlaždicobuněčný karcinom (tvořící 72 % všech nádorů), potom adenokarcinom (tvořící 17 %) a nejméně častý adenoskvamózní karcinom (tvořící 4 %). Tyto nádory nejčastěji způsobuje HPV 16, přítomný ve více než 50 % případů. Dále pak v sestupném pořadí HPV 18, 45 a 31 tvořící dalších přibližně 30 % případů. (Laco, 2012)

## 2 SCREENINGOVÉ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY PRO PRŮKAZ HR-HPV TYPŮ

HPV testy detekují HPV a HR-HPV asociované se vznikem karcinomu. V České Republice se používají jako doplňkové testy k primárnímu cytologickému screeningu na rozdíl od Turecka nebo Nizozemska, kde je molekulárně genetický HPV test nástrojem primárního screeningu.

Dosavadní HPV testy mají vysokou citlivost na úkor specifčnosti testu. Proto je při pozitivním HPV průkazu vhodné dále specifikovat, zda jsou přítomné extrarizikové HPV typy 16, 18 nebo 45, které jsou zodpovědné za 70% dlaždicobuněčných lézí a až 95% žlázových lézí.

Při výběru testu pro screeningové účely musíme dbát na správný druh citlivosti. *„Příliš vysoká analytická (absolutní) citlivost screeningového testu sniží jeho pozitivní prediktivní hodnotu, neboť účelem je zachytit pouze ty HR-HPV infekce, jež jsou asociovány se vznikem CIN2+ lézí a odlišit je od přechodných infekcí, jež jsou časté zejména u mladých žen a nevedou ke vzniku karcinomu. Klinická (relativní) citlivost je vztažena právě k takové virové náloži, jež je s vysokou pravděpodobností asociována se vznikem CIN2+ lézí.“* (Kašpírková a Ondič, 2013)

Tyto podmínky splňují zejména následující testy: Hybrid Capture 2 (Hc2) HR-HPV DNA Test, Aptima HPV Assay, Cobas 4800 HPV test, Cervista HPV HR Test, EIA kit HPV GP HR, Abbott RealTime High Risk HPV. (Kašpírková a Ondič, 2013)

Většina z uvedených testů byla po obsáhlých klinických studiích schválena americkým úřadem FDA (Food and Drug Administration).

## 2.1 Hybrid Capture 2 HR-HPV DNA Test (Qiagen)

*„Základním a nejdéle používaným testem pro detekci HPV pro skrínigové účely je Hybrid Capture 2 (Hc2) HR-HPV DNA Test (Qiagen). Test detekuje DNA 13 HR-HPV typů: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68. Principem testu je denaturace DNA a hybridizace v tekutém mediu se směsí neznačených celogenomových RNA sond specifických pro výše uvedené HR-HPV typy. Specificky vychytané hybridy DNA-RNA jsou detekovány pomocí sekundární protilátky s navázanou alkalickou fosfatázou, která v konečné fázi štěpí přidáný substrát za vyzáření chemiluminiscence. Chemiluminiscentní světlo je měřeno v luminometru a softwarem vyjádřeno jako relativní světelné jednotky (RLU) ve srovnání s kontrolami reakce.“ (Kašpírková a Ondič, 2013)*

Pomocí Hc2 specifické sondy 16/18/45 můžeme dále typizovat vzorky na tyto extrarizikové HPV typy.

V jednom vzorku je detekční limit metody 5000 virionů. (Laco, 2012)

Parametry tohoto testu byly určeny ve srovnávací studii u žen s abnormálním cytologickým nálezem. Citlivost 96,3 %, specifičnost 19,5 % a z toho odvozená pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV) 37,4 %. (Szarewski, Mesher, Cadman a spol. 2012)

Nevýhodou metody je křížová reaktivita sondy s jinými typy HPV, což způsobuje falešnou pozitivitu. Tento efekt můžeme eliminovat vyšší hranicí cut-off a definováním šedé zóny testu.

Při zavádění nové metody pro účel screningu karcinomu děložního hrdla se vždy porovnávají hodnoty citlivosti a specifičnosti s hodnotami Hc2.

(Kašpírková a Ondič, 2013)

## 2.2 Aptima HPV Assay

Tato metoda se zaměřuje na mRNA aktivně přepisovaných onkogenů E6 a E7, které zachytí a transkripčně amplifikuje. Následně pak test hybridizační ochrany detekuje produkty amplifikace. Aptima prokazuje mRNA 14 HR HPV typů.

Ani zde přítomnost mRNA onkogenů neukazuje jistě na přítomnost karcinomu nebo jeho předstupně, protože transkripce genů E6 a E7 probíhá i u netransformační fáze HPV infekce. Avšak ve srovnání s DNA testy má stanovení mRNA vyšší specifitu.

Aptima HPV Assay genotypizační kit obsahuje specifickou sondu 16, 18/45 pomocí které můžeme zjistit, o jaký HPV typ se jedná.

Ve srovnávací studii u žen s abnormálním cytologickým nálezem byla určena citlivost Aptima HPV testu pro identifikaci léze vysokého stupně 95,3 %, specifita 28,8 % a PPV byla 39,3%. (Kašpírková a Ondič, 2013)

### 3 HPV GENOTYPIZAČNÍ TESTY

Tyto metody se vyznačují vysokou analytickou citlivostí, a proto se nehodí mezi screeningové testy karcinomu děložního hrdla. Najdou využití při dourčování některých HPV typů, které nejsou součástí screeningových stanovení. Jelikož tyto testy dokáží prokázat přesný typ HPV, jsou převážně využívány ve výzkumu.

Většina HPV genotypizačních testů je založená na polymerázové řetězové reakci (PCR) s různými specifickými modifikacemi. (Kašpírková a Ondič, 2013)

#### 3.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR je molekulárně biologická metoda sloužící k amplifikaci určité nukleotidové sekvence. Námi zvolená sekvence je označena dvěma oligonukleotidovými primery, které jsou synteticky připravené a komplementární ke koncům amplifikovaného segmentu templátové DNA. O vlastní replikaci DNA se postará termostabilní polymeráza získaná z bakterie *Thermus aquaticus* (proto *taq-polymeráza*). Reakce probíhá v pufrovaném prostředí *in vitro*, ve kterém se nachází stavební díly pro nové řetězce, jimiž jsou jednotlivé deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Ve směsi nesmí chybět ani hořčnaté ionty důležité pro činnost *taq-polymerázy*. (Alberts, 2006)

PCR se uskutečňuje v přístroji zvaném termocykler a skládá se ze tří kroků:

- 1) **Denaturace** – po dobu 20-30 vteřin, při teplotě 94-98°C dochází k rozrušení vodíkových můstků a tím k rozvolnění dvouvláknové DNA na jedno vláknovou
- 2) **Annealing** – tzv. nasednutí primerů na komplementární sekvenci, probíhá při teplotě 50-65°C
- 3) **Elongace** – syntéza komplementárního vlákna DNA ve směru 5'→3', teplota je závislá na optimu aktivity DNA polymerázy tj. 75-80°C, doba elongace je závislá na délce amplifikovaného úseku

Tyto kroky se cyklicky opakují až do doby, kdy máme dostatečný počet kopií amplifikovaného úseku. Obvykle stačí 30 cyklů. (Cibula a Petruželka, 2009)

### 3.1.1 Multiplex PCR

Tato metoda souběžně využívá více primerů, které ovšem musejí mít podobnou, nebo lépe stejnou, hybridizační teplotu. Díky tomu můžeme amplifikovat více oblastí ve zkoumané DNA najednou. Pro správný průběh reakce a amplifikování všech produktů současně je nutné ji krok za krokem optimalizovat. Výhodou této modifikace PCR je nižší cena než kdyby tyto amplifikace probíhaly každá zvlášť. Proto se používá na testování oblastí DNA na sobě vzájemně nesouvisících, vyhledávání změn na dlouhých úsecích a amplifikaci vnitřních kontrol se vzorky.

(Staněk, 2013; Šmarda, 2005)

### 3.1.1 PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery

Tato metoda je používána pro jednotnou (uniformní) a náhodnou amplifikaci DNA. Je vhodná například pro analýzu DNA z nekultivovatelných mikroorganismů (HPV) nebo přípravě fragmentů DNA rozdělených podle velikosti, jelikož výsledkem DOP-PCR je vznik spektra různě dlouhých fragmentů. Její speciální složkou jsou tzv. degenerované oligonukleotidové primery (DOP) vhodné k jednotnému zmnožení zejména krátkých molekul DNA nebo DNA přítomné ve velmi nízké koncentraci. DOP-primery se skládají z náhodné hexamerové sekvence ohraničené z obou stran sekvencemi definovanými. Hexamerová sekvence je tvořená všemi možnými kombinacemi přirozených nukleotidů (A, T, G a C).

Vhodným pokračováním DOP-PCR je sekvenační reakce, ve které zjistíme konkrétní HPV typ.

*„DOP-primery se připojují při nízké stringenci k denaturované templátové DNA, kde hybridizují k vazebným místům primeru. Vzdálenost vazby primerů může být kontrolována délkou definované sekvence na 3'-konci a přesností podmínek amplifikace. Prvních pět cyklů DOP-PCR sestává z připojení při nízké stringenci, následným zvyšováním teploty na elongační teplotu a prodlužování primeru. Dalších 35 cyklů probíhá za vyšší připojovací teploty (vyšší stringenci). Za přísnějších podmínek je materiál vytvořený při prvních cyklech amplifikován preferenčně, protože obsahuje kompletní primerovou sekvenci na obou koncích. Na jiných místech se DOP-primer při stringentních podmínkách neváže.“ (Šmarda, 2005, s. 95)*

### 3.1.2 Detekce PCR produktů

Nejpoužívanější metodou detekce PCR produktu (amplikonu) je gelová elektroforéza. Jejím principem je putování záporně nabitých nukleových kyselin ve stejnosměrném elektrickém proudu ke kladné elektrodě (anodě), ve specifickém nosiči.

Tímto nosičem je nejčastěji 0,5 – 4 % agarózový gel, s přidavkem ethidium bromidu, ponořený v tris pufru. Se zvýšením koncentrace polysacharidu agarózy vzroste i rozlišovací schopnost gelu, avšak prodlouží se doba průběhu elektroforézy. Agarózový gel je vhodný pro rozdělování delších fragmentů DNA. Ethidium bromid je v gelu přidáný pro následné zobrazení fragmentů UV zářením. Tato látka je sice levnější, ale bohužel karcinogenní. Proto ji už v mnoha laboratořích nahradila vizualizační barva SYBR Green.

