

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Bakalářská práce

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

Lidské papilomaviry

Human papillomaviruses

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Voxová Barbora

Konzultant bakalářské práce: MUDr. Fajfr Miroslav, PhD.

Školitel bakalářské práce: RNDr. Dražd'áková Marcela

Hradec Králové, 2016

.....

Tereza Pourová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové, 2016

.....

Tereza Pourová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala PharmDr. Voxové z katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a MUDr. Fajfroví PhD., z oddělení Klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, za vedení této bakalářské práce a dále RNDr. Marcele Draždákové z STD laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za konzultaci a pomoc při zpracování této práce.

Také bych ráda poděkovala svým bývalým kolegyním z STD laboratoře, mé rodině a příteli za dlouhodobou podporu během studia.

OBSAH

1	ABSTRAKT	7
1	ABSTRACT	8
2	ÚVOD	9
3	ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	10
4	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	10
5	TEORETICKÁ ČÁST	11
5.1	Historie.....	11
5.2	Charakteristika	11
5.3	Dělení papilomavirů.....	13
5.4	HPV typy s nízkým rizikem.....	14
5.5	HPV typy s vysokým rizikem	16
5.6	Přenos a proliferační cyklus.....	17
5.7	Rizikové faktory.....	19
5.8	Rakovina děložního hrdla	19
5.9	Vakcinace.....	23
5.10	Léčba.....	25
6	PRAKTICKÁ ČÁST	27
6.1	Polymerázová řetězová reakce - PCR.....	27
6.1.1	Systém Cobas [®] 4800	27
6.1.2	Linear Array HPV Genotyping Test.....	29
7	PŘEHLED HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICI PRAHA	32
7.1	Přehled výsledků metodou Cobas [®] 4800.....	32
7.1.1	Celkové výsledky diagnostiky.....	33
7.1.2	Výsledky podílu jednotlivých genotypů u pozitivních vzorků.....	34
7.1.3	Výsledky diagnostiky podle věku vyšetřovaných	35

7.2	Přehled výsledků metodou Linear Array HPV Genotyping test.....	39
7.2.1	Celkové výsledky diagnostiky.....	39
7.2.2	Výsledky podle místa stěru	40
7.2.3	Výsledky podle věku vyšetřovaných.....	43
7.2.4	Výsledky převládajících genotypů	47
8	VÝSLEDKY HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICI PRAHA	48
9	PŘEHLED HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE FAKULTNÍ NEMOCNICI HRADEC KRÁLOVÉ	49
9.1	Přehled výsledků metodou PCR HPV4A ACE Screening kit (Seeplex).....	49
9.1.1	Celkové výsledky diagnostiky.....	50
9.1.2	Výsledky diagnostiky podle věku vyšetřovaných	51
10	VÝSLEDKY HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE FAKULTNÍ NEMOCNICI HRADEC KRÁLOVÉ.....	55
11	DISKUZE.....	56
12	ZÁVĚR.....	59
13	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	60
14	SEZNAM VYSVĚTLIVEK.....	61
15	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
16	SEZNAM GRAFŮ	63
17	SEZNAM TABULEK.....	64
18	POUŽITÁ LITERATURA A PRAMENY	65

1 ABSTRAKT

Cíl práce: Podání přehledu o obecné charakteristice lidských papilomavirů a nejrizikovějších genotypech. Vyhodnocení laboratorní diagnostiky ve Všeobecné fakultní nemocnici Praha a Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Metody: Soubor výsledků HPV diagnostiky u žen různého věku v období 2/2013 – 04/2014 a porovnání výsledků z obou nemocnic se zaměřením na nejčastější genotyp a nejrizikovější věkovou skupinu.

Výsledky: Ve Všeobecné fakultní nemocnici byly použity ke stanovení papilomavirů dvě laboratorní metody, u metody Cobas[®] 4800 bylo 28% vzorků pozitivních a u metody Linear Array HPV 35% vzorků. Stejný výsledek byl dosažen i u vzorků z Fakultní nemocnice Hradec Králové, kde se pozitivita pohybovala také kolem 35%. Nejvíce vzorků bylo pozitivních u žen ve věku 20 – 29 a nejčastějším genotypem byl HPV 16.

Závěr: Výsledky z obou nemocnic byly porovnány se studií českých žen autorů Tachezy a kol., které potvrdily výskyt nejčastějšího genotypu HPV 16 a také nejrizikovější skupinu žen ve věku 20 – 29 let. Rozdílné výsledky genotypů byly pouze u metody Cobas[®] 4800, které byly způsobené jinou skladbou pacientek, jelikož v našem souboru byly zařazeny jak vzorky od pacientek s různými obtížemi, tak pacientky zcela bez obtíží.

Klíčová slova: lidské papilomaviry, rakovina děložního čípku, laboratorní diagnostika HPV

1 ABSTRACT

Background: Is to give an overview of general characteristic of human papillomaviruses and the most dangerous genotypes. Evaluation of laboratory diagnostics from General faculty hospital in Prague and Faculty hospital in Hradec Králové.

Methods: Collection of HPV results from women of various ages between 2/2013 – 04/2014 and comparison of results from both hospitals with focus on the most common genotype and high risk age group.

Results: Two methods were used for assessment of papillomaviruses in General faculty hospital. With method Cobas[®] 4800 28% samples were positive. With method Linear Array HPV 35% of samples were positive. Same results were reached with samples at Faculty hospital in Hradec Králové. Where the positivity of results was around 35%. Most positive results were from women between the age of 20 – 29 and the most common genotype was HPV 16.

Conclusions: Results from both hospitals were compared with study of Czech women from authors Tachezy and collective. That confirmed that the most common genotype is HPV 16 and that the high risk group are women between 20 – 29 years old. Different results of genotypes were reached only with the method Cobas[®] 4800 which were caused by different composition of patients. Since patients with various health problems and also patients with no problems have been put into this collection.

Key words: human papillomaviruses, cervical cancer, laboratory diagnostics HPV

2 ÚVOD

Teoretická část

Tato část je zaměřena na obecnou charakteristiku lidských papilomavirů. Budou zde popsány obecné vlastnosti, rozdělení papilomavirů, jejich patogeneze, onemocnění, která způsobují, možnosti vakcinace a léčba.

Praktická část

Praktická část je věnována vysoce rizikovým genotypům a jejich laboratorní diagnostice v STD laboratoři Všeobecné fakultní nemocnice v Praze včetně zpracování a vyhodnocení výsledků.

Praktická část je také obohacena o srovnání výsledků HPV diagnostiky prováděné ve Všeobecné fakultní nemocnici Praha s výsledky z Fakultní nemocnice Hradec Králové. Toto srovnání znázorňují grafy, díky kterým lze získat přehled o výsledcích HPV diagnostiky a převládajících genotypch včetně výskytu HPV v různých věkových skupinách.

3 ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Tato práce je vypracována jako práce experimentální. Má podat základní informace o obecných vlastnostech, patogenezí a rizikovosti lidských papilomavirů a také nejčastějších genotypech.

4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této práce je seznámení se základní problematikou lidských papilomavirů, které patří k velmi rozšířeným patogenům a mohou vést až k maligním změnám. Dále pak zpracovat výsledky HPV diagnostiky prováděné ve Všeobecné fakultní nemocnici Praha za období 2/2013 – 04/2014 a tyto údaje porovnat s výsledky z Fakultní nemocnice Hradec Králové a zjistit tak výskyt HPV v populaci žen a nejrizikovější věkovou skupinu včetně nejčastějších genotypů HPV.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Historie

Klinické projevy infekce dolního genitálního traktu lidskými papilomaviry jsou v historii medicíny popisovány již po 2. tisíciletí. Genitální bradavice byly známé již za Hippokrata (460 – 377 př. n. l.). Za první pokus o identifikaci a charakterizaci papilomavirů lze považovat pokus z r. 1907 lékaře G. Ciuffa, který si inokuloval na vlastní předloktí hrubý filtrát z bradavic a ukázal tak, že agens, které je vyvolává, je přenosné (1).

Vlastní virová etiologie kožních bradavic byla potvrzena až v roce 1949, kdy byly pomocí elektronové mikroskopie zobrazeny virové částice v extraktu z těchto bradavic (1).

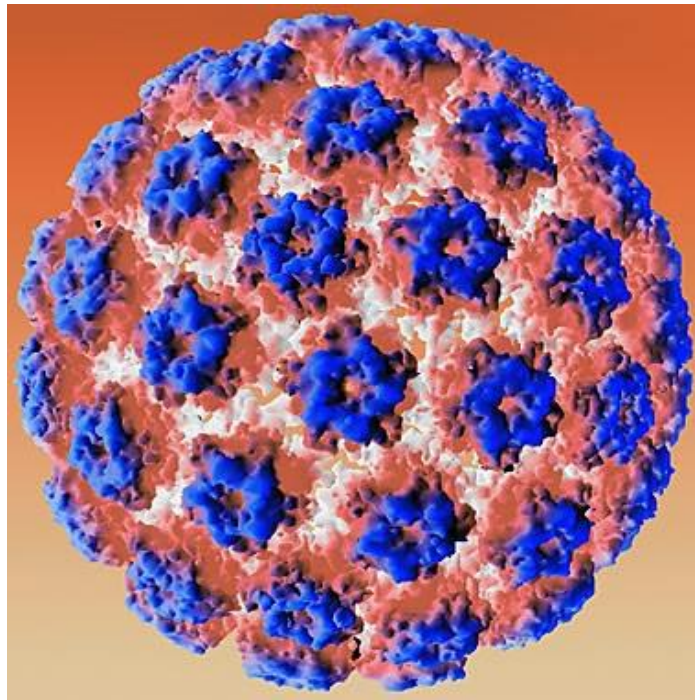
V roce 1983 pak zur Hausen, Gissmann a jejich spolupracovníci identifikovali HPV 16 v prekancerózách děložního hrdla (7). V roce 1985 byla prokázána HPV DNA v buňkách cervikálního karcinomu (24).

5.2 Charakteristika

Lidské papilomaviry patří mezi tzv. DNA viry, jejichž genom obsahuje DNA. Do roku 1999 byly tyto viry řazeny do čeledi *Papovaviridae*. Toto označení bylo zkratkou názvů hlavních představitelů této čeledi - papilomavirů, polyomavirů a tzv. vacuolating viru.

V současné době patří lidské papilomaviry do čeledi *Papillomaviridae*. Taxonomie této rozsáhlé čeledi, která zahrnuje 29 rodů se 189 papilomaviry savců, ptáků a plazů, je poměrně nepřehledná. Jednotlivé rody jsou označovány řeckými písmeny a lidské papilomaviry (celkem přes 130) jsou řazeny v pěti rodech Alfa, Beta, Gama, Mu a Nu papilomavirus (4).

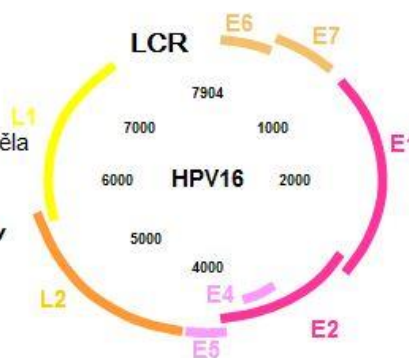
Papilomaviry patří mezi neobalené (bez lipoproteinového obalu) viry s kubickou (ikosaedrickou) symetrií, jejichž kapsida se skládá ze 72 kapsomer. Velikost viru se pohybuje kolem 55 nm. Kapsida se skládá ze dvou proteinů – hlavního kapsidového proteinu s molekulovou hmotností přibližně 56000 daltonů, menšího kapsidového proteinu o přibližně 76000 daltonech. Virus je jako většina neobalených virů značně odolný vůči zevnímu prostředí i běžným desinfekčním látkám, což vede například k prokázanému přenosu kožních papilomavirů ze společných sprch.