Druhým nejčastějším nosičem je polyakrylamidový gel. Vzniká polymerací akrylamidu. Tento druh gelu je tvořen velmi hustou molekulovou sítí, a proto je vhodný pro rozdělování kratších fragmentů DNA.

Elektroforéza může probíhat buď horizontálně, vertikálně anebo v kapiláře. Kapilární elektroforéza má nejrychlejší průběh. Tenká kapilára se dá chladit lépe, než normální elektroforetické vany, a tak můžeme použít elektrický proud o vyšším napětí, čímž je putování DNA rychlejší. (Staněk, 2013; Racek, 2006)

## 3.2 Hybridizační metody

Hybridizační metody obecně spočívají ve vazbě DNA nebo RNA se značenou sondou. Mohou probíhat volně v roztoku, na pevných nosičích nebo v preparátech tkání. Jako nosiče se využívají nylonové, nitrocelulosové nebo polyvinyliden difluoridové membrány. Podle způsobu detekce sondy se vybírá vhodný typ a specifikace membrány. Nejčastěji používaným typem je pozitivně nabitá nylonová membrána. Existuje několik variací hybridizace na pevném nosiči:

Podle tvaru nanesených vzorků na membránu rozlišujeme dot-, slot- a blot- hybridizaci (dot- pravidelný okrouhlý, slot- pravidelný protáhlý, blot- náhodný tvar).

Dále pak Southernův přenos (hybridizace DNA) a Northern blotting (hybridizace RNA). V těchto případech je nejprve zkoumaná nukleová kyselina separována elektroforeticky a následně přenesena na nosič. (Průša, 1997; Šmarda, 2005)

Všechny tyto typy mají na nosiči fixovanou zkoumanou molekulu nukleové kyseliny.

**Reverzní hybridizace** je založená na tzv. Reverzním blottingu, což znamená, že na nosič je nejprve navázáno mnoho neznačených sond pro různé HPV typy. Molekuly DNA se namnoží metodou PCR v termocykleru na detekovatelnou hladinu. Následně je dvouvláknová DNA (ds DNA) denaturována na jednovláknovou (ss DNA), která je hybridizována k sondám na základě pravidel komplementarity bazí. Posledním krokem je vizualizovat signál a odečíst případné pozitivitu. (Průša, 1997)

Senzitivita hybridizace je upravována tzv. Stringencí.

*„Jedná se především o teplotu a koncentraci iontů, které udávají, do jaké míry dochází k hybridizaci, jestli dochází k hybridizaci specifické (pouze mezi komplementárními bázemi) či již nespecifické (mezi nekomplementárními bázemi). Se zvyšující se teplotou a snižující se koncentrací solí vzrůstá stringence a klesá pravděpodobnost nespecifické hybridizace. Pokud jsou podmínky příliš stringentní, nedochází již ani k hybridizaci specifické. Se stringencí souvisí teplota tání dvoušroubovice a teplota hybridizace.“* (LabGuide, ©2014)

### 3.2.1 In situ hybridizační HPV test

In situ hybridizační testy (ISH) zviditelňují DNA viru na konkrétním místě tkáně, nikoliv v izolované DNA. Dávají nám tedy informaci o lokalizaci a identifikaci viru.

*„V čitelně obarveném řezu lze podle druhu signálu rozlišit, zda je DNA HPV integrovaná do genomu, nebo se vyskytuje pouze v episomální formě. Výhoda detekce HPV v topografické souvislosti ve tkáni je však zastřena nižší citlivostí metody (70%), poměrně častým nespecifickým barvením a vysokým pozadím řezu.“* (Kašpírková, Ondič, Černá a Skálová, 2013, s. 30)

Principem metody je denaturace a následná reasociace (znovu spojení) DNA se sondou na základě pravidel komplementarity bazí. Navázaná sonda na zkoumané DNA se projeví jako hybridizační signál. Obvykle jsou tyto signály buď fluorescenční, nebo radioaktivní. (WikiSkripta, ©2008)



V případě firmy *Ventana Medical System, Inc.* jejich sonda *INFORM HPV III Family 16 Probes (B) and/or Family 6 HPV* lze použít na parafínové řezy 2-4 $\mu$ m silné nejprve obarvené základním přehledným barvením Hematoxilin-Eosin. Následně po vyvolání sondy chromogenem lze rozlišit episomální formu od integrované HPV infekce. Episomální forma HPV DNA se jeví jako velká homogenní tmavě modrá sraženina uvnitř jádra. Pokud je HPV DNA již integrovaná do genomu buňky děložního hrdla, jeví se jako tmavě modré tečkování uvnitř jádra. (Grogan, 2006)

Rozdíl mezi těmito formami je zachycen na obrázku v příloze č. 4.

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 4 FORMULACE PROBLÉMU

Vysoce rizikové HPV jsou každoročně příčinou nejméně 15 % všech nádorových úmrtí po celém světě. Vzhledem k postupnému vývoji neoplazií až ke karcinomu může screening v časných stádiích onemocnění zabránit většině smrtelných případů. V dnešní době jsou tradiční cytologické a histologické metody doplňovány i o mnohem senzitivnější stanovení molekulárně genetické. Zjištění genotypu probíhající HPV infekce má významnou hodnotu pro léčbu, sledování pozitivních pacientů či zachycení recidivujícího onemocnění.

Stanovením mRNA můžeme odhalit transkripčně aktivní HPV infekci, která je typická pro vysoce rizikové léze. Bylo prokázáno, že testování na bázi mRNA produkuje méně falešné pozitivivity, než testování na bázi DNA, kde může hybridizační sonda díky tzv. zkřížené reaktivitě chybně reagovat i s HPV typy, které rakovinu nezpůsobují. Nicméně zda a do jaké míry se vyskytuje zkřížená reaktivita u genotypizujících sond detekujících nejzávažnější HR-HPV typy, nebylo více zkoumáno.

### 4.1 Cíle výzkumu

Naším cílem je porovnat charakteristiku dvou typově odlišných, doporučených, screeningových HR-HPV testů, s konkrétním zaměřením na jejich genotypizující sondy, ve vysokém stupni cervikálních lézí použitím:

- testu založeného na bázi DNA – Hybrid capture 2 – detekce celého spektra HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) včetně určení genotypu HPV 16/18/45
- testu založeného na bázi mRNA – APTIMA HPV – detekce celého spektra HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) včetně určení genotypu HPV 16/18/45
- Pomocí PCR genotypizačních technik dourčit nesouhlasné vzorky (PCR pE6/E7, LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test - Roche)

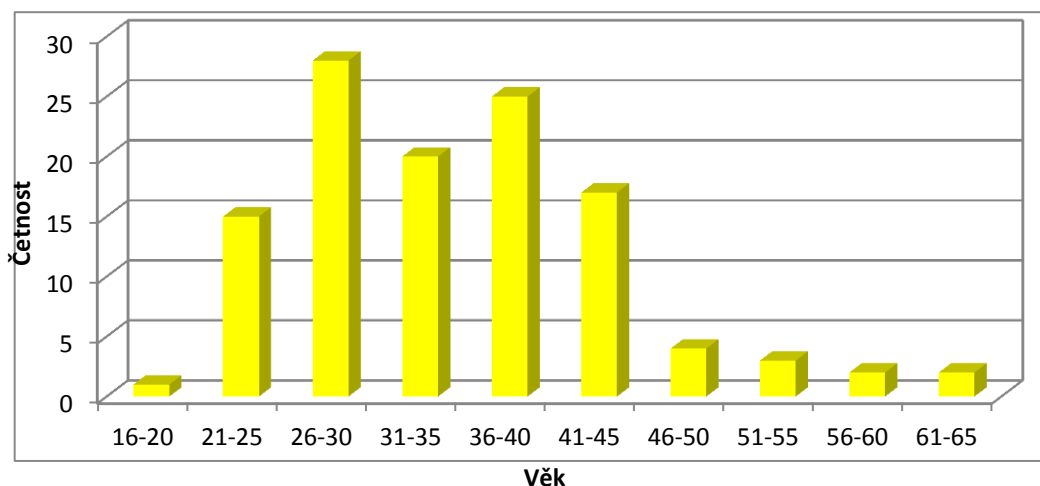
## 5 STUDIJNÍ SKUPINA (MATERIÁL)

Jako materiál byly použity buňky z média cytologie na tenké vrstvě (liquid based cytology – dále jen LBC). Jelikož je LBC vzorek nejprve hodnocen cytologicky, je tak kontrolováno dostatečné zastoupení reprezentativních buněk, a tím se rapidně snižuje riziko falešné negativity testu. Navíc toto médium zajišťuje dobrou kvalitu nukleových kyselin, i při pokojové teplotě, až několik měsíců. (Kašpírková a Ondič, 2013)

Pro studii byly použity vzorky LBC pacientek, které měli histologicky prokázanou těžkou lézi na děložním hrdle. Tyto vzorky měli více jak 99% pravděpodobnost, že budou HR-HPV pozitivní a tedy vhodné pro otestování charakteristik screeningových HPV testů. Vzorky byly vyhledány na základě cytologické a histologické diagnostiky z archivu Bioptické laboratoře s.r.o. Celkem jsem zpracovala 117 vzorků.

Graf č. 1: Zastoupení věků pacientů použitých vzorků

### Zastoupení věků pacientů

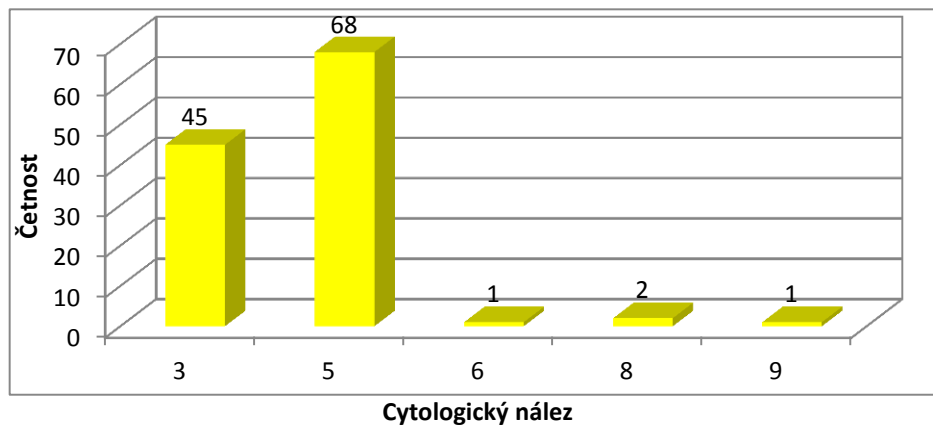


Věk pacientek se pohyboval od 19 až do 65 let. Průměrný věk je 35 let (medián 33 let).

Zdroj: vlastní

Graf č. 2: Zastoupení cytologických nálezů v použitých vzorcích

## Cytologický nález u pacientů



### Legenda:

3 = atypické dlaždicové (skvamózní) buňky, nelze vyloučit HSIL

5 = těžké změny dlaždicových buněk (= HSIL)

6 = HSIL, nelze vyloučit invazi

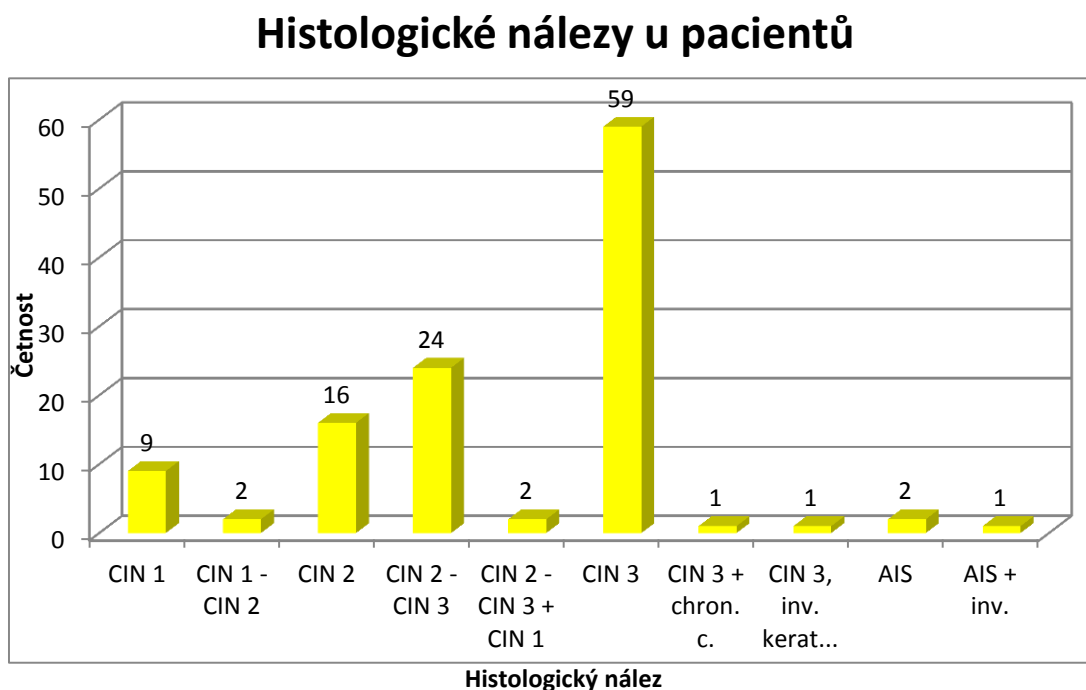
8 = atypie žláзовých buněk, nespecifikovány

9 = atypie žláзовých buněk, spíše neoplastické

Zdroj: vlastní

Do studie byly použity pouze vzorky cytologické klasifikace 3, 5, 6, 8 a 9.

Graf č. 3: Histologické nálezy u použitých vzorků



Legenda:

CIN 1 = lehké změny

CIN 2 = středně těžké změny

CIN 3 = těžké změny

CIN 3 + chron. c. = CIN 3 + chronická cervicitis

CIN 3, inv. kerat... = CIN 3 invazivní keratinizující dlaždicobuněčný karcinom

AIS = adenokarcinom in situ

AIS + inv. = adenokarcinom in situ s invazivním růstem

Zdroj: vlastní

Do studie byly použity vzorky s prokázanou neoplazií nebo karcinomem.

## 6 METODY VÝZKUMU

### 6.1 Digene Hybrid capture 2 HR-HPV DNA test (Qiagen)

Použité přístroje: Luminometr DML 2000, vodní lázeň, ohřívač mikrodestiček, třepačka, vortex

Pracovní postup pro detekci celého spektra HR-HPV:

- z důvodu kompatibility je třeba nejprve převést vzorek z LBC média do STM media pomocí soupravy Hc2 Sample Conversion kit
- denaturace vzorků a kontrol přidáním 500  $\mu$ l denaturačního činidla a vortex 5 s
- inkubace ve vodní lázni 45-50 minut při 65°C
- vortex odběrovek 5 sekund a následně přepipetovat 75  $\mu$ l vzorku/kontroly dlouhou špičkou do obyčejné hybridizační destičky (bez navázaných protilátek)
- příprava směsi sondy: 1  $\mu$ l sondy (probe/HPV/high risk) + 25  $\mu$ l ředícího roztoku (dil/probe) a následný vortex směsi
- napipetovat špičkami s filtrem 25  $\mu$ l směsi sondy do každé jamky, zakrýt víčkem, třepat na třepačce 3  $\pm$  2 min při 1100 ot/min, jamky zežloutnou, konvertované zružoví. Pokud vzorky nezmění barvu, znovu přidat 25  $\mu$ l směsi sondy a třepat.
- inkubace v mikrodestičkovém inkubátoru 60  $\pm$  5 min při 65°C
- přepipetovat obsah z hybridizační destičky do imobilizačních jamek (na stěnách navázána protilátka RNA:DNA), víčko a třepat na třepačce 60  $\pm$  5 min při 1100 ot/min
- vyklepnout obsah imobilizačních jamek do výlevky a zbytek obsahu odstranit poklepem na ubrousek
- reverzní pipetovací technikou pomocí osmikanálové pipety napipetovat 75  $\mu$ l detekčního činidla 1 (REAG/DET/1)
- zavřít víčkem a inkubovat při pokojové teplotě 30-45 min
- stříčku promývací hadice nejprve očistit lihobenzínem, z jamek odstranit detekční činidlo 1 vyklepnutím do výlevky, 6x promýt jamky promývacím roztokem, jamky vysušit poklepem na ubrousek

- za pomoci reverzní pipetovací techniky napipetovat 75 µl detekčního činidla 2 (REAG/DET/2), vložit do luminometru DML 2000
- inkubovat 15-30 min v temnu
- zadat data a protokol do luminometru DML 2000 a změřit destičku

Pracovní postup pro genotypizační detekci HPV 16/18/45 se shoduje s postupem pro detekci celého spektra HR-HPV. Jediná odlišnost je v použité sondě.

Pro genotypizační Hc2 se používá sonda: HPV 16/18/45 Probe Set.

## **6.2 APTIMA HPV Assay**

Použité přístroje: PANTHER

Pracovní postup:

- po silném protřepání nádoby s LBC vzorkem odebrat 1 ml vzorku do odběrové zkumavky ze soupravy APTIMA pro přenos vzorků
- vzorek zlehka promíchat s médiem ve zkumavce, NEvortexovat
- zkumavka s čárovým kódem se vloží do speciálního stojanu, ten se vloží do přístroje PANTHER a zapne se příslušný program

V přístroji jsou příslušné reagentie buď pro detekci celého spektra HR-HPV nebo pro genotypizační detekci HPV 16, 18/45.

## **6.3 PCR pE6/E7 – HPV typy 16, 18, 45**

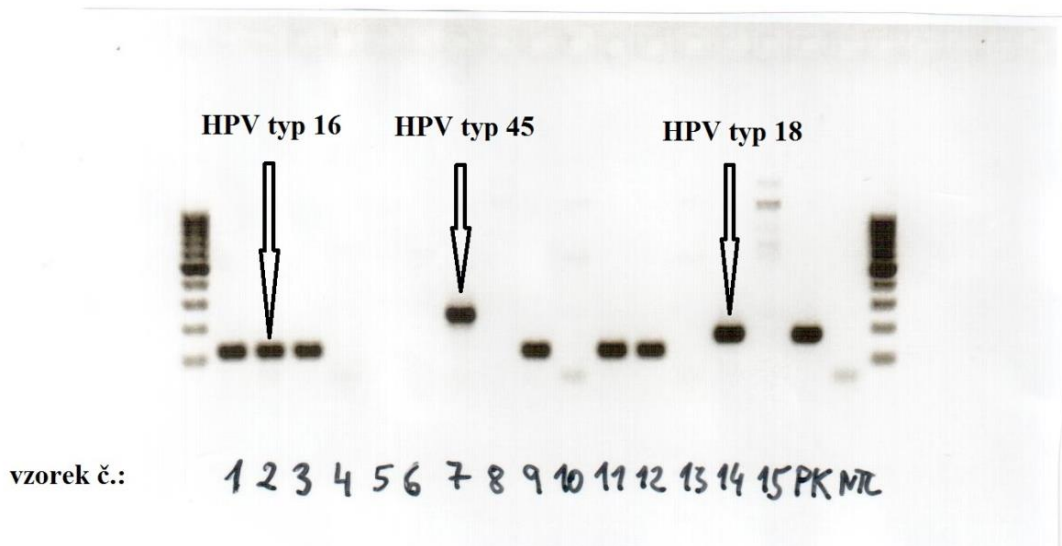
Izolace DNA byla provedena z LBC média soupravou QIAamp® MinElute® VirusSpinKit

Použité přístroje: laminární box, termocykler, pouprava pro elektroforézu (zdroj a elektroforetické vany), UV photcamera (transiluminátor, kamera)

### Pracovní postup:

- připravíme si z mrazáku PCR primery a reagentie a necháme je vytemperovat na pokojovou teplotu
- v PCR hazardboxu pro reagentie připravíme PCR mix na daný počet reakcí, kolik máme vzorků a kontrol
- na 1 reakci je potřeba 12,5  $\mu$ l FastStart, 1  $\mu$ l PRM-E6/E7 F, 1  $\mu$ l PRM-E6/E7 R, 0,5  $\mu$ l BSA, 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- do každé mikrozkušavky napipetujeme 23  $\mu$ l PCR mixu
- v hazardboxu určeným pro manipulaci s nukleovými kyselinami přidáme 2  $\mu$ l příslušné DNA
- mikrozkušavky uzavřeme a umístíme je do termocykleru a spustíme program pE6/E7 (95/9m°C; 40\*95°C/30s, 57°C/30s-72°C/1m 72°C/5m, 14°C/ $\infty$ )
- po uplynutí programu probíhá detekce v agarovém gelu s přidavkem ethidium bromidu 20 minut ve stejnosměrném el. proudu (200 V)
- poté gel vyfotíme pod UV světlem a odečteme výsledek

Obrázek č. 1: Výsledek elektroforézy pro metodu PCR pE6/E7 – typy 16, 18, 45 (HPV)



Zdroj: vlastní



## 6.4 LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche)

Proces přípravy PCR mixu probíhá v pre-amplifikační části laboratoři, na kterou v post-amplifikační části laboratoře navazuje proces PCR a reverzní hybridizace.