Obrázek 1 – Lidský papilomavirus (upraveno podle Oncogyn.com)

DNA papilomavirů je dvouzávitnicová, kruhově uspořádaná a obsahuje kolem 8000 párů bazí. Ve struktuře DNA jsou zastoupeny především úseky s transkripční funkcí, tzv. open reading frames (ORF). Jsou to jednak úseky E 1-8 (early transcription regions), kódující časně nestrukturální proteiny E 1-8. Dále jsou přítomny úseky L 1-2 (late transcription regions), které během produktivní fáze infekce kódují tvorbu strukturálních proteinů (L 1 kóduje tzv. hlavní kapsidový protein, L 2 vedlejší kapsidový protein). Mezi L 1 – E 6 leží nekodující úseky (NCR - non coding region) s nejasnou funkcí a dva úseky s funkcí kontroly virové replikace - long control region (LCR) a upper regulatory region (URR). (11).

- E1 - replikace
 - E2 - replikace a regulace transkripce
 - E4 - maturace virových částic
 - E5 - buněčná proliferace
stimulace účinků různých růstových faktorů lidského těla
 - E6 - degradace genu p53
 - E7 - degradace pRb
- } transformace nakažené buňky
- L1 - hlavní bílkovina kapsidy
 - L2 - menší bílkovina kapsidy



Obrázek 2 – Organizace genomu papilomavirů (upraveno podle Roche.cz)

5.3 Dělení papilomavirů

V současnosti je známo více než 130 typů lidských papilomavirů. Podle rozdílů v sekvencích pro jednotlivé proteiny se papilomaviry dělí do rodů, z nichž nejvýznamnějšími jsou Alphapapillomavirus, kam jsou například řazeny genitální papilomaviry s vysokým rizikem vzniku maligní léze a Betapapillomavirus, jejichž zástupci způsobují zejména infekce v latentní formě a aktivují se především při snížené obranyschopnosti (8, 23).

Existuje celá řada jiných klasifikačních kritérií pro jejich dělení. HPV viry tak lze také rozdělit na základě jejich tkáňové specifity na kožní a slizniční typy. Používanější a klinicky významnější je dělení vycházející z rizika vyvolání nádorových změn děložního čípku. Dle klasifikace Světové zdravotnické organizace jsou lidské papilomaviry řazeny mezi vysoce rizikové (high risk, HR genotypy), kam patří skupina 1 a 2A a mezi nízko rizikové (low risk, LR genotypy), kam je řazena skupina 3. Skupina 2B pak zahrnuje genotypy, u kterých se zatím nepodařilo jasně prokázat vztah ke karcinomům děložního hrdla. Více v tabulce 1 (23).

Tabulka 1 – Dělení HPV dle maligního potenciálu na vznik karcinomu děložního hrdla

a) dělení dle WHO (upraveno dle citace 23)

Vysoce rizikové	Skupina 1	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
	Skupina 2a	68
	Skupina 2b	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82
Nízce rizikové	Skupina 3	6, 11

b) dělení na HR a LR (upraveno dle citace 9)

HPV LR	6, 11, 42, 40, 43, 44, 54, 61, 72, 81
HPV HR	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82

5.4 HPV typy s nízkým rizikem

HPV typy s nízkým rizikem mají za následek především vznik bradavic. Rozlišuje se několik typů: běžné bradavice – verrucae vulgares (např. plantární bradavice – verrucae plantares, štrápcovité bradavice – verrucae filliformes), ploché bradavice – verrucae planae juveniles a genitální bradavice – condylomata accuminata (viry, které způsobující vznik bradavic, jsou HPV 1, 2, 4, 7, 27, 57, 60, 65, z autoinokulace HPV 6 a 11 (19).

Nejčastější formou jsou verrucae vulgares, které se mohou vyskytovat kdekoli na sliznicích i těle. Jejich klinickou formou jsou například verrucae plantares, které se projevují jako hyperkeratotické „květákovité“ léze na ploskách (planta – chodidlo), rychle se šíří a recidivují. Verrucae filliformes se vyskytují nejčastěji v oblasti rtů nebo ústních koutků. Verrucae planae juveniles se tvoří zejména na tváři, rukou a na předloktí a na rozdíl od běžných bradavic nemají květákovitý vzhled, ale jsou ploché (6).

Pro oblasti genitálií je pak typický výskyt Condylomata accuminata. Nejméně častá jsou uretrální kondylomata, která v 70% případů postihují uretru v úseku do několika

centimetrů od zevního ústí a projevují se především změnami proudu moči, dysuriemi nebo krvavým výtokem. Zcela vzácným nálezem jsou kondylomata na sliznici močového měchýře (8).

Mezi slizniční benigní onemocnění lze řadit fokální epiteliální hyperplazii, která se u nás vyskytuje velmi zřídka, ale je endemickým onemocněním v populaci Eskymáků a severoamerických indiánů. Za toto onemocnění jsou zodpovědné typy HPV 13 a 32 (27).

K častějším onemocněním patří i papillomatóza laryngu. Vyskytuje se sporadicky u kojenců v důsledku prostupu porodními cestami matky a později ve věku kolem tří let. Infekce se může manifestovat i v podobě papilomů nazálních, konjunktiválních, na víčkách očních a v horních dýchacích cestách (19). Postihnout může i dospělé.

Tabulka 2 – Onemocnění a související typy HPV (upraveno dle citace 16)

Onemocnění	Časté HPV asociace	Méně časté HPV asociace
plantární bradavice	1, 2	4, 63
běžné bradavice	2, 1, 4	26, 27, 29, 41, 57, 65, 77
bradavice u lidí, kteří pracují s masem, drůbeží nebo rybami	7, 2	1, 3, 4, 10, 28
ploché a střední bradavice	3, 10	26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
verruciformní epidermodysplazie	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17	19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50, 93
condylomata acuminata	6, 11	16, 18, 31, 33, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 70
intraepiteliální neoplazie		26, 30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 67, 68, 69, 71, 81, 83
respirační papillomatóza	6, 11	16, 18, 31, 33, 35, 39
fokální epiteliální hyperplazie	13, 32	18, 33, 45
papillom spojivky	6, 11, 16	
ostatní kožní léze		36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 88, 92, 93, 94, 95, 96, 107, 110, 111
ostatní genitální léze		30, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 97, 101, 102, 103, 106

5.5 HPV typy s vysokým rizikem

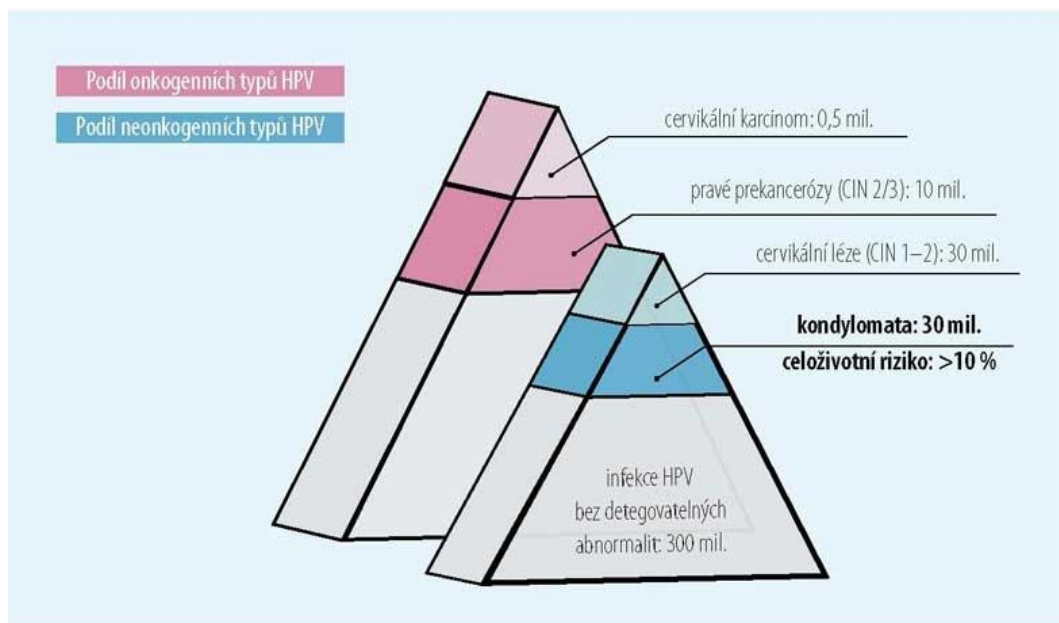
HPV typy s vysokým rizikem jsou hlavní příčinou vzniku prekanceróz a následně i karcinomů.

Prekancerózy jsou patologické změny tkáně, které nelze definovat jako nádorové bujení, ale které za určitých okolností mohou ve zhoubné nádorové bujení přejít (30). Od maligních nádorů se liší zejména schopností spontánního zhojení. Mezi nejčastější typy prekanceróz patří vulvární vaginální intraepiteliální neoplazie (VaIN), intraepiteliální neoplazie (VIN) a cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN).

Za určitých okolností mohou prekancerózy přecházet do stádia malignit. Mezi nejčastější malignity patří karcinom děložního hrdla. Tento karcinom je v 70% spojen s HR-HPV typu 16 a 18 (9). Vysoce pravděpodobná je i souvislost HPV se vznikem karcinomu orofaryngu a rakoviny v anální oblasti.

Tabulka 3 – Karcinomy asociované s HPV infekcí v USA v letech 2004 - 2007 (upraveno dle citace 23)

Lokalizace	Průměrný počet onemocnění ročně	Asociace HPV infekce	HPV 16/18
děložní hrdlo	11845	11370	9000
vagina	714	460	400
vulva	3062	1560	1350
anus a rektum	2977	2770	2590
orofarynx	2306	1450	1380
ženy (celkem)	20903	17610	14720
penis	1000	360	310
anus a rektum	1618	1500	1410
orofarynx	8936	5630	5360
muži (celkem)	11553	7490	7080



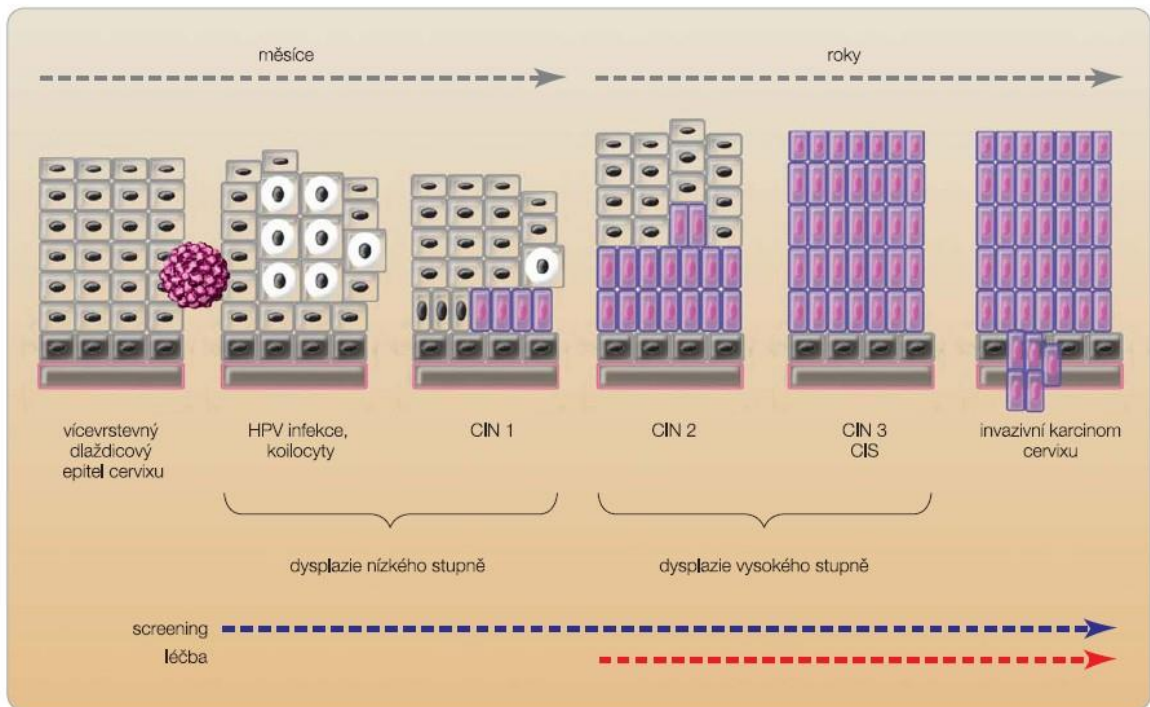
Obrázek 3 – Četnost projevů infekce viru HPV (upraveno podle hpv-guide.cz)

5.6 Přenos a proliferační cyklus

Místem vstupu HPV do organismu jsou mikrotraumata kůže a sliznice. Nejčastějším způsobem přenosu genitálních papilomavirů je sexuální styk, možný je i nepohlavní přenos, kdy se mohou papilomaviry přenášet na pohlavní orgány z rukou nebo úst. Není ani vyloučen přenos přes infikované prádlo vyšetřovaných osob nebo autoinokulací viru prsty. Přípouštěn je i přenos z matky na dítě nebo přímým kontaktem s kůží.