Použité přístroje: termocykler, lamilární box, vodní lázeň s třepačkou, vakuová odsávačka

Pracovní postup:

1) Proces PCR:

- v lamilárním boxu určeném pro přípravu PCR mixů namíchat podle příslušného pracovního protokolu směs pro reakci, kterou následně rozdělíme do řádně popsanych mikrozkuvek po 45  $\mu$ l PCR mixu
- reagentie pro 1 reakci: 20,6  $\mu$ l HPV MMX, 4,4  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 20  $\mu$ l  $H_2O$
- v lamilárním boxu určeném pro práci s nukleovými kyselinami přidat 2  $\mu$ l příslušné DNA vzorků a kontrol
- uzavřené mikrozkuvky odnést do post-amplifikační části laboratoře, kde je vložíme do termocykleru a zapneme příslušný program pLA [50°C/2m, 95°C/9m, 40\*(95°C/30s, 55°C/1m, 72°C/1m rr50%)72°C/7m, 4°C/0-24h, ramp speed max]

2) Proces reverzní hybridizace: *Denaturace*  $\rightarrow$  *Hybridizace*  $\rightarrow$  *Promývání*  $\rightarrow$  *Detekce*

- vzorky denaturujeme v termocykleru programem *pLA denaturace* (72°C/5min), poté ke vzorkům a kontrolám v mikrozkuvkách přidat 50  $\mu$ l denaturačního roztoku (DN)
- pinzetou vložit stripy do jamek sondami navrch, označit jamky patřičnými čísly, opakovací pipetou přidat 4 ml přehřátého Hybridizačního pufru do každé jamky
- přidat 75  $\mu$ l denaturovaného vzorku/kontrol a okamžitě zamíchat kýváním, aby nebyla patrná fialová barva.
- přikrýt víčkem, zatěžkat závažím a třepat ve vodní lázni 30 min při 53°C při frekvenci třepání 60 rpm, uzavřít vodní lázeň víkem, aby teplota byla stabilní
- vyndat z lázně, odsát pufr vakuovou odsávačkou (měnit špičky mezi vzorky)
- opakovací pipetou přidat 4 ml Promývacího pufru (PP) do jamek a 3 - 4x opláchnout stripy kýváním tam a zpět

- odsát PP vakuovou odsávačkou (měnit špičky mezi vzorky) a opakovací pipetou přidat 4 ml přehřátého Stringent PP
- přikrýt víčkem, zatěžkat závažím a ve vodní lázni třepat 15 min při 53°C/60 rpm
- připravit konjugát: Na každý strip 5 ml Promývacího pufru (PP) + 15 µl SA-HRP. Promíchat. Konjugát je stabilní 3 hodiny při pokojové teplotě
- vyndat z lázně a odsát Stringent PP vakuovou odsávačkou (měnit špičky mezi vzorky)
- opakovací pipetou přidat 4 ml konjugátu. Přikrýt víčkem a třepat mimo vodní lázeň 30 min při pokojové teplotě
- od tohoto kroku není potřeba měnit špičky mezi vzorky, sundat víčko a odsát konjugát
- opakovací pipetou přidat 4 ml PP a 3 - 4x opláchnout stripy kýváním tam a zpět, odsát PP vakuovou odsávačkou
- opakovací pipetou přidat 4 ml PP, zavřít víčkem a třepat mimo vodní lázeň 10 min při pokojové teplotě. Odsát PP vakuovou odsávačkou.
- opakovat předchozí krok
- odsát PP vakuovou odsávačkou, opakovací pipetou přidat 4 ml Citrátového pufru, zavřít víčkem a třepat mimo vodní lázeň 5 min při pokojové teplotě na cca 60 rpm
- připravit substrát: Na jeden strip 4 ml SUB A + 1 ml SUB B, promíchat
- odsát Citrátový pufr vakuovou odsávačkou, opakovací pipetou přidat 4 ml substrátu, zavřít víčkem a v temnu třepat mimo vodní lázeň 5 min při pokojové teplotě
- odsát substrát vakuovou odsávačkou, opakovací pipetou přidat 4 ml deionizované H<sub>2</sub>O, zavřít víčkem a třepat mimo vodní lázeň 5 min při pokojové teplotě
- pinzetou vyndat stripy a nalepit na příslušný pracovní protokol pLA
- vyhodnocení pomocí interpretační tabulky

Obr. č. 2: Výsledek metody LINNEAR ARRAY

	59	62	63	65	76	
poř.č.	1	2	3	4	5	6
izol.č.						
ref.						
strip						
typ: HR	31	35, 51	51, 52*	39, 51	56	
LR		52*	56, 58			
validní:	✓		✓	✓	✓	

Vzorek se odečítá pomocí interpretační tabulky. Např. pozice pozitivního pruhu u 1. vzorku odpovídá HPV typu 31.

Zdroj: vlastní

## 7 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### Hybrid capture 2

Míra cut-off hodnoty pro tento test byla vypočítána na 1,00 a 2,5 RLU/CO. Vzorky v rozmezí 1,00 – 2,5 RLU/CO jsou považovány za hraniční, vzorky < 1 RLU/CO jako negativní a vzorky > 2,5 RLU/CO jako pozitivní. Tato hodnota platí pro celkový průzkum HR-HPV ve vzorku, ale zároveň i pro HPV genotypizační stanovení.

### APTIMA HPV test

Výsledky testu jsou automaticky interpretovány softwarem testu. Výsledek testu může být negativní, pozitivní nebo neplatný podle poměru signálu k hraniční hodnotě cut-off (S/CO) pro vnitřní kontrolu a analyt. Hraniční hodnota (cut-off) analytu je stanovena ze signálu analytu (žhavicí sonda) z platných replikátů negativního kalibrátoru a ze signálu analytu z platných replikátů pozitivního kalibrátoru.

Tabulka č. 1: Závislost hodnot na výsledku vzorku

Interpretace vzorku	Kritéria
<b>Negativní</b>	S/CO analytu < 0,50 Vnitřní kontrola ≥ cut-off IC Vnitřní kontrola ≤ 2 000 000 RLU
<b>Pozitivní</b>	S/CO analytu ≥ 0,50 Vnitřní kontrola ≤ 2 000 000 RLU Analyt ≤ 13 000 000 RLU
<b>Neplatný</b>	S/CO analytu < 0,50 a vnitřní kontrola < cut-off IC nebo Vnitřní kontrola ≤ 2 000 000 RLU nebo Analyt > 13 000 000 RLU

Zdroj: Aptima, příbalový leták, 2011

### **PCR E6/E7 specifická pro HPV typy 16, 18, 45**

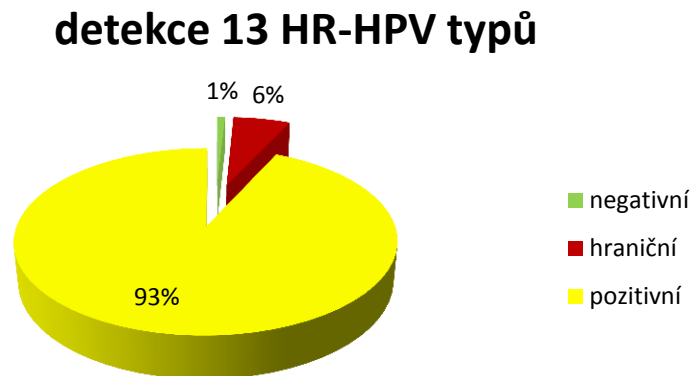
Vyhodnocení probíhá z fotografie gelu po elektroforéze PCR produktů. Produkty amplifikace jednotlivých HPV se velikostně liší, a proto je možné odečíst přesný typ HPV z gelu.

### **LINEAR ARRAY HPV Genotyping test**

Hybridizační stripy se odečítají až po úplném zaschnutí. Poté se pomocí interpretační tabulky odečte poloha zobrazeného proužku jako konkrétní HPV typ. Každý strip má ve spodní části 2 kontrolní zóny, které musí být zbarvené, aby vzorek byl validní.

## 7.1 HR-HPV Hybrid capture 2

Graf č. 4: Detekce DNA Hc2 13 HR-HPV typů

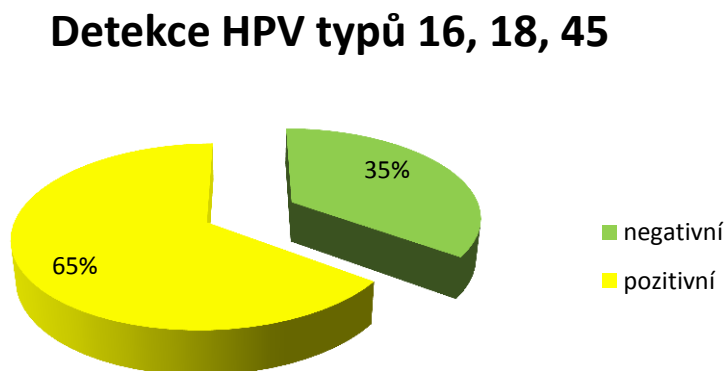


109 vzorků bylo pozitivní, 7 vzorků bylo označeno za hraniční a 1 vzorek byl negativní.

Zdroj: vlastní

## 7.2 Genotypizační detekce HPV typů 16/18/45 Hybrid capture 2

Graf č. 5: Genotypizační detekce DNA Hc2 HPV typů 16, 18, 45



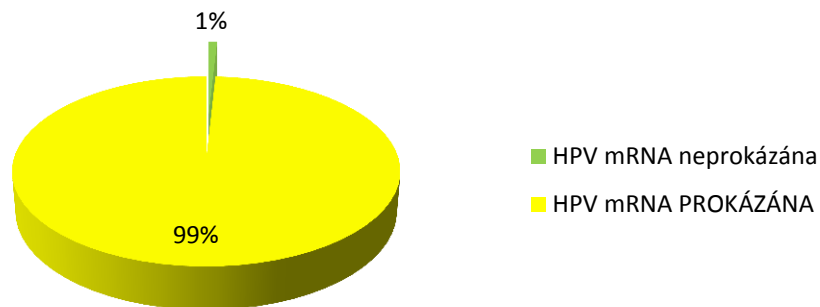
Pozitivních vzorků bylo celkem 76 a negativních 41.