U negenitálních papilomavirů probíhá přenos hlavně ve veřejných zařízeních, jako jsou bazény nebo sprchy a to přímým kontaktem kůže s kontaminovaným povrchem. Přenos je možný i autoinokulací, kdy škrábáním postiženého místa dochází k šíření bradavic do okolí.

Životní cyklus virů je spojen s diferenciací keratinocytů (epiteliální buněk). Po vstupu do organismu se papilomaviry replikují v příslušných permissivních buňkách, zvláště v buňkách dlaždicového epitelu a predilekčně v oblasti metaplastického dlaždicového epitelu (11). Zralé virové partikule se tvoří v rámci replikačního cyklu až v terminálně diferencovaných keratinocytech (27).



Obrázek 4 – Vývoj HPV infekce (upraveno podle remedia.cz)

Inkubační doba od infekce k objevení se prvních klinických příznaků je 1 až 6 měsíců (14). Hlavní význam HPV infekce pro rozvoj závažných onemocnění plyne z perzistence viru v epitelálních buňkách (řádově roky) a v integraci virového genomu HR HPV do buněčného jádra (19).

S infekcí se alespoň jedenkrát za života setká více jak 75 – 80% sexuálně aktivní populace. Ve většině případů je však HPV infekce během jednoho roku eliminována imunitním systémem a nedojde k rozvoji onemocnění (23).

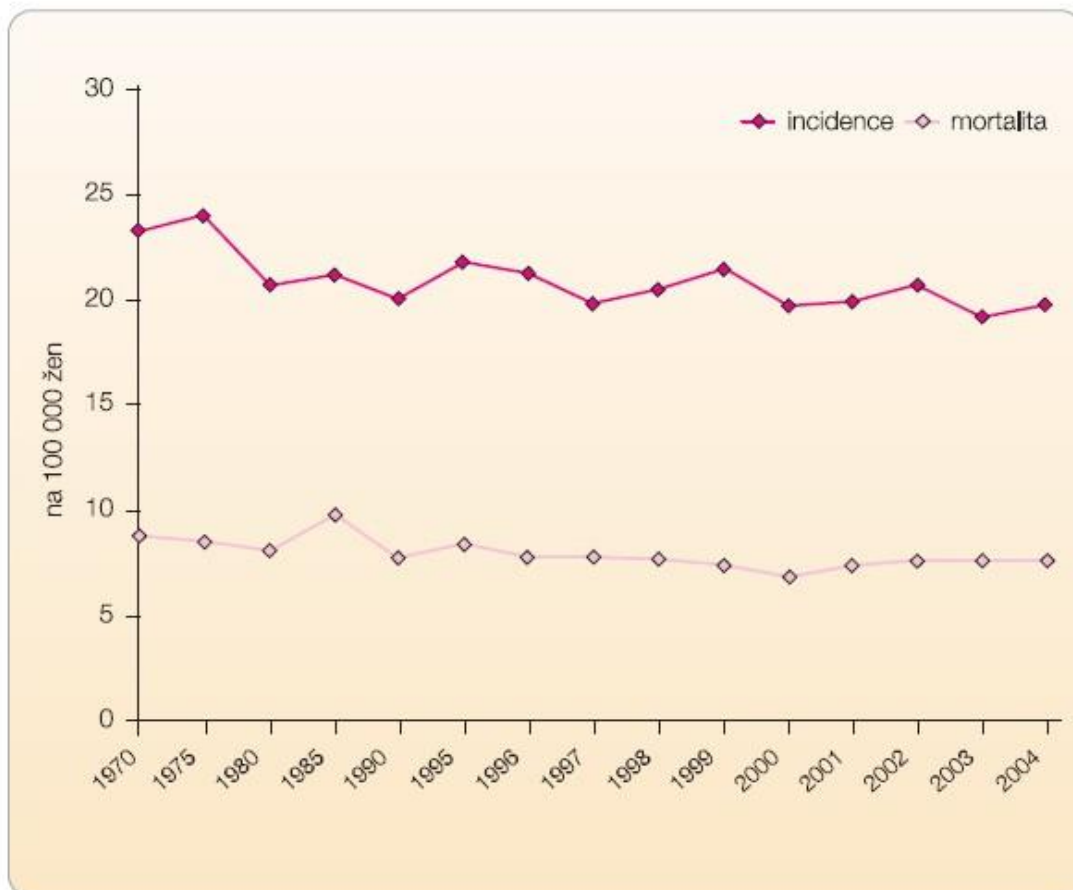
5.7 Rizikové faktory

Jelikož je HPV infekce přenášena především pohlavním stykem, největším rizikovým faktorem je střídání sexuálních partnerů při nechráněném pohlavním styku, a to jak u žen, tak i u mužů. Rizikovost stoupá i s proděláním většího počtu porodů. Nevylučuje se ani možnost, že jsou více náchylné osoby, které trpí jinou pohlavně přenosnou chorobou. Dalším faktorem bývá oslabená imunita, proto jsou k HPV infekcím více citlivé například osoby HIV pozitivní nebo pacienti, kteří podstupují imunosupresivní léčbu. Rizikovými osobami mohou být i lidé s cukrovkou nebo poruchou štítné žlázy.

V posledních letech bývá také odhalována nepřímá souvislost se vznikem onemocnění a karcinomu u žen, které užívají hormonální antikoncepci, jelikož tyto uživatelky mají zpravidla rizikovější chování – mívají vyšší počet partnerů, časnější koitarche (první pohlavní styk), častěji kouří, méně užívají bariérovou kontracepci jako prevenci STD a mají častější výskyt ektopie na čípku (5). V neposlední řadě může k HPV infekci přispět i genetická predispozice, nedostatečná hygiena a nepřímo i užívání drog či nižší socioekonomický status.

5.8 Rakovina děložního hrdla

Rakovina děložního hrdla je dle literatury druhou nejčastější rakovinou u žen na celém světě (20). Považuje se za prokázané, že za téměř všechny nádory děložního hrdla je zodpovědná infekce lidským papilomavirem. Incidence (počet nových onemocnění na 100 000 žen za rok) v České republice je v posledních 10 letech stále vysoká a to i přesto, že dochází k mírnému poklesu. Pohybuje se okolo 20/100 000. Mortalita (počet úmrtí na 100 000 žen za rok na toto onemocnění) je přibližně 8/100 000.



Obrázek 5 – Výskyt karcinomu děložního hrdla v ČR – vývoj incidence a mortality (upraveno podle remedia.cz)

Zhoubné nádory děložního hrdla jsou nalézány již u žen po 20. roce života, prvního vrcholu výskytu dosahují kolem 50. roku života, druhého, nižšího kolem 60. roku života (26).

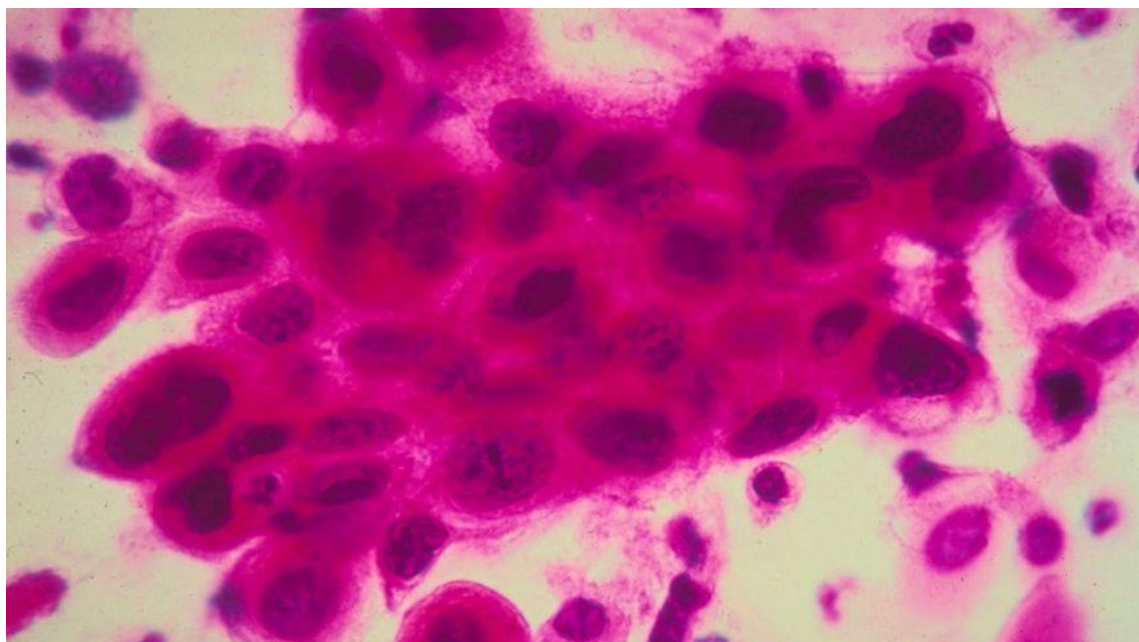
Ve více jak 70% jsou za vznik karcinomu děložního hrdla zodpovědné HPV typy 16 a 18. Ostatní genotypy se na kancerogenezi podílí jen zanedbatelně. Celý proces rozvoje rakoviny děložního čípku trvá několik let, výjimečně jsou popisovány rychlé průběhy s rozvojem karcinomu již do dvou let od nákazy.

Časná stádium probíhá bezpříznakově, proto je velice obtížné odhalit karcinom v počátcích. Pozdní příznaky jsou už pak projevem rozvinuté infekce a změn v děložním hrdle. Mezi ně patří krvácení mimo cyklus, krvácení po styku, bolest, výtok nebo potíže s močením.

K růstu karcinomu děložního čípku dochází zejména na povrchu cervixu. Exocervikální forma je častější a vytváří objemné květákovité křehké nádorové masy, které prominují do pochvy a kontaktně silně krvácejí. Naproti tomu endocervikální forma roste často dlouhou dobu zcela bez příznaků, s invazivním charakterem růstu směrem do parametrií, a rychle se šíří do lymfatické spádové oblasti. Mohou tak být postižena parametria, vaginální epitel, myometrium krčku a těla děložního, lymfatické uzliny paracervikální, parametriální, podél ilických arterií, presakrálně a sakrálně, dále inguinální a paraaortální uzliny (15).

Pro maligní bujení je charakteristická nejen nekoordinovaná buněčná proliferace, ale i schopnost infiltrativního růstu (25, 29). Pokud nádor roste do okolí, může dojít ke vzniku tumorózních píštělí až s tvorbou pseudokloaky. V pozdním stádiu se také vytvářejí často metastázy, nejčastěji do jater a plic.

K hledání změn na buňkách děložního čípku, které by mohly vést ke vzniku rakoviny, se používá cervikální screening (3). Tento screening je velmi důležitý pro prevenci a včasnou diagnostiku karcinomu. Díky němu se ve vyspělých zemích výrazně snížila incidence i úmrtnost.



Obrázek 6 – Nádorové buňky děložního čípku (upraveno podle cancer.org)

Průkaz prekanceróz děložního hrdla je možný pomocí prebioptických metod a cílené biopsie (12). Diagnostiku lze i provést pomocí zobrazovacích metod (CT vyšetřením, magnetickou rezonancí, radioizotopovou nefrografií nebo ultrazvukem), které pomohou zhodnotit také případné metastázy. Na základě těchto vyšetření se pak nález zařazuje do určitých stádií od toho nejlehčího, kdy je nádor omezen pouze na děložní čípek až po těžké, kdy nádor proniká do okolních orgánů a tvoří se metastázy.

Prekancerózy, změny cervikálních epiteliálních buněk, které mohou vést k rakovině děložního hrdla, byly historicky členěny několika klasifikacemi. Dnes dominuje Richardova klasifikace stupňů cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN). CIN 1 označuje nízký stupeň, který odpovídá lehké dysplazii, CIN 2 a CIN 3 jsou pak označovány jako vysoké stupně a jsou výsledkem středních až těžkých dysplazií, u kterých je riziko vzniku malignit několikrát vyšší než u nízkého stupně.

Tabulka 4 – Riziko maligního zvratu (upraveno dle citace 32)

CIN 1	riziko maligního zvratu 2%
CIN 2	riziko maligního zvratu 5%
CIN 3	riziko maligního zvratu 20%



Obrázek 7 – Karcinom děložního čípku (upraveno podle onkogyn.cz)

5.9 Vakcinace

Ačkoliv se lze před HPV do jisté míry chránit, například bariérovými kontracepčními pomůckami nebo prevencí v oblasti životního stylu, papilomaviry se přenáší i mimo pohlavní styk, proto nelze nikdy vyloučit možnost nákazy.

Důkazy o etiologické souvislosti HPV infekce s rozvojem karcinomu děložního hrdla vedly k vývoji profylaktických vakcín, jejichž základem je viru podobná částice (virus like particles, VLP) tvořená hlavním kapsidovým proteinem L1 (25). Principem profylaktické vakcíny je schopnost organismu vytvořit paměťové buňky a protilátky proti předložené struktuře (VLP). (10).

HPV vakcíny lze rozdělit do dvou skupin – vakcíny preventivní, jejichž aplikace navodí v organismu tvorbu neutralizačních protilátek schopných zabránit infekci, a vakcíny terapeutické (ve stádiu klinických zkoušek), které indukují tvorbu specifických imunitních buněk namířených proti časným virově specifickým proteinům, exponovaným na povrchu infikovaných/pozměněných buněk (13).

V současné době jsou k dostání dvě rekombinantní vakcíny – Cervarix (GlaxoSmithKline®) a Silgard (Merck®). Cervarix je bivalentní vakcínou, jelikož má antigenní složení VLP proti genotypům 16 a 18. Silgard je oproti tomu kvadrivalentní, účinkuje proti genotypům 6, 11, 16 a 18.

Očkování je vhodné pro dívky ve věku 9 – 25 let, ale vakcinovat lze i chlapce a ženy nad 25 let. Účinnost vakcíny proti HPV typ 16 a 18 je u dospívajících, kteří ještě nezahájili pohlavní život, blízka 100%. U dívek a žen, které již žijí pohlavním životem, se udává účinnost vakcíny 70 – 80% při normálním gynekologickém nálezů. Podle České gynekologicko-porodnické společnosti mohou být očkovány i ženy s abnormálním výsledkem cytologie, kondylomaty či ošetřenou prekancerózou v anamnéze, ale benefit vakcinace bude nižší (17).

Tabulka 5 – Základní charakteristiky vakcín (upraveno dle citace 25)

Název přípravku	Silgard/Gardasil	Cervarix
Cílová onemocnění	Prekancerózy děložního hrdla, závažné prekancerózy vagíny a zevního genitálu, karcinom děložního hrdla, kondylomata acuminata	Prekancerózy děložního hrdla, karcinom děložního hrdla
Intervaly i.m. očkování	0 – 2 – 6 měsíců	0 – 1 – 6 měsíců
Antigenní složení (VLP)	6 / 11 /16 / 18	16 / 18
Množství L1 VLP	20 µg HPV 6 40 µg HPV 11 40 µg HPV 16 20 µg HPV 18	20 µg HPV 16 20 µg HPV 18
Sérokonverze po dokončení očkovacího schématu	100%	100%
Ochrana proti jakýmkoliv CIN způsobeným HPV 16/18	94 – 100%	95 – 100%
Cílová věková skupina	9 – 26 let	10 – 25 let
Rekombinantní systém	Kvasinkový expresní systém v <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Bakulovirový expresní systém v <i>Trichoplusia</i>
Nežádoucí účinky	Nevýznamné	Nevýznamné
Doba sledování vakcinované populace	5 let	6,4 roku

Pro hodnocení činnosti HPV vakcín a přínos pro praxi jsou klinicky významné výsledky prevence onemocnění. Z dostupných studií je patrné, že mezi titrem protilátek a klinickou účinností není u HPV vakcíny přímá úměrnost. Délka ochrany obou vakcín je dosud prokázána na 5,5 let u kvadrivalentní, resp. 6,4 let u bivalentní vakcíny (10). I přesto je nutné u očkovanych žen pokračovat v cervikálním screeningu, protože současná vakcinace pokrývá přibližně 80% HPV infekcí.

U vakcín Cervarix a Silgard byla také prokázána tzv. zkřížená protekce. Díky tomu mohou být vakcinované ženy do jisté míry chráněny před vznikem anogenitálních lézí spojených s nevakcinálními typy HPV, které jsou fylogeneticky příbuzné s HPV typy obsažených ve vakcíně. Na přesném vysvětlení principu tohoto fenoménu se stále intenzivně pracuje.

5.10 Léčba

Léčba by měla být zahájena na základě objektivního klinického nálezu. V případě subklinické genitální infekce HPV (tj. bez přítomnosti kondylomat nebo intraepiteliálních lézí ověřených kolposkopií, biopsií, aplikací kyseliny octové nebo detekcí HPV laboratorními testy) není léčba doporučována. Genitální HPV infekce se často zhojí sama a také není známá léčba, která by infekci mohla eradikovat (31).

U symptomatických kožních či slizničních lézí, které jsou makroskopicky patrné, je cílem léčby především jejich odstranění. Většina lézí vyvolaných HPV se odstraňuje chirurgicky (excize kličkou, konizace laserem nebo skalpelem). Méně často se v některých případech používají destrukční techniky (kryoterapie, CO₂, laser). (27).

Chirurgicky lze zasáhnout i při léčbě karcinomu děložního hrdla, zejména v časných stádiích. U mikroskopických nádorů postačuje u žen plánujících těhotenství pouhé odstranění postižené části děložního hrdla. Takový operační zákrok se nazývá konizace. U žen s ukončenými reprodukčními plány je dostačující odstranění dělohy, nejčastěji poševním přístupem (26).

U pokročilých stadií, kdy dochází k šíření projevů do okolních tkání nebo orgánů, se používá ozáření, které bývá doplněno chemoterapií. U pacientek s pokročilým

onemocněním a tvorbou metastáz je podávána samostatná chemoterapie, především aplikace protinádorových léků (cytostatik).

6 PRAKTICKÁ ČÁST

V této kapitole bude probrána laboratorní diagnostika lidských papilomavirů v STD laboratoři Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

6.1 Polymerázová řetězová reakce - PCR

Polymerázová řetězová reakce je metoda používaná k množení (amplifikaci) specifického úseku DNA na principu replikace nukleových kyselin.

K syntéze nového vlákna DNA se používá enzym DNA polymeráza, nejčastěji pak polymeráza získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Tag polymeráza), který je schopný syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA. Protože metoda PCR využívá amplifikace hledaného specifického úseku nukleových kyselin, je schopna detekovat i jeho velmi malé množství.

PCR reakci lze rozdělit na 3 části. V první fázi dochází k denaturaci DNA, při které se rozruší vodíkové můstky a uvolní se dvoušroubovice (denaturation). V druhé fázi dojde k nasednutí (annealing) primerů na komplementární 3' konce DNA, kam se také naváže DNA-polymeráza. Ve třetí fázi dochází k syntéze DNA, kdy je ve směru od 5' konce k 3' konci dotvořeno (elongation) vlákno DNA komplementární k původní molekule.

Produkty reakce se nazývají amplikony. PCR obecně probíhá v přístroji zvaném cycler, který provádí rychlé cyklické změny teploty, při kterých je umožněna denaturace DNA, navázání primerů na oba řetězce denaturované DNA a dotvoření komplementárních řetězců. Při každém cyklu se počet amplikonů zdvojnásobí (2).

6.1.1 Systém Cobas® 4800

Systém Cobas® 4800 je plně automatizovaný systém od přípravy vzorků po vlastní polymerázovou řetězovou reakci. Test specificky detekuje HPV 16 a HPV 18 a současně

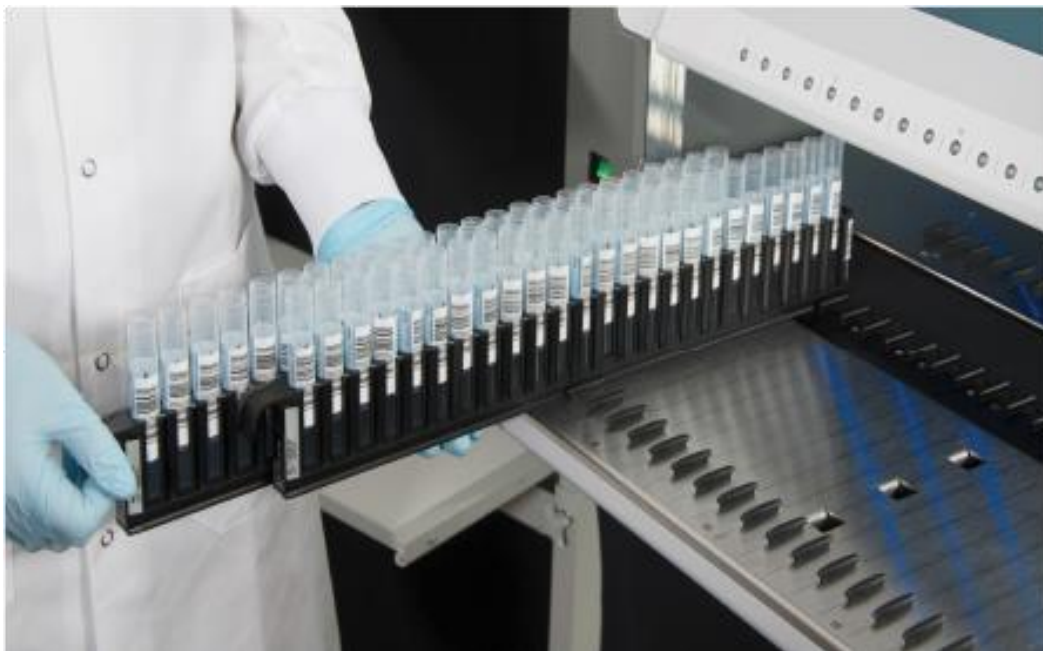
detekuje i přítomnost vysoce rizikových typů (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68).