Zdroj: vlastní

### 7.3 HR-HPV Aptima Assay

Graf č. 6: Detekce mRNA Aptima Assay 14 HR-HPV typů

#### detekce 14 HR-HPV typů



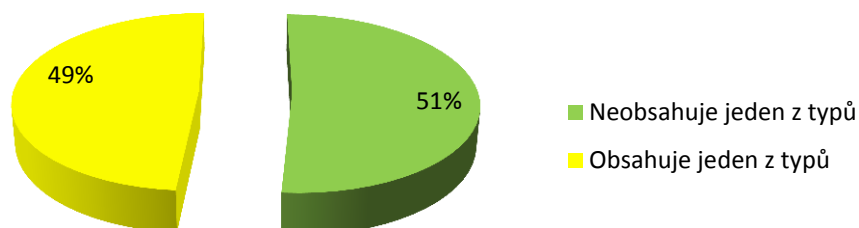
HPV mRNA prokázána u 116 vzorků, tedy pozitivní. U 1 vzorku HPV mRNA prokázána nebyla, tedy negativní.

Zdroj: vlastní

### 7.4 Genotypizační detekce HPV typů 16, 18/45 Aptima

Graf č. 7: Genotypizační detekce mRNA Aptima HPV typů 16, 18/45

#### detekce typů 16, 18, 45



U 57 vzorků bylo prokázáno, že obsahují jeden z typů 16, 18/45. U 60 vzorků žádný z těchto typů prokázán nebyl.

Zdroj: vlastní

## 7.5 Porovnání metod Hc2 a APTIMA na úrovni HR-HPV sondy

Tabulka č. 2: Souhrn hodnot HR-HPV sond

	Počet vzorků		
	Pozitivní	Hraniční	Negativní
Hc2	109	7	1
AHPV	116	0	1

U metody Hc2 je důležité stanovit hodnotu cut-off. V tomto případě jsou vzorky >2.5 RLU/CO označeny za pozitivní a vzorky v rozmezí hodnot 1.0 - 2.5 jsou označeny jako hraniční. Pokud bychom považovaly hraniční vzorky z Hc2 za pozitivní, tak by obě metody poskytly shodný počet pozitivních výsledků. Ale vzhledem k šedé zóně testu Hc2 tato metoda trpí jistou mírou nejistoty. Z těchto výsledků by se dalo vyjádřit 6 % míru nejistoty metody Hc2.

Zdroj: vlastní

## 7.6 Porovnání metod Hc2 a APTIMA na úrovni genotypizační sondy 16, 18, 45

Tabulka č. 3: Souhrn hodnot genotypizačních sond 16, 18, 45

	Počet vzorků	
	Pozitivní	Negativní
Hc2	76	42
AHPV	57	60

Zjištěné hodnoty celkového počtu pozitivních vzorků na HPV typy 16,18,45 se mezi metodami výrazně liší, konkrétně o 19 vzorků.

Zdroj: vlastní



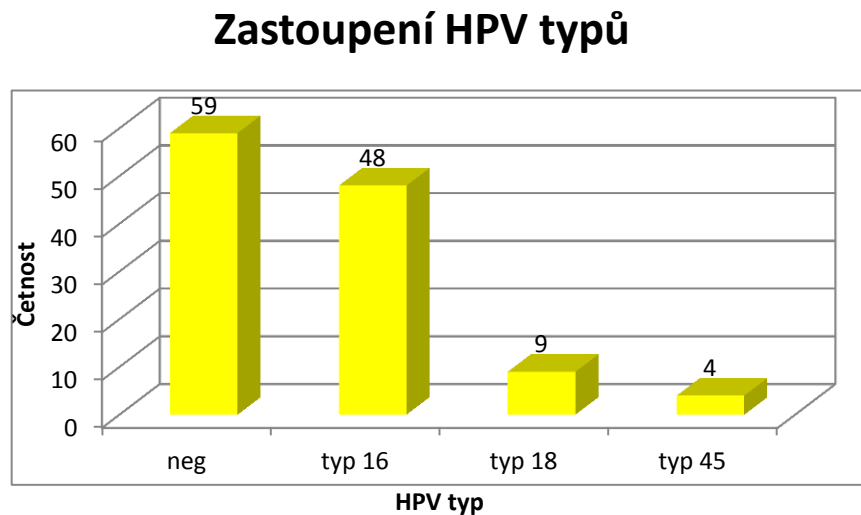
## 7.7 Zjištění specifity stanovení metod Hc2 a APTIMA

Vzorky byly rozděleny na souhlasné a nesouhlasné a podle toho byla vybrána metoda s adekvátním rozsahem detekovaných typů HPV.

### 7.7.1 Souhlasné vzorky – potvrzení typově specifickou multiplex PCR

Touto metodou byla kontrolována správnost stanovení metody Hc2 a APTIMA.

Graf č. 8: Zastoupení HPV typů pomocí metody PCR pE6/E7 HPV 16, 18, 45



Jelikož je metoda cílená jenom na HPV typy 16, 18 a 45 označení negativního výsledku znamená, že neobsahuje tyto cílené HPV typy. Neznamená to ale, že by vzorek nemohl obsahovat jiný HPV typ. U 4 vzorků byla prokázána koinfekce s HPV typy 18 a 45.

Celkový počet HPV 16, 18, 45 pozitivních vzorků je tedy 57.

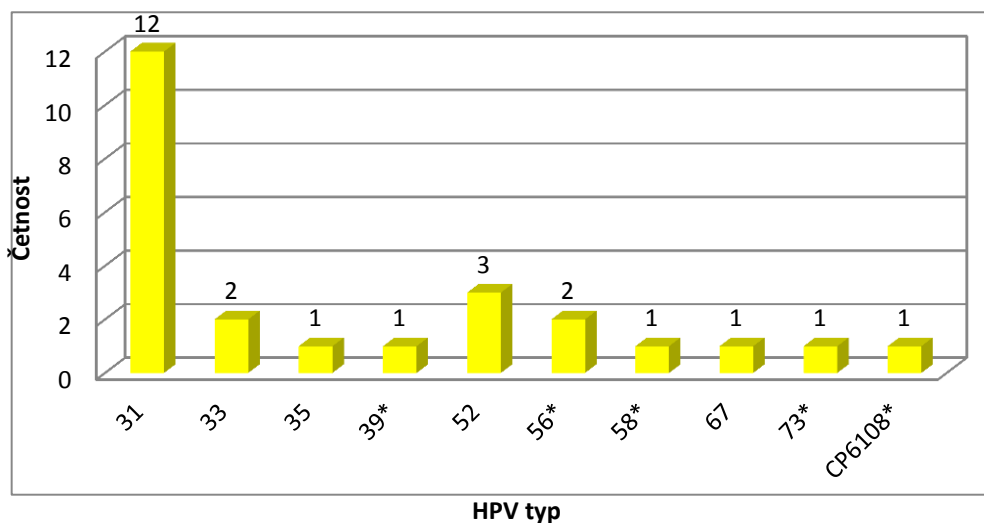
Zdroj: vlastní

### 7.7.2 Nesouhlasné vzorky – rozšířená genotypizace za použití metody Linear Array

Tato metoda byla použita na zjištění přesného HPV typu u vzorků, jejichž hodnoty se navzájem lišily mezi metodami Hc2 a APTIMA. Těchto nesouhlasných vzorků bylo 19 z celkového počtu 117 vzorků.

Graf č. 9: Zastoupení HPV typů ve vzorcích s diskrepantním nálezem

### Zastoupení HPV typů v diskrepantních nálezích



\* označuje HPV typy přítomné v koinfekci (v jedné lézi více HPV typů)

HPV typu 31 má největší podíl na nesouhlasnosti hodnot metody Hc2 a APTIMA.

Zdroj: vlastní

## 7.8 Celkové shrnutí

Výsledky nám ukázaly:

- Detekce přítomnosti HR-HPV typů ve vzorcích více typovou sondou poskytla podobné výsledky, ovšem s mírou nejistoty 6 % pro metodu Hc2.
- Všechny vzorky stanovené metodou AHPV 16/18/45 jako pozitivní, byly správně pozitivní.
- Všechny vzorky stanovené metodou AHPV 16/18/45 jako negativní, byly správně negativní.
- Ve stanovení metodou Hc2 16/18/45 bylo zjištěno 19 falešně pozitivních vzorků.
- Největší podíl na falešně pozitivních vzorcích z metody Hc2 nese HPV typ 31.

## DISKUSE

Cílem naší práce bylo porovnat mezi sebou genotypizační sondy metody Hc2 a Aptima.

Potvrdili jsme, že falešnou pozitivitu u genotypizační sondy Hc2 16/18/45 způsobuje křížová reaktivita této sondy, nejčastěji s HPV typem 31. Nejpravděpodobnějším důvodem je blízká sekvenční DNA podobnost HPV typů 31 a 16.

Křížová reaktivita je snad jediná vada klinické metody Hc2, která výrazně snižuje specifitu testu. Castle a kol. (2008) uvádí ve své studii, že přesné odhalování každého typu HPV není přínosné, jelikož pouze snižuje klinickou specifitu. Hc2 sonda totiž stále může reagovat i s HPV typy, na které není přímo zacílená. Tyto necílené HPV typy se většinou vyskytují v multigenotypové koinfekci, nejsou karcinogenní, ale mohou vést k vysokému procentu pozitivních výsledků nepodložených žádnou cervikální neoplazií, čímž snižují specifitu testu. Tento fakt zdůrazňuje význam omezeného a uvážlivého využívání Hc2 u mladších žen, které mají vyšší pravděpodobnost multigenotypové koinfekce i v nízké rizikových lézích.

Tomu se dá do jisté míry vyvarovat cíleným upravením cut-off hodnoty. Musíme však brát v úvahu, že s navyšováním cut-off hodnoty sice roste specificita, ale za cenu nižší senzitivity a to vytváří tzv. „šedou zónu“ testu bez perfektní hranice. Ve článku od Castle a kol. (2008) je doporučovaná cut-off hodnota  $\geq 2,00$  RLU/CO, která by měla být kvantitativně přesnější.

Nejspolehlivějším postupem je tzv. dvojité testování, kdy stanovení Hc2 doplníme jinou metodou (např. Cobas nebo Aptima HPV Assay) a tím redukuje možné chyby vzniklé cross-reaktivitou Hc2 sondy. (Preisler a kol, 2016)

Česká národní referenční laboratoř pro metodu Hc2 doporučuje vzorky s hodnotami okolo 1,00 RLU/CO opakovaně testovat, popřípadě doporučit nový odběr. Každopádně by se tyto vzorky neměly jednoznačně označovat za pozitivní.