Cobas[®] 4800 HPV pracuje ve dvou základních krocích. Prvním je automatizovaná příprava vzorků pro simultánní extrakci HPV z buněčné DNA. Ve druhé fázi dochází k amplifikaci cílových sekvencí HPV DNA pomocí párů specifických primerů s detekcí produktu v reálném čase pomocí značených sond. Souběžná extrakce, amplifikace a detekce β -globinu v testu Cobas[®] 4800 HPV monitoruje celý postup testu jako interní kontrola reakce (21).



Obrázek 8 – Cobas[®] 4800 (upraveno podle roche.com)

Vlastní detekce výsledného produktu reakce probíhá na obecném principu hydrolyzační sondy, kdy oligonukleotid sondy je značen dvěma látkami. Jedna funguje jako vlastní fluorofor (nositel fluorescenčního signálu) a druhá jako jeho zhášec. Při správném nasednutí sondy na komplementární vlákno je při elongační fázi každého PCR cyklu 5' - 3' nukleázovou aktivitou DNA polymerázy (v tomto případě EagleZ05 DNA polymerázy) zhášec hydrolyticky odštěpen a tím dojde k emitaci světelného signálu o specifické vlnové délce v závislosti na použitém fluoroforu. Tato specifická vlnová délka pro každé barvivo umožňuje nezávisle změřit HPV 16 amplikon, HPV 18 amplikon, jiné vysoce rizikové amplikony (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) a β -globinovou kontrolu, protože sondy specifické pro tyto sekvence jsou označeny různými barvivy (21).



Obrázek 9 – Příprava vzorků pro vyšetření (upraveno podle roche.com)

Veškerou validaci testů a cyklů provádí software Cobas[®] 4800, který vyhodnotí pozitivní vysoce rizikové genotypy jako POS HR HPV a negativní jako NEG HR HPV. Cobas[®] 4800 dále rozlišuje dva nejrizikovější HPV typy (HPV 16 a 18), které vyhodnocuje samostatně jako POS HPV 16 a POS HPV 18.

Negativní výsledek nevylučuje přítomnost HPV infekce, protože výsledky závisí na adekvátním odběru vzorku, absenci inhibitorů a dostatečném množství DNA k detekci.

6.1.2 Linear Array HPV Genotyping Test

Linear Array HPV Genotyping test je kvalitativní „in vitro“ test pro detekci lidských papilomavirů. Tento test využívá amplifikace cílové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce a hybridizace nukleové kyseliny a detekuje 37 anogenitálních typů HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39, a CP6108).



Obrázek 10 – Linear Array HPV Genotyping test (upraveno podle roche.com)

Vyšetření se provádí z cervikálních buněk odebraných do odběrného média Cobas® PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt® Solution.

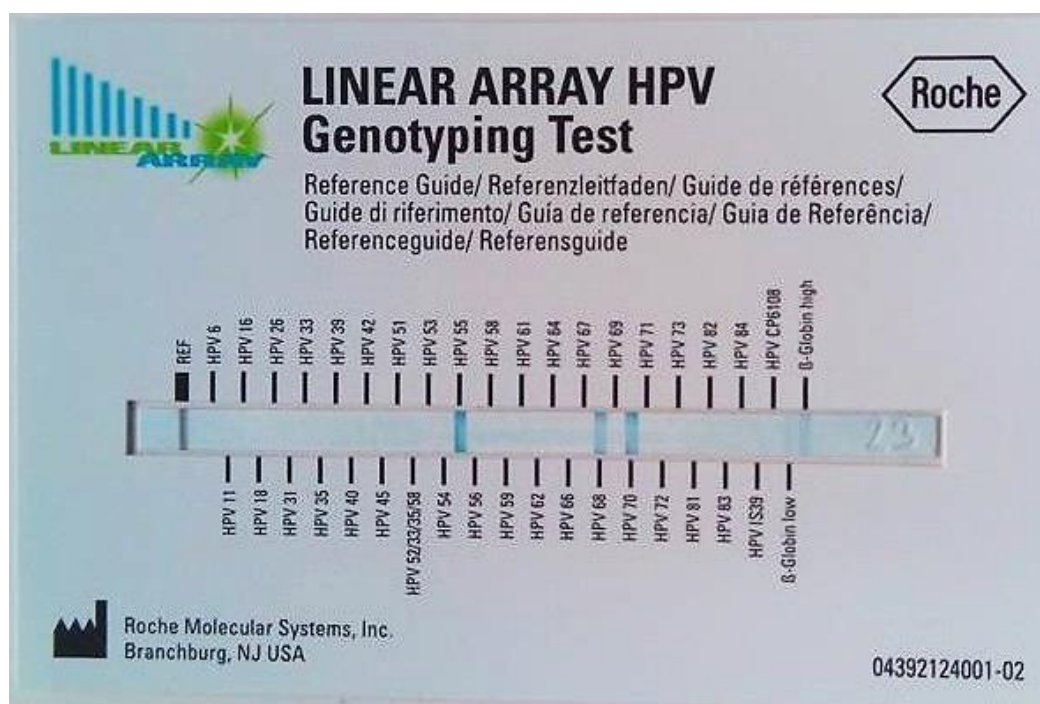
Test se skládá ze čtyř základních kroků: příprava vzorku s izolací DNA, PCR amplifikace cílové DNA použitím HPV primerů, hybridizace amplifikovaných produktů s oligonukleotidovými sondami a detekce amplifikovaných produktů s navázanou sondou pomocí kolorimetrického vyšetření (22).

V prvním kroku dojde k chemické a fyzikální lýze cervikálních buněk a k izolaci HPV DNA. Následuje amplifikační část (popsaná podrobněji v předchozí části věnované systému Cobas® 4800 HPV), kdy se pomocí sad primerů amplifikuje cílový oligonukleotid o délce 450 bp. V reakci je použita AmpliTaq Gold polymeráza. Podobně jako u předchozího systému je do reakce přidána vnitřní β -globinová kontrola.

Po PCR amplifikaci jsou amplikony HPV chemicky denaturovány přidáním denaturačního roztoku za vzniku jednovláknové DNA. Alikvotní podíly denaturovaného amplikonu se poté přesunou do příslušné jamky typizační plotny, která obsahuje hybridizační pufr a jeden genotypizační proužek, který je potažen řadami hybridizačních HPV sond.

Po hybridizační reakci je genotypizační proužek důkladně omyt, aby se odstranil nenavázaný materiál. Potom se k proužku přidá konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou. Proužek se opláchne a ke každému proužku se přidá substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Navázaný konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou katalyzuje v přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci TMB a vytváří modře zbarvený komplex, který se sráží v pozicích sondy, kde dochází k hybridizaci (22).

Genotypizační proužek se potom vyhodnocuje vizuálně porovnáním pozitivního vzorku (modré pásy na hybridizačním proužku) s referenčním návodem genotypizačního testu.



Obrázek 11 – Vyhodnocení genotypizačního proužku s referenčním návodem (foto autora)

7 PŘEHLED HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICI PRAHA

Účelem této studie je podat přehled o výskytu HPV a převažujících genotypech. Ve výsledcích diagnostiky jsou zahrnuty vzorky vyšetřované v období 02/2013 – 04/2014 v STD laboratoři Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Výzkum se týkal pouze žen a to jak zdravých, tak i žen s obtížemi nebo prekancerózami.

7.1 Přehled výsledků metodou Cobas® 4800

Systém Cobas® 4800 slouží k vyšetření nejrizikovějších genotypů HPV 16, HPV 18 a také HPV-HR. Pozitivní výsledek HPV-HR značí přítomnost jiných vysoce rizikových genotypů než 16 a 18.

Jednotlivé grafy jsou uspořádány podle výsledků diagnostiky, převládajícího genotypu a věku pacientek.

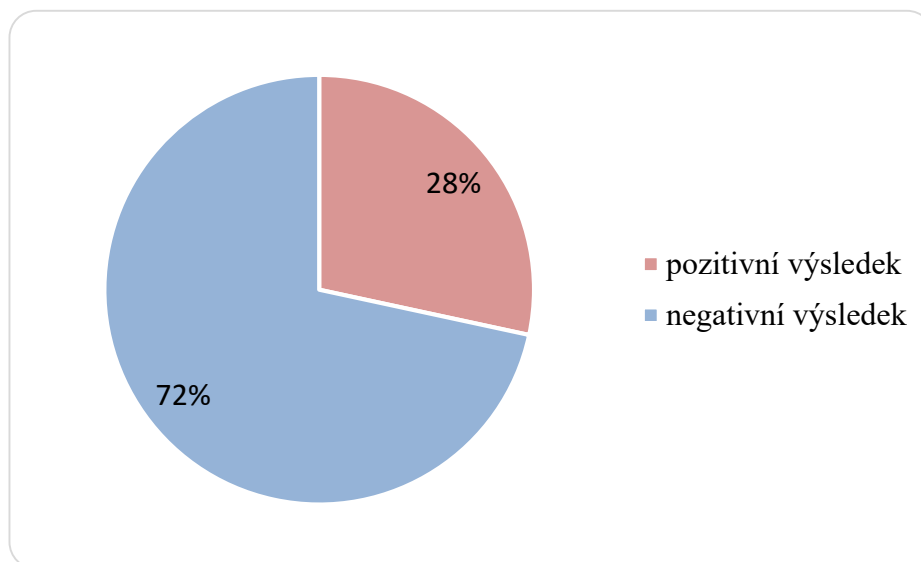
7.1.1 Celkové výsledky diagnostiky

Do celkových výsledků byly zahrnuty jak negativní, tak pozitivní výsledky a to bez ohledu na to, zda byl pozitivní genotyp 16, 18 nebo HR.

Tabulka 6 – Počet vyšetřených vzorků

výsledek	počet vzorků
pozitivní	190
negativní	489

Graf 1 – Počet vyšetřených vzorků



Z výsledků vyplývá, že z celkového počtu 680 vyšetřovaných vzorků jich bylo 190 pozitivních (28%) a 489 negativních (72%).

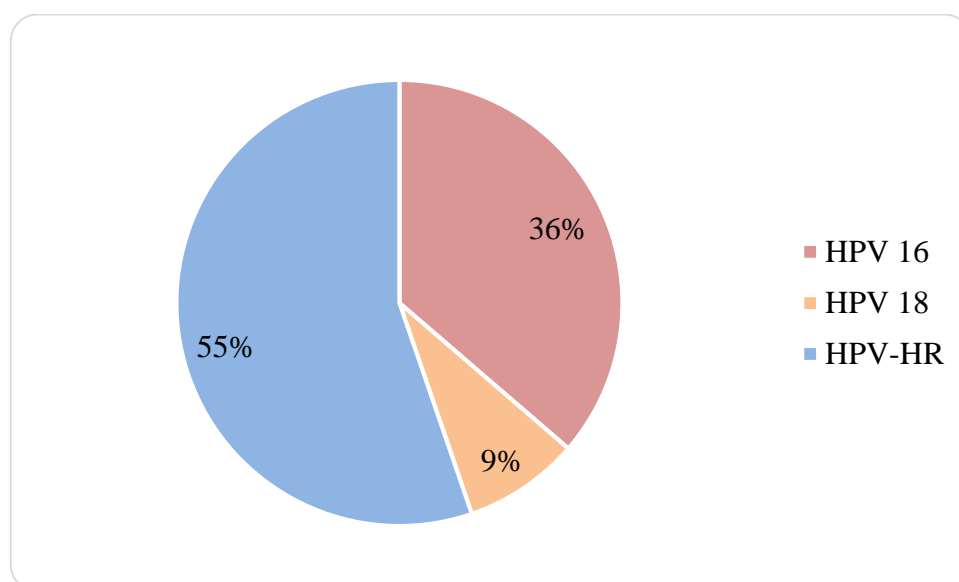
7.1.2 Výsledky podílu jednotlivých genotypů u pozitivních vzorků

Do výsledků genotypů byly zahrnuty všechny pozitivní výsledky HPV 16, HPV 18 i HPV-HR.

Tabulka 7 – Stanovení vysoce rizikových genotypů

výsledek	počet vzorků
HPV-HR	105
HPV 16	69
HPV 18	16

Graf 2 – Stanovení vysoce rizikových genotypů



Z grafu vyplývá, že ze všech pozitivních výsledků převládá HPV-HR, které byly pozitivní u 105 vzorků (55%), u 69 vzorků byl prokázán genotyp 16 (36%) a genotyp 18 u 16 vzorků (9%).

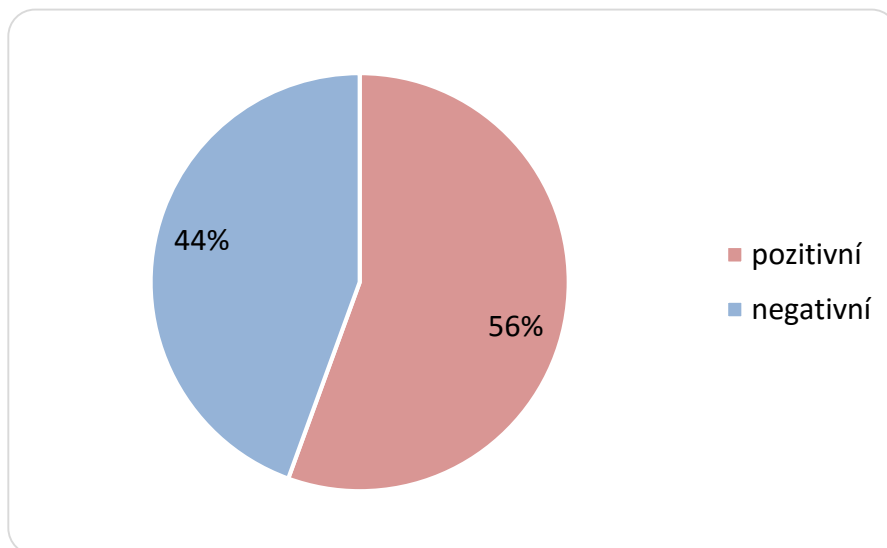
7.1.3 Výsledky diagnostiky podle věku vyšetřovaných

Do výsledků byly zahrnuty všechny vzorky rozdělené podle věku vyšetřovaných.

Tabulka 8 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	45
negativní	36

Graf 3 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let

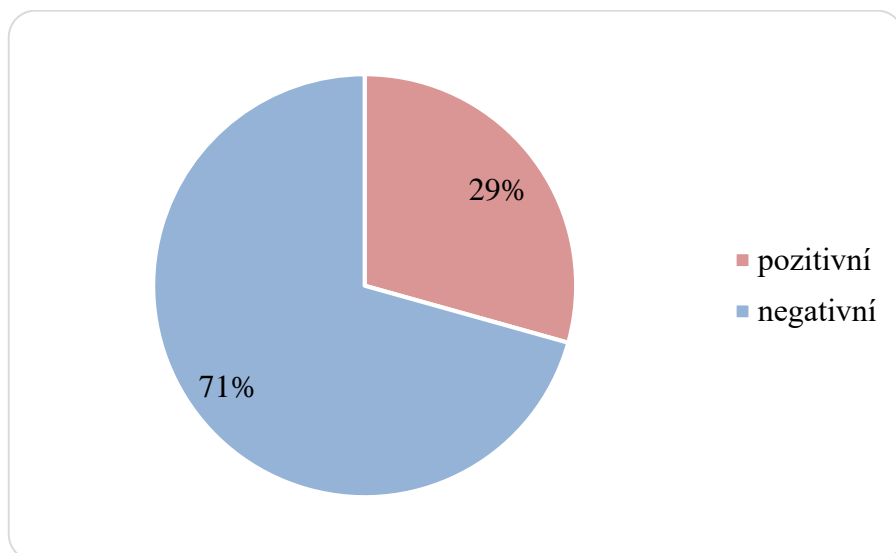


U žen ve věku 20 – 29 let bylo z celkového počtu 81 vzorků pozitivních 45 vzorků (56%) a 36 negativních (44%).

Tabulka 9 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	81
negativní	195

Graf 4 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let

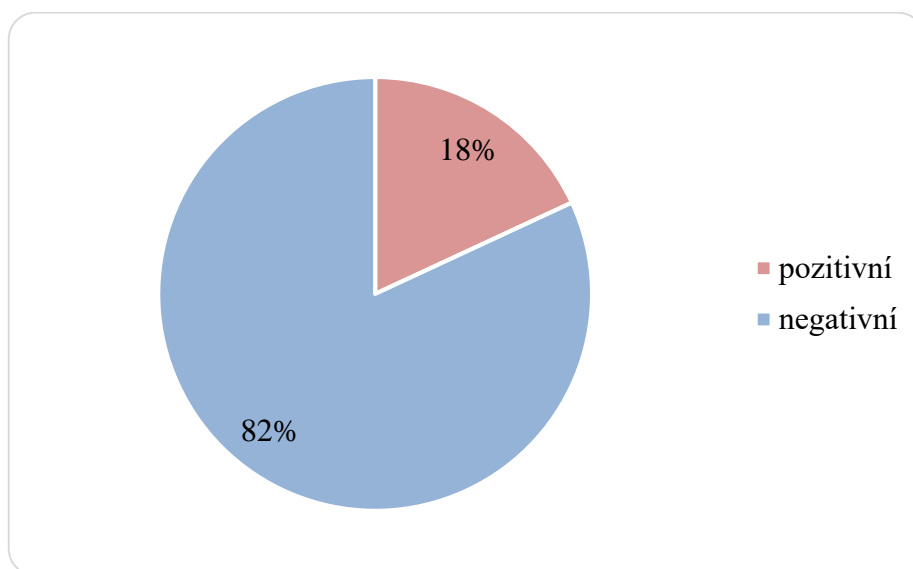


U žen ve věku 30 – 39 let bylo z celkového počtu 276 vzorků pozitivních 81 vzorků (29%) a 195 negativních (71%).

Tabulka 10 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	34
negativní	154

Graf 5 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let

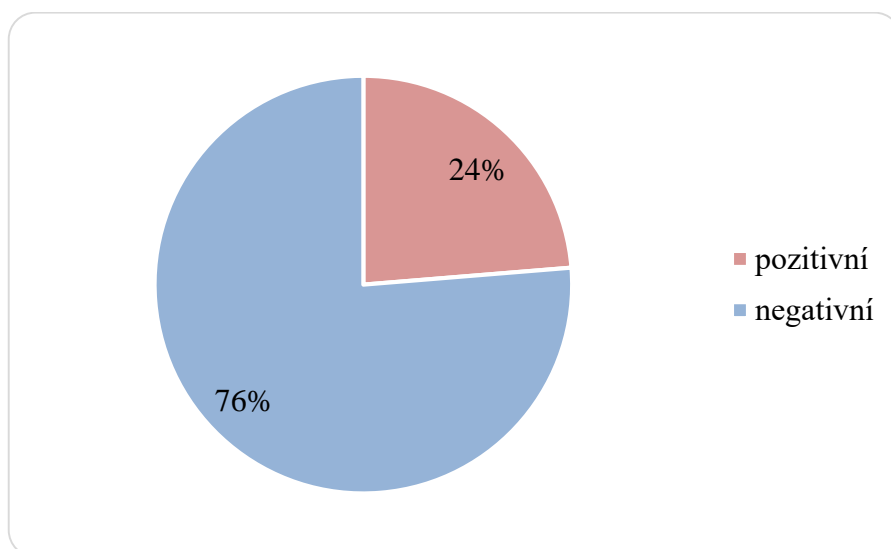


U žen ve věku 40 – 49 let bylo z celkového počtu 188 vzorků pozitivních 34 vzorků (18%) a 154 negativních (82%).

Tabulka 11 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více

výsledek	počet vzorků
pozitivní	32
negativní	103

Graf 6 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více



U žen ve věku 50 let a více bylo z celkového počtu 135 vzorků pozitivních 32 vzorků (24%) a 103 negativních (76%).

7.2 Přehled výsledků metodou Linear Array HPV Genotyping test

Metoda Linear Array HPV Genotyping test slouží k určení genotypů a to jak vysoce rizikových (HPV-HR), tak nízko rizikových (HPV-LR). Detekuje až 37 anogenitální typů HPV.

Jednotlivé grafy jsou uspořádány podle celkových výsledků diagnostiky, podle místa stěru (děložní hrdlo, konečník nebo ústí dutina) a převládajících genotypů u pozitivních výsledků.

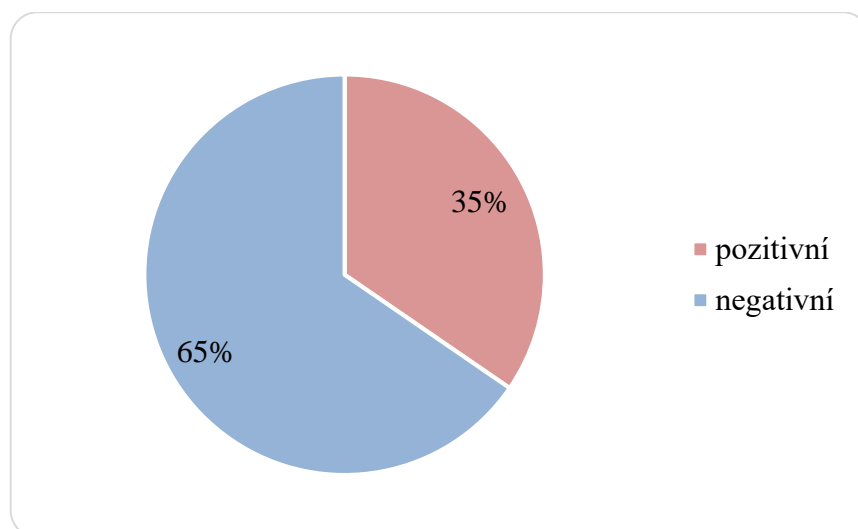
7.2.1 Celkové výsledky diagnostiky

Do celkových výsledků diagnostiky byly zahrnuty všechny negativní a pozitivní výsledky bez ohledu na genotyp.

Tabulka 12 – Počet vyšetřených vzorků

výsledek	počet vzorků
pozitivní	343
negativní	649

Graf 7 – Počet vyšetřených vzorků



Z výsledků vyplývá, že z celkového počtu 992 vzorků jich bylo 343 pozitivních (35%) a 649 negativních (65%).

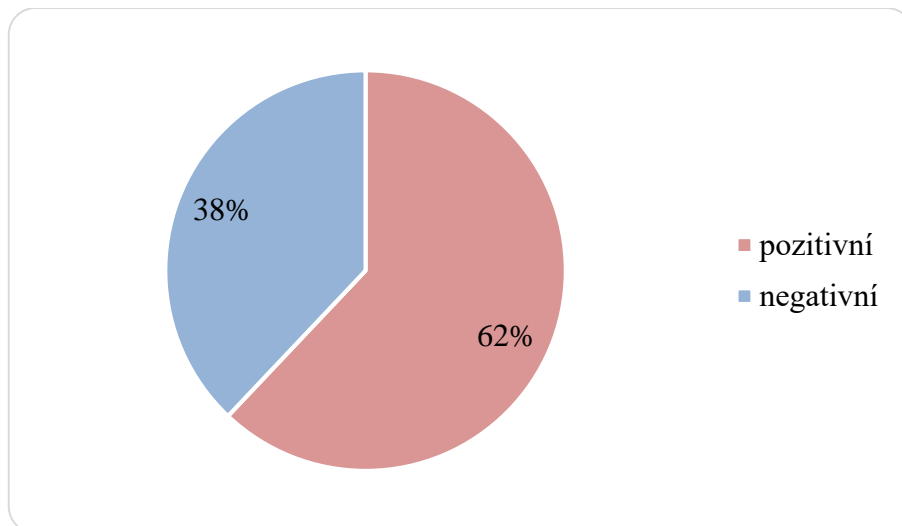
7.2.2 Výsledky podle místa stěru

Do grafů byly zahrnuty všechny výsledky rozdělené podle místa stěru (děložní hrdlo, konečník nebo ústní dutina).