V našem výzkumu jsme výsledky Hc2 interpretovali pomocí 2 rozdílných hodnot cut-off, pro názornou představu:

- Při cut-off 1,00 RLU/CO jsme typizováním pomocí sondy 16/18/45 získali 76 pozitivních výsledků.
- Při cut-off 2,5 RLU/CO jsme při stejném procesu získali 69 pozitivních výsledků.

Můžeme vidět, že rozdíl mezi těmito hraničními liniemi je 6 %. Nicméně i při vyšší cut-off hodnotě celkový počet pozitivních výsledků stále není správný.

Pomocí metody Aptima HPV Assay jsme za použití typizační sondy HPV 16, 18/45 zjistili 57 pozitivních výsledků, které pak byly potvrzeny jako správně pozitivní specifickou multiplex PCR pE6/E7 se zaměřením na HPV typy 16, 18 a 45.

Když porovnáme výsledek Hc2 typizace s cut-off hodnotou 1,00 RLU/CO a výsledek typizace metodou Aptima, vyjde nám počet nesouhlasných vzorků 19.

Těchto 19 vzorků ukázalo na HPV typy, které zapříčinily diskrepanci výsledků. Byly to (sestupně řazeno) HPV typu 31, 52, 33, 56, 35, 67, 39, 58, 73 a CP6108. Přičemž největší podíl nese HPV typ 31.

Z naší studie vyplývá, že pro genotypizaci HPV typů 16, 18 a 45 je lepší využívat metodu Aptima HPV Assay díky její lepší specifitě a vhodné klinické citlivosti. Vzhledem k tomu, že využívá stanovení mRNA onkogenů E6 a E7, které vedou k buněčné transformaci, zachycuje tak momentální stav v organismu. Nikoliv možné přetrvávající stopy HPV DNA, které někdy mohou ve sliznici děložního hrdla perzistovat, aniž by měli vliv na normální buněčné pochody a maligně transformovali buňky svého hostitele.

## ZÁVĚR

Obě doporučené screeningové metody (Hc2 a Aptima) mají srovnatelné charakteristiky pro detekci celého spektra HR-HPV typů v cervikálních lézích těžkého stupně. Rozcházejí se až v genotypizačním stanovení, kdy metoda Hc2 projevila nízkou specifitu detekce HPV 16/18/45 ve srovnání s Aptima genotypizační detekcí HPV 16, 18/45 (konkrétně 84 % versus 100 %).

Za tuto neshodu může zkřížená reaktivita Hc2 genotypizační sondy, která chybně reaguje nejčastěji s HPV typem 31. Pravděpodobně kvůli sekvenční podobnosti genetické informace HPV typu 31 a 16. Nízká specifita genotypizační sondy Hc2 HPV 16/18/45 přitahuje vědeckou pozornost a dává příležitost pro navržení a vytvoření nové specifitější sondy pro detekci DNA HPV typů 16/18/45. Vytvoření specifitější genotypizační sondy pro Hc2 by mohlo poskytnout také lepší obraz epidemiologie karcinomu děložního hrdla.

Při aktuální situaci bych pro screening HR-HPV typů a hlavně genotypizační stanovení HPV typů 16, 18/45 doporučila metodu **Aptima HPV Assay**, která stanovením HPV typů 16, 18/45 ve vysokém stupni cervikálních lézí poskytla 100 % správné výsledky.

Data a výstupy této klinické studie byly revidovány odbornou komisí a přijaty a publikovány na lékařské vědecké konferenci USCAP 2017 v San Antoniu, Texas, USA. Posterová prezentace z konference je přiložena v příloze č. 5.

## LITERATURA A PRAMENY

1. **ALBERTS, Bruce.** 2006. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, Bohumil BOUZEK, Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-2-0.
2. **APTIMA**, příbalový leták. 2011. Gen-Probe Incorporated 502182CS. Rev. A. © 2007-2011
3. **BEDNÁŘ, Marek.** 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
4. **CASTLE E. P., D. SOLOMON, C. M. WHEELER, P. E. GRAVITT, S. WACHOLDER and M. SCHNIFFMAN.** 2008. Human Papillomavirus Genotype Specificity of Hybrid Capture 2. Journal of Clinical Microbiology. Roč. 46, č. 8. ISSN 2595-2604.
5. **CIBULA, David a Luboš PETRUŽELKA.** 2009. Onkogynekologie. Praha: Grada. 616 s. ISBN 978-80-247-2665-6.
6. **DOORBAR J., W. QUINT, L. BANKS, I. G. BRAVO, M. STOLER, T. R. BROKER, M. A. STANLEY.** 2012. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. Vaccine, Elsevier. 30S F55-F70.
7. **FAIT, Tomáš.** 2009. Očkování proti lidským papilomavirům: kvadrivalentní HPV vakcína Silgard tři roky v klinické praxi. Praha: Maxdorf. Preventivní medicína, 1. 118 s. ISBN 978-80-7345-204-9.
8. **GOMOLČÁKOVÁ, Barbora.** 2015. Stratifikácia rizika progresie ochorenia u pacientok s abnormálnym cytologickým nálezom krčka maternice pomocou molekulárno-genetickej analýzy vybraných biologických faktorov. Praha, diplomová práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Genetika, molekulární biologie a virologie.

9. **KAŠPÍRKOVÁ, J., O. ONDIČ, K. ČERNÁ, a A. SKÁLOVÁ.** 2013. Možnosti průkazu biologicky relevantní papilomavirové infekce u maligních nádorů hlavy a krku v diagnostické patologii. Česko-Slovenská patologie. Roč. 49, č. 1, s. 29-34. ISSN 1210-7875
10. **LACO, Jan.** 2012. Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Praha: Galén. 163 s. ISBN 978-80-7262-874-2.
11. **PREISLER S., M. REBOLJ, D. M. EJEGOD, E. LYNGE, C. RYGAARD and J. BONDE.** 2016. Cross-reactivity profiles of hybrid capture II, cobas, and APTIMA human papillomavirus assays: split-sample study. BMC Cancer. DOI:10.1186/s12885-016-2518-4
12. **PRŮŠA, Richard.** 1997. Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova. 45 s. ISBN 80-238-0940-7.
13. **RACEK, Jaroslav.** 2006. Klinická biochemie. 2. přeprac. vyd. Praha: Galén. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
14. **STANĚK, Libor.** 2013. Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii. Česko-Slovenská patologie. Roč. 49, č. 3, s. 119-121. ISSN 1210-7875.
15. **SZAREWSKI, A., MESHER, D., CADMAN, L., et al.** 2012. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. J ClinMicrobiol. 50 s. ISSN 1867–1873.
16. **ŠMARDA, Jan.** 2005. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
17. **TURYNA, Radovan, Jiří SLÁMA a Václav HEJDA.** 2010. Kolposkopie děložního hrdla. 1. Vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-679-3.

Internetové zdroje:

- 18 **GROGAN M. Thomas a spol.** Interpretation Guide for Ventana INFORM<sup>®</sup> HPV Probes In Situ Hybridization (ISH) Staining of Cervical Tissue. [online]. Ventana Medical Systems, Inc., ©2006 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: [http://www.uclad.com/newsletters/HPV\\_ISH\\_Tissue-Probe-Interpretation\\_Guide.pdf](http://www.uclad.com/newsletters/HPV_ISH_Tissue-Probe-Interpretation_Guide.pdf)
- 19 Hybridizace in situ. *WikiSkripta* [online]. 2008 [cit. 2017-02-24]. ISSN 18046517. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Hybridizace\\_in\\_situ&oldid=340163](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Hybridizace_in_situ&oldid=340163)
- 20 Hybridizační metody. *LabGuide* [online]. 2014 [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/hybridizacni-metody/>
- 21 **KAŠPÍRKOVÁ, Jana a Ondrej ONDIČ.** Stručný přehled komerčních souprav pro detekci slizničních lidských papilomavirů (HPV). In: *Mladá fronta: postgraduální medicína* [online]. Praha: Mladá fronta, ©2013 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/strucny-prehled-komercnich-souprav-pro-detekci-sliznicnich-lidskych-papilomaviru-hpv-473059>
- 22 **ONDRUŠ, Jiří a Vladimír DVOŘÁK.** Přirozený průběh infekce virem lidských papilomatózních lézí (HPV) a kancerogeneze děložního hrdla. In: *Mladá fronta: postgraduální medicína* [online]. Praha: Mladá fronta, ©2008 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/prirozeny-prubeh-infekce-virem-lidskych-papilomatoznich-lezi-hpv-338168>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPV – Lidský papilomavirus

DNA – deoxyribonuklová kyselinami

RNA – ribonukleová kyselinami

mRNA – messenger ribonukleová kyselinami

IACR – International Agency for Research on Cancer

LR-HPV – low risk HPV, nízké rizikové lidské papilomaviry

HR-HPV – high risk HPV, vysoce rizikové lidské papilomaviry

URR – upstream region

LCR – long control regionem

poly-A – polyadenilová oblast

AMK – aminokyselina

CDK – cyklin dependentní kináza

CIN – cervikální intraepiteliální neoplazie

WHO – World Health Organization, světová zdravotnická organizace

CGIN – cervikální glandulární intraepiteliální neoplazie

AIS – adenokarcinom in situ

LSIL – low grade/ nízké riziková skvamózní inatraepiteliální léze

HSIL – high grade/ vysoce riziková skvamózní inatraepiteliální léze

Hc2 – Hybrid capture 2

FDA – Food and Drug Administration

RLU – relativní světelná jednotka

PPV – pozitivní prediktivní hodnota

PCR – polymerázová řetězová reakce

DOP – degenerovaný oligonukleotidový primer

UV – ultra fialové

ds DNA – dvouvlákonová DNA

ss DNA – jednovláknová DNA

ISH – in situ hybridizační test

AHPV – Aptima HPV test

PP – promývací pufr

SUB A – substrát A

SUB B – substrát B

SA-HRP – Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate

RLU/CO – relativní světelná jednotky vztažená k průměrné světelné hodnotě kontrol

DN – denaturační roztokem

pLA – reverzní hybridizace LINNEAR Array

LBC – liquid based cytology, cytologie na tenké vrstvě

STM – specimen transport medium

REAG/DET – detekční činidlo

PRM – primer

H<sub>2</sub>O – voda

HPV MMX – HPV mastermix

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka č. 1: Závislost hodnot na výsledku vzorku .....	35
Tabulka č. 2: Souhrn hodnot HR-HPV sond .....	39
Tabulka č. 3: Souhrn hodnot genotypizačních sond 16, 18, 45 .....	39

## SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Zastoupení věků pacientů použitých vzorků .....	26
Graf č. 2: Zastoupení cytologických nálezů v použitých vzorcích .....	27
Graf č. 3: Histologické nálezy u použitých vzorků .....	28
Graf č. 4: Detekce DNA Hc2 13 HR-HPV typů .....	37
Graf č. 5: Genotypizační detekce DNA Hc2 HPV typů 16, 18, 45 .....	37
Graf č. 6: Detekce mRNA APTIMA Assay 14 HR-HPV typů .....	38
Graf č. 7: Genotypizační detekce mRNA APTIMA HPV typů 16, 18/45 .....	38
Graf č. 8: Zastoupení HPV typů pomocí metody PCR pE6/E7 HPV 16, 18, 45 ...	40
Graf č. 9: Zastoupení HPV typů ve vzorcích s diskrepantním nálezem .....	41

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1: Výsledek elektroforézy pro metodu PCR pE6/E7 – typy 16, 18, 45 (HPV)	31
Obr. č. 2: Výsledek metody LINNEAR ARRAY.....	34

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Životní cyklus HPV

Příloha č. 2: Organizace genomu HPV

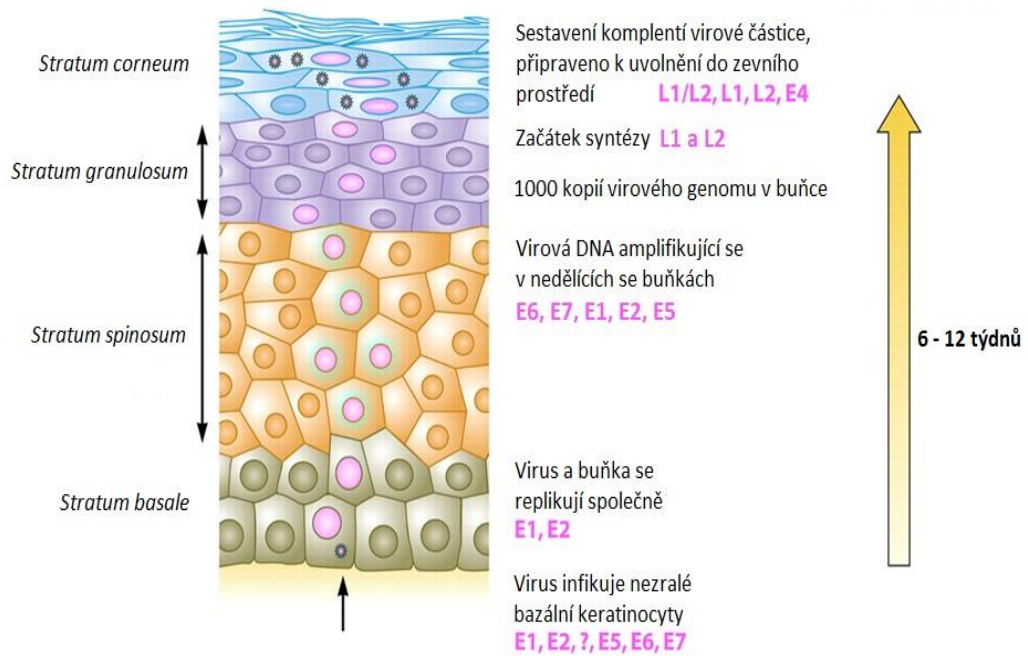
Příloha č. 3: Vývoj prekancerózy v karcinomu

Příloha č. 4: Posuzování konkrétní formy HPV infekce ve tkáni děložního hrdla pomocí in situ hybridizační sondy *INFORM HPV III Family 16 Probes (B)* od firmy *Ventana Medical System, Inc.*

Příloha č. 5: Výstup studie v podobě posteru na konferenci USCAP 2017

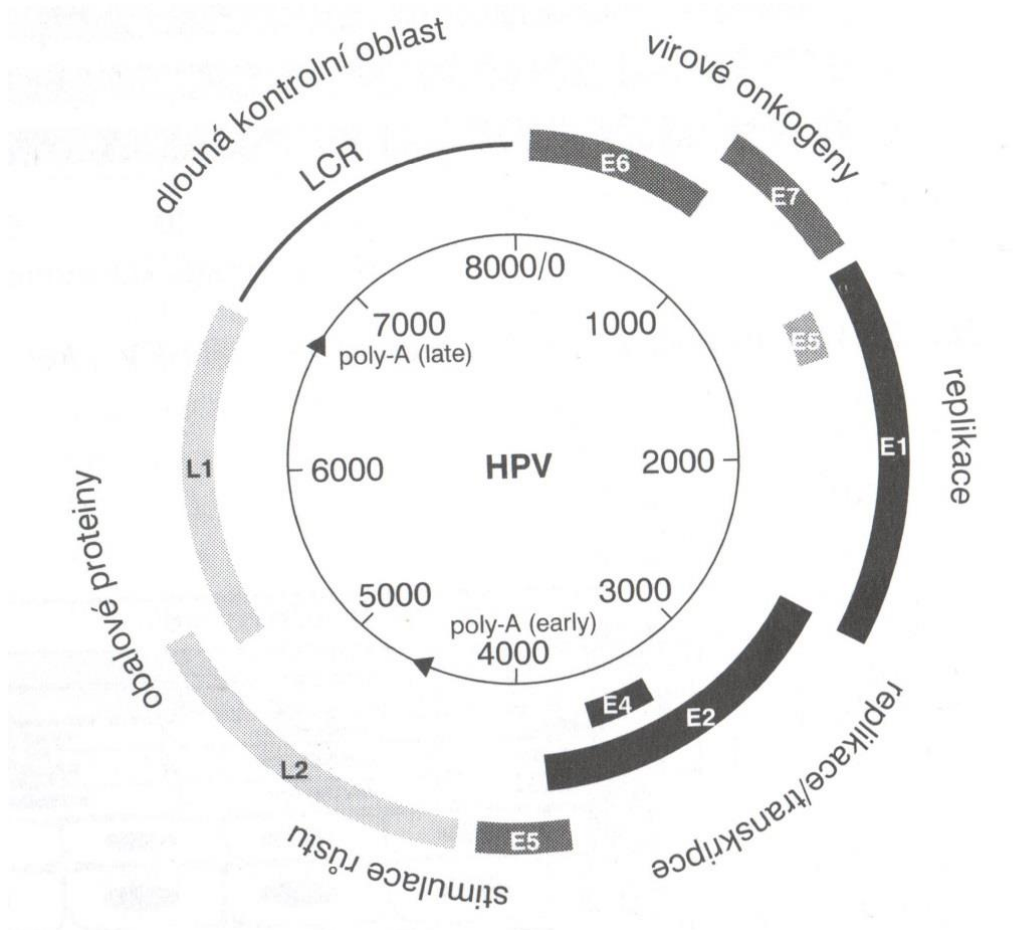
# PŘÍLOHY

## Příloha č. 1: Životní cyklus HPV



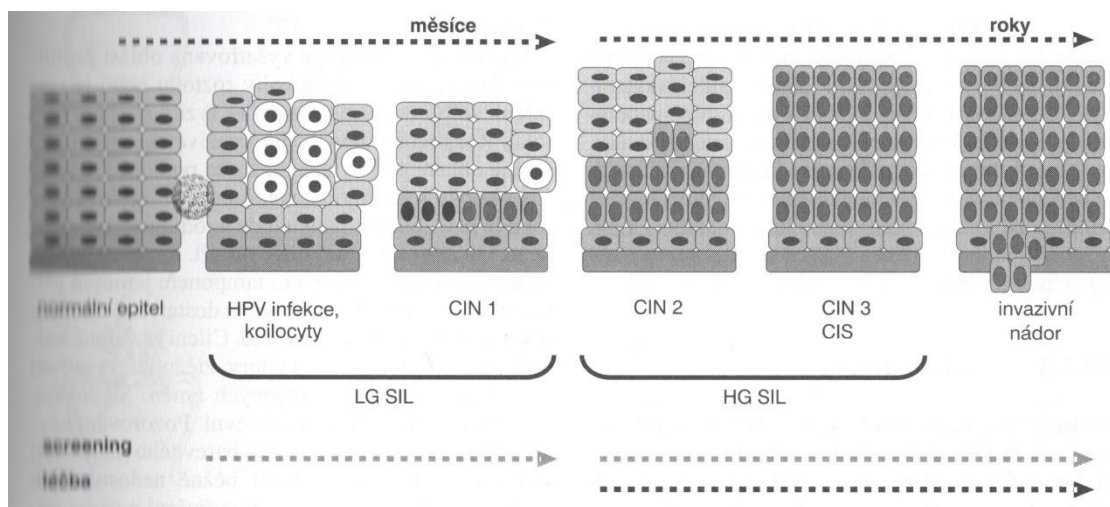
Zdroj: upraveno do češtiny z originálu od Margaret A. and Clin. Stanley. 2012. Microbiol. Rev.; 25:215-222

Příloha č. 2: Organizace genomu HPV



Zdroj: CIBULA, David a Luboš PETRUŽELKA. 2009. Onkogynekologie. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2665-6.