Tabulka 13 – Počet vzorků odebraných z děložního hrdla

výsledek	počet vzorků
pozitivní	193
negativní	118

Graf 8 – Počet vzorků odebraných z děložního hrdla

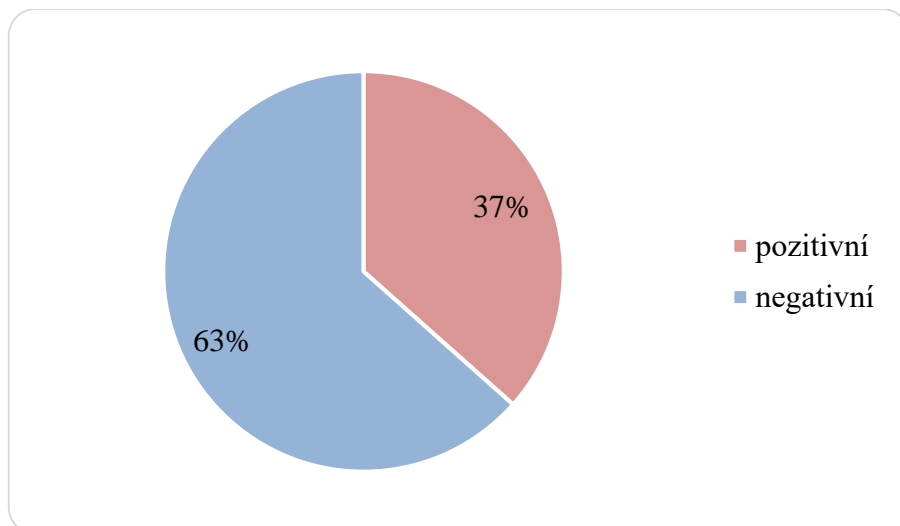


Z výsledku je patrné, že z celkového počtu 311 vzorků jich bylo 193 pozitivních (62%) a 118 negativních (38%).

Tabulka 14 – Počet vzorků odebraných z konečníku

výsledek	počet vzorků
pozitivní	113
negativní	196

Graf 9 – Počet vzorků odebraných z konečníku

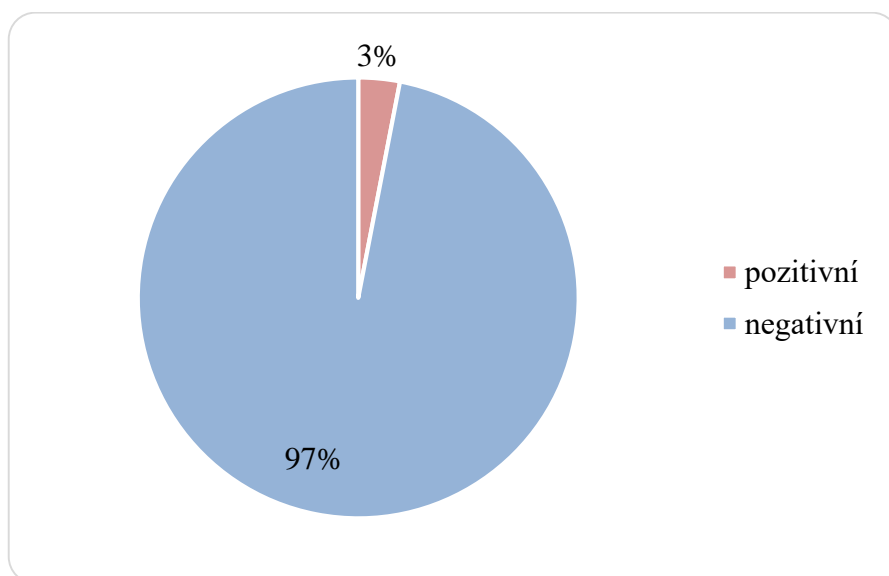


Z výsledků vyplývá, že z celkového počtu 309 vzorků jich bylo 113 pozitivních (37%) a 196 negativních (63%).

Tabulka 15 – Počet vzorků odebraných z ústní dutiny

výsledek	počet vzorků
pozitivní	9
negativní	287

Graf 10 – Počet vzorků odebraných z ústní dutiny



Z celkového počtu 296 vzorků bylo 9 vzorků pozitivních (3%) a 287 negativních (97%).

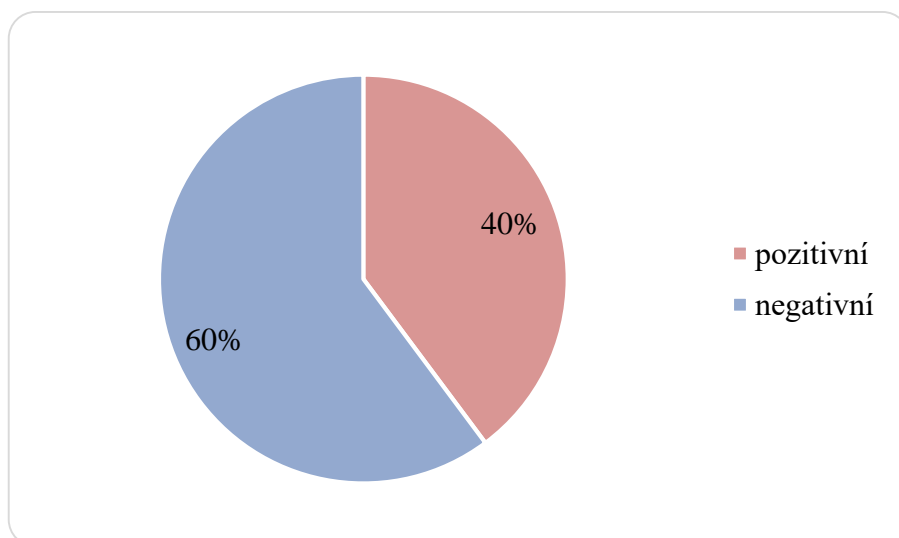
7.2.3 Výsledky podle věku vyšetřovaných

Do grafů byly zahrnuty všechny pozitivní i negativní výsledky rozdělené podle věku vyšetřovaných.

Tabulka 16 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	84
negativní	127

Graf 11 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let

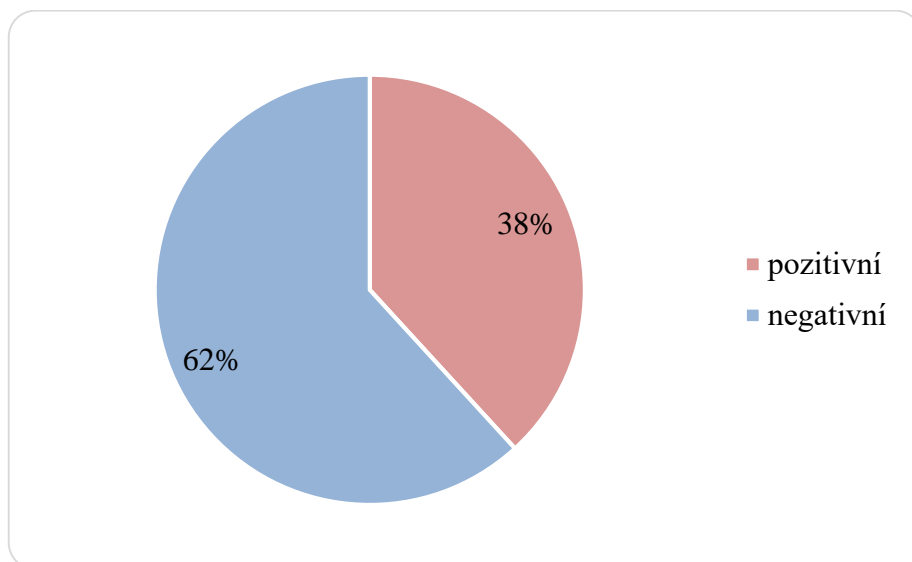


U žen ve věku 20 – 29 let bylo z celkového počtu 211 vzorků pozitivních 84 vzorků (40%) a 127 negativních (60%).

Tabulka 17 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	136
negativní	220

Graf 12 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let

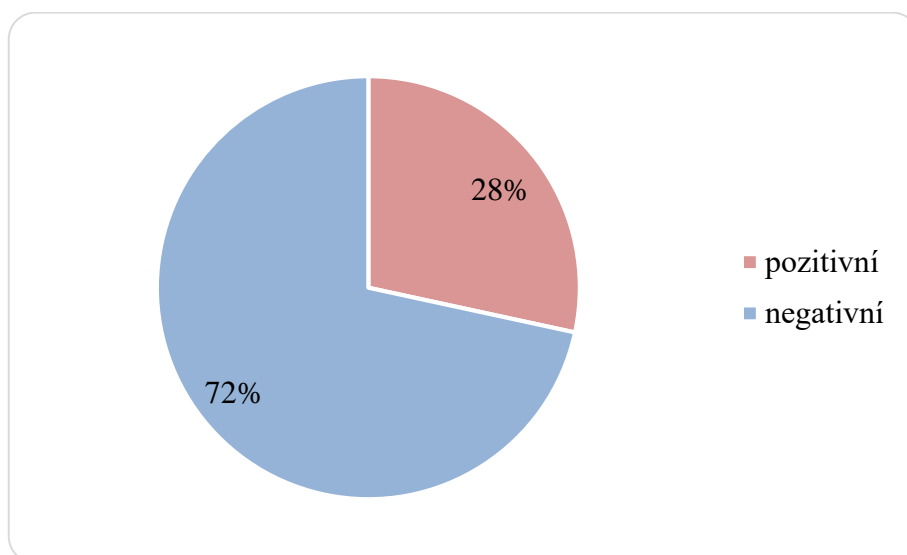


U žen ve věku 30 – 39 let bylo z celkového počtu 356 vzorků pozitivních 136 vzorků (38%) a 220 negativních (62%).

Tabulka 18 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	69
negativní	174

Graf 13 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let

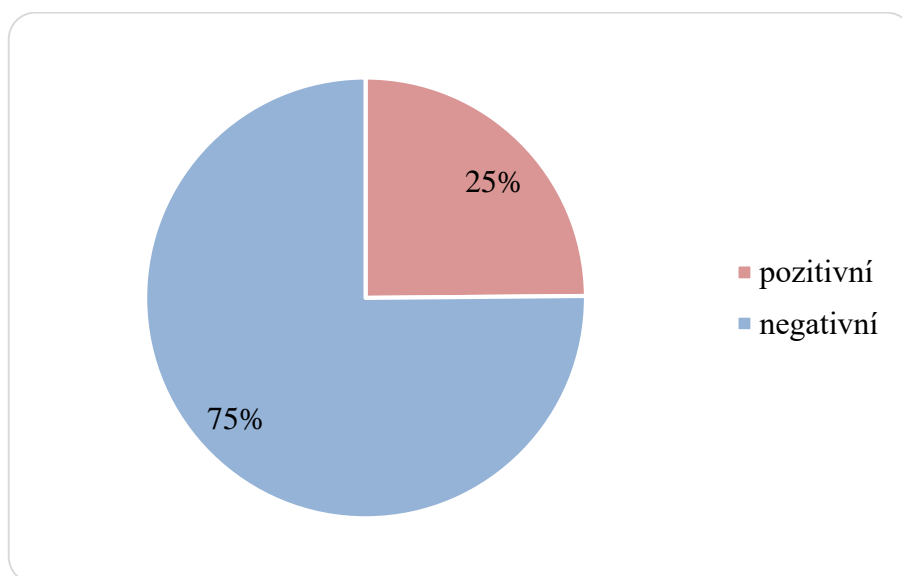


U žen ve věku 40 – 49 let bylo z celkového počtu 243 vzorků pozitivních 69 vzorků (28%) a 174 negativních (72%)

Tabulka 19 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více

výsledek	počet vzorků
pozitivní	45
negativní	136

Graf 14 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více



U žen ve věku 50 let a více bylo z celkového počtu 181 vzorků pozitivních 45 vzorků (25%) a 136 negativních (75%).