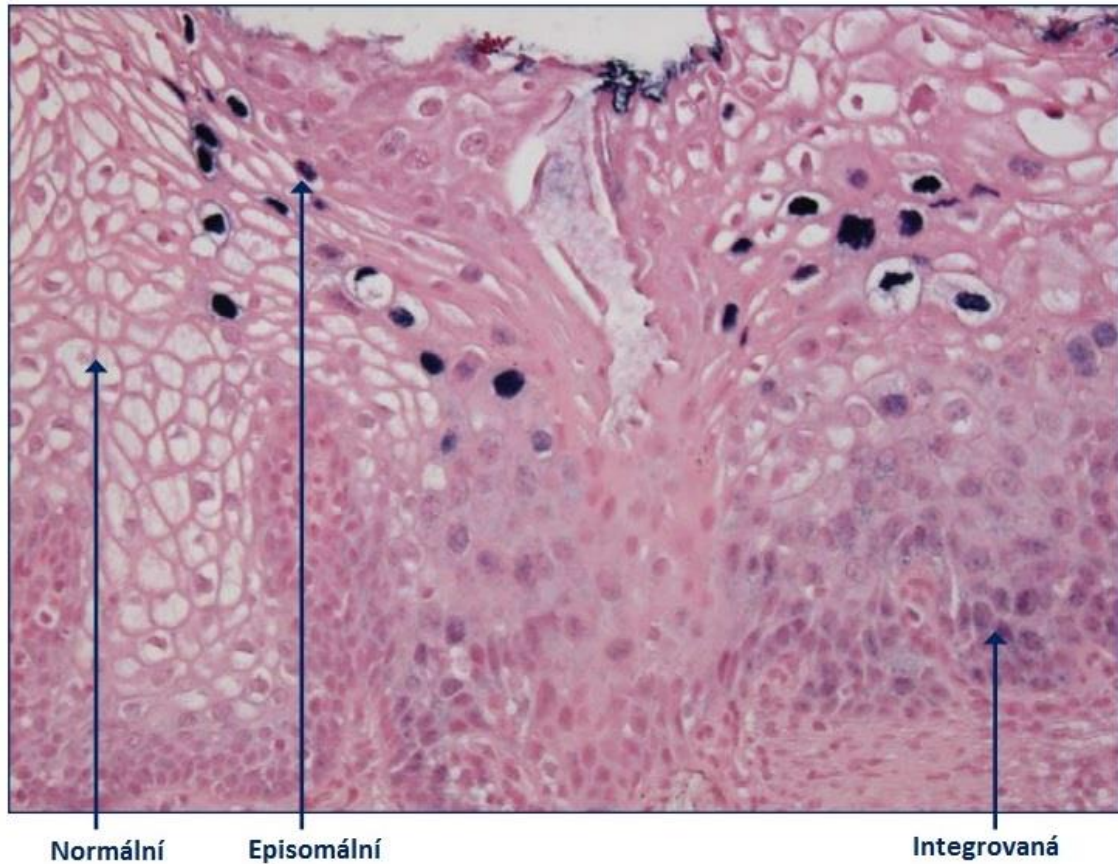
Příloha č. 3: Vývoj prekancerózy v karcinom



Zdroj: Zdroj: CIBULA, David a Luboš PETRUŽELKA. 2009. Onkogynekologie. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2665-6.




Příloha č. 4: Posuzování konkrétní formy HPV infekce ve tkáni děložního hrdla pomocí in situ hybridizační sondy *INFORM HPV III Family 16 Probes (B)* od firmy *Ventana Medical System, Inc.*




Zdroj: GROGAN M. Thomas a spol. Interpretation Guide for Ventana INFORM<sup>®</sup> HPV Probes In Situ Hybridization (ISH) Staining of Cervical Tissue. [online]. Ventana Medical Systems, Inc., ©2006 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z:

[http://www.uclad.com/newsletters/HPV\\_ISH\\_Tissue-Probe-Interpretation\\_Guide.pdf](http://www.uclad.com/newsletters/HPV_ISH_Tissue-Probe-Interpretation_Guide.pdf)



**mRNA-Based HPV Test Provides with More Accurate Genotyping Results for HPV16/18/45 than DNA-Based HPV Test in Cervical Cancer Screening**

*Jana Kaspirkova, Barbora Gomolcakova, Jana Cimicka, Ondrej Ondic, Michal Michal*



### BACKGROUND

- High-risk Human Papillomavirus (HR-HPV) testing is replacing cytology in cervical carcinoma (CaCx) screening as it is more sensitive for high-grade cervical lesions. Currently, it is widely used for triage of women with cytological abnormalities or as a co-testing with cytology or even as a primary tool for CaCx screening.
- Partial genotyping of HPV infection represents important added value of HPV test which includes different risk-based management of HPV positive patients or better control of recurrent disease.
- False negativity is rare of HPV tests which are clinically validated for CaCx screening purposes however not inconsiderable false positivity has been published for most of HPV tests resulting from their lower specificity.
- Common source of false positive results is a cross-reactivity of full-spectrum-HR-HPV probes (targeting 13-14 HPV) with non-oncogenic HPVs, well documented in Hybrid Capture 2 system.
- Probes targeting fewer HPV types, eg. 16/18/45 are supposed to have lower rate of cross-reactivity but data are scarce.

### OBJECTIVES

- 117 paired samples of Liquid-based cytology (LBC) and consecutive (within 1 year) punch or cone biopsy of the cervix rendering the diagnosis of HSIL were retrieved from the archive of Biopická laboratory as a study group for comparison of performance of two screening HPV tests.
  - DNA-based HPV test Hybrid Capture 2 (detecting full spectrum of HR-HPVs) and its variant for HPV16/18/45 genotyping
  - mRNA-based HPV test Aptima (detecting full spectrum of HR-HPVs) and its variant for HPV16/18/45 genotyping
- Discordant LBC samples were further genotyped using set of PCRs detecting three different genomic parts of alpha HPVs
- The rate of cross-reactivity for individual probes was calculated, considering two possible cut-off values for HC2 test (1.0 RLUICO, 2.5 RLUICO)

### METHODS

- Digene HC2 High-Risk HPV DNA Test (Qiagen) in vitro nucleic acid hybridization assay with signal amplification and chemiluminescence for the qualitative detection of 13 types of HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 69, and 68)
- Digene HC2 16/18/45 HPV DNA Test (Qiagen) in vitro nucleic acid hybridization assay with signal amplification and chemiluminescence for the qualitative detection of 3 types of HPV (HPV16, 18, and 45)
- Aptima HPV Assay (Hologic) in vitro nucleic acid hybridization assay with signal amplification and chemiluminescence messenger RNA (mRNA) from 14 types of HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 69 and 68)
- Aptima HPV 16/18/45 Genotyping assay (Hologic) in vitro nucleic acid amplification test for the qualitative detection of E6/E7 viral messenger RNA (mRNA) from 3 types of HPV (HPV16, 18, and 45)
- DNA isolation from LBC medium (ThinPrep; Qiamp® MiniElute® Virus Spin Kit)
- HPV genotyping: PCR targeting L1, E1, and E6/E7 genes of HPV, LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche)

### RESULTS

**Characteristics of study group**

- Mean age of diagnosis: 35 years (median 33 years)
- Cytological diagnosis (count): ASC-H (45), HSIL (67), HSIL susp. inv (1), AGC-NOS (2), AGC-NEO (1)
- Histological diagnosis (count): LSIL (5), HSIL (108), HSIL susp. inv (1), AIS (2), AIS inv. (1)

**Characteristics of HR-HPV status of LBC:**

- All but one sample were positive for Digene HC2 High-Risk HPV DNA Test (HC2) and Aptima HPV Assay (AHPV):
- Negative sample has cytological diagnosis ASC-H and LSIL in cone biopsy – false negativity of AHPV, borderline positivity of HC2, by PCR tested positive for HPV39 (HR)
- Both HC2 and AHPV tested positive in 3 HSIL samples with HPV07 (possible HR) even though HPV07 is not included in HR-HPV probes in both assays
- AHPV also tested positive in HSIL with HPV54 (LR-HPV)

**HPV 16/18/45 genotyping of LBC (Table 1)**

- By AHPV 49% of LBCs tested positive for HPV16/18/45
- By HC2, 66% of LBCs tested positive for HPV16/18/45 considering cut-off 1.0 RLUICO (Fig. 1); 57% of LBCs tested positive for HPV16/18/45 considering cut-off 2.5 RLUICO (Fig. 2).

**Comparison of results of partial genotyping of HSIL by AHPV and HC2 (cut-off 1.0)**

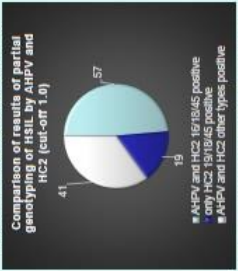


Figure 1: HPV 16/18/45 genotyping (cut-off 1.0)

**Comparison of results of partial genotyping of HSIL by AHPV and HC2 (cut-off 2.5)**

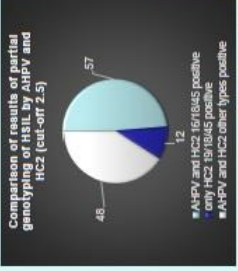


Figure 2: HPV 16/18/45 genotyping (cut-off 2.5)

**Table 1: HPV 16/18/45 genotyping of LBC**

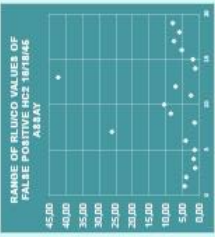
Assay	# Positive	%	Histological Diagnosis
AHPV 16/18/45	56	48	HSIL, AIS, AIS inv, HSIL susp inv
AHPV other HR-HPVs	60	53	HSIL, LSIL
HC2 cut-off 1.0 16/18/45	76	65	HSIL, AIS, AIS inv, HSIL susp inv
HC2 cut-off 1.0 other HR-HPVs	41	35	HSIL, LSIL
HC2 cut-off 2.5 HPV 16/18/45	69	59	HSIL, AIS, HSIL susp inv
HC2 cut-off 2.5 other HR-HPVs	48	41	HSIL, LSIL, AIS inv

**Table 2: Cross-reacting HPV types**

HPV TYPE	# POSITIVE	AVERAGE RLUICO
31	12	30.63
39	2	2.69
39*	1	1.11
39*	1	1.28
32	3	17.3
45*	2	1.97
38*	1	1.12
67	1	4.27
73*	1	1.12
CRS108*	1	42.40

\*MULTIPLE INFECTION ONLY

**Table 3: RLUICO values of cross-reading samples**



### CONCLUSIONS

- The recommended Hybrid capture 2 test and Aptima HPV Assay have great sensitivity for full spectrum HR-HPV detection in high-grade lesions
- Analytical specificity of both tests is negatively influenced by cross-reactivity with HPV types not included in HR-HPV probes, particularly HPV07 (possible HR) however it often increases clinical sensitivity
- Hybrid capture 2 assay for partial genotyping of HPV infection shows lower specificity for detection of HPV16, 18, 45 when compared to Aptima HPV 16 18/45 genotype assay (84% versus 100%, respectively)
- The most cross-reacting type is HPV31 probably due to its sequence similarity to HPV16
- The lower specificity of HC2 16/18/45 HPV genotyping test should attract more scientific attention because it might hampered management of HR-HPV positive patients and also give a distorted picture of epidemiology of cervical lesions

### REFERENCES

- An HPV 16, 18, and 45 genotyping test based on hybrid capture technology. Thai et al. J Clin Virol.
- Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. Castle et al. J Clin Microbiol.
- Cross-reactivity profiles of hybrid capture II, cobas, and Aptima human papillomavirus assays: split-type study. Pineda et al. J Clin Microbiol.
- Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. Castle et al. J Clin Virol.
- Human papillomavirus testing in primary cervical screening and the cut-off level for hybrid capture 2 tests: systematic review. Reddy et al. BMJ.