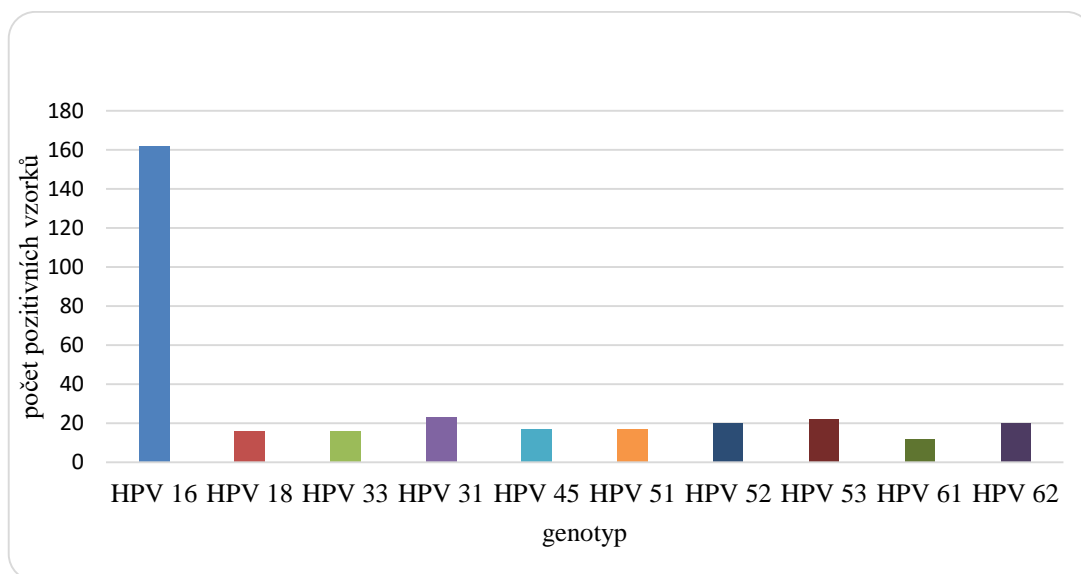
7.2.4 Výsledky převládajících genotypů

Do grafů byly zahrnuty všechny pozitivní výsledky s převládajícími genotypy bez ohledu na věk vyšetřovaných a místo stěru.

Tabulka 20 – Počet nejčastějších genotypů

výsledek	počet vzorků
HPV 16	162
HPV 18	16
HPV 33	16
HPV 31	23
HPV 45	17
HPV 51	17
HPV 52	20
HPV 53	22
HPV 61	12
HPV 62	20

Graf 15 – Počet nejčastějších genotypů



Z výsledků vyplývá, že největší zastoupení má genotyp HPV 16, který byl pozitivní u 162 vzorků (50%). U 23 vzorků byl pozitivní genotyp HPV 31 (7%), genotyp HPV 53 u 22 vzorků (7%), HPV 52 a HPV 62 u 20 vzorků (6%), HPV 45 a 51 u 17 vzorků (5%), HPV 18 a 33 u 16 vzorků (5%) a HPV 61 u 12 vzorků (4%).

8 VÝSLEDKY HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICI PRAHA

Z výše uvedených grafů lze vypožorovat, že u metody Cobas[®] 4800 bylo z celkového počtu 680 vzorků 190 pozitivních (28%). Převládal výsledek HPV-HR čili přítomnost vysoce rizikových genotypů, stejně jako HPV 16, který byl druhým nejčastějším genotypem.

U věkových skupin vyšlo nejvíce pozitivních výsledků u žen ve věku 20 – 29 let (56%) a nejméně u žen ve věku 40 – 49 let, kde bylo pozitivních 32 vzorků (18%).

U metody Linear Array HPV Genotyping test bylo z celkového počtu 992 vzorků pozitivních 343 vzorků (35%) a 649 negativních (65%). Nejvíce pozitivních výsledků bylo ve vzorcích odebraných stěrem z děložního hrdla, kde z celkového počtu 311 vzorků bylo 193 pozitivních (62%). Nejméně pozitivních výsledků bylo u vzorků odebraných stěrem z úst, kterých bylo celkem 9 (3%) z celkového počtu 296 vzorků.

U rozdělení podle věku vyšetřovaných bylo nejvíce pozitivních výsledků opět u věkové skupiny 20 – 29 let (40% vzorků) a z genotypů převládal HPV 16.

9 PŘEHLED HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE FAKULTNÍ NEMOCNICI HRADEC KRÁLOVÉ

Výsledky HPV diagnostiky z Fakultní nemocnice Hradec Králové jsou sestaveny ze stejného období jako výsledky z Všeobecné fakultní nemocnice Praha, tedy 02/2013 – 04/2014. Výzkum se týkal pouze žen.

9.1 Přehled výsledků metodou PCR HPV4A ACE Screening kit (Seeplex)

Izolace virové DNA byla prováděna jak z transportního média, tak i nátěrů pro cytologii, pomocí kitu QIAAmp DNA Mini Kit (Qiagen).

Metoda HPV4A ACE (Seeplex) je založena na principu PCR v reálném čase s detekcí produktu na gelu pomocí elektroforézy. Metoda slouží k prokázání přítomnosti DNA papilomavirů a následnému určení HPV-HR (genotypy – 16, 18, 26, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 73, 82) a low risk (genotypy – HPV 6, 11).

Vlastní rozlišení jednotlivých výsledků poté probíhalo pomocí rozdílů v molekulové velikosti jednotlivých produktů (HR 465 bp a LR 302 bp). Metoda ještě umožňovala na stejném principu odlišit ve skupině high risk genotypy 16 a 18 od ostatních. Jednotlivé grafy jsou uspořádány podle výsledků diagnostiky a věku pacientek.

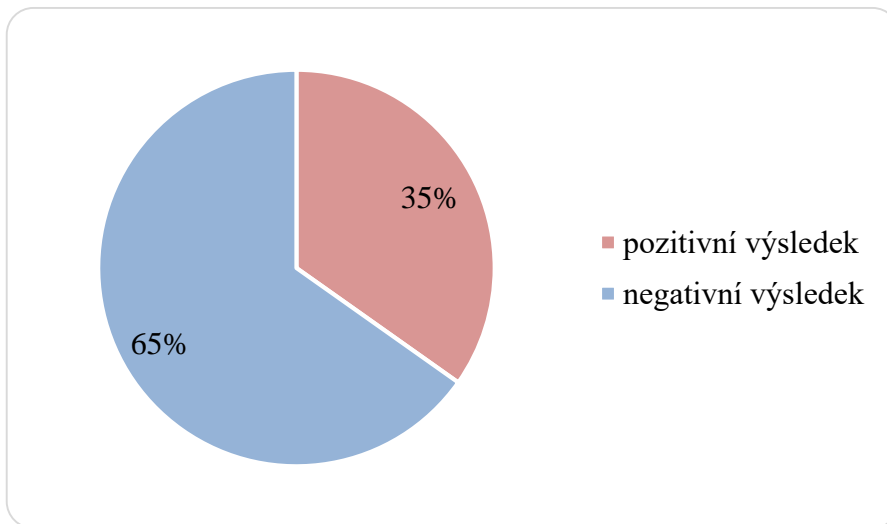
9.1.1 Celkové výsledky diagnostiky

Do celkových výsledků byly zahrnuty všechny pozitivní a negativní výsledky.

Tabulka 21 – Počet vyšetřených vzorků

výsledek	počet vzorků
pozitivní	103
negativní	193

Graf 16 – Počet vyšetřených vzorků



Z výsledků vyplývá, že z celkového počtu 296 vzorků byla u 103 vzorků (35%) prokázána DNA a 193 vzorků (65%) bylo negativních.

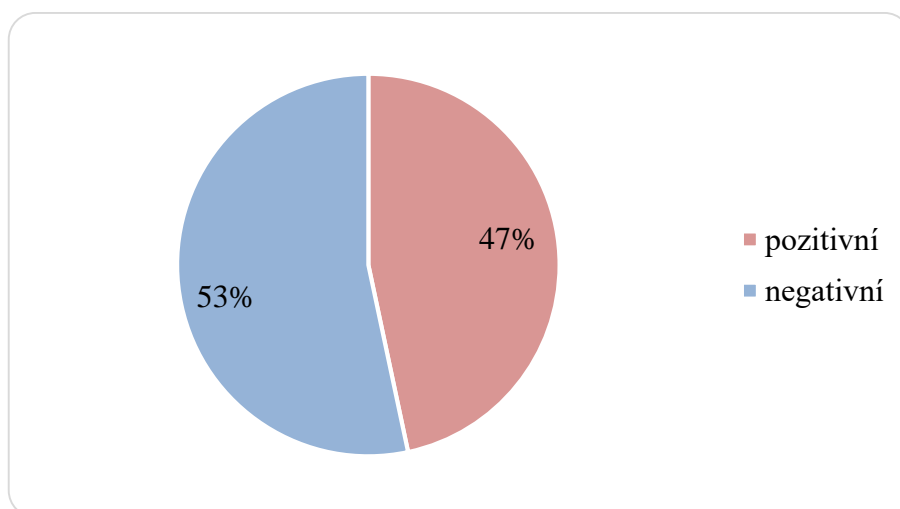
9.1.2 Výsledky diagnostiky podle věku vyšetřovaných

Do výsledků byly zahrnuty všechny vzorky rozdělené podle věku vyšetřovaných.

Tabulka 22 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	14
negativní	16

Graf 17 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let

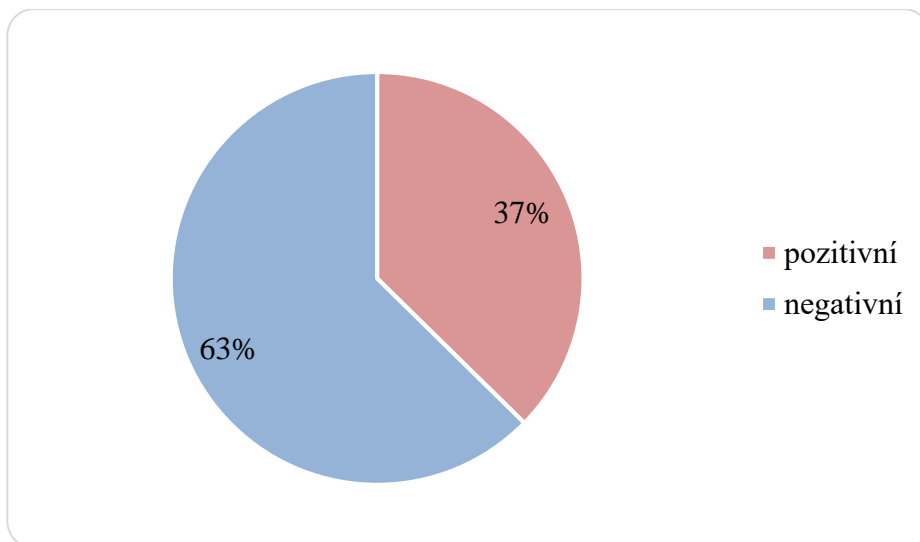


Z celkového počtu 30 vzorků byla prokázána DNA papilomavirů u 14 vzorků (47%) a u 16 vzorků (53%) byl výsledek negativní.

Tabulka 23 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	31
negativní	52

Graf 18 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let

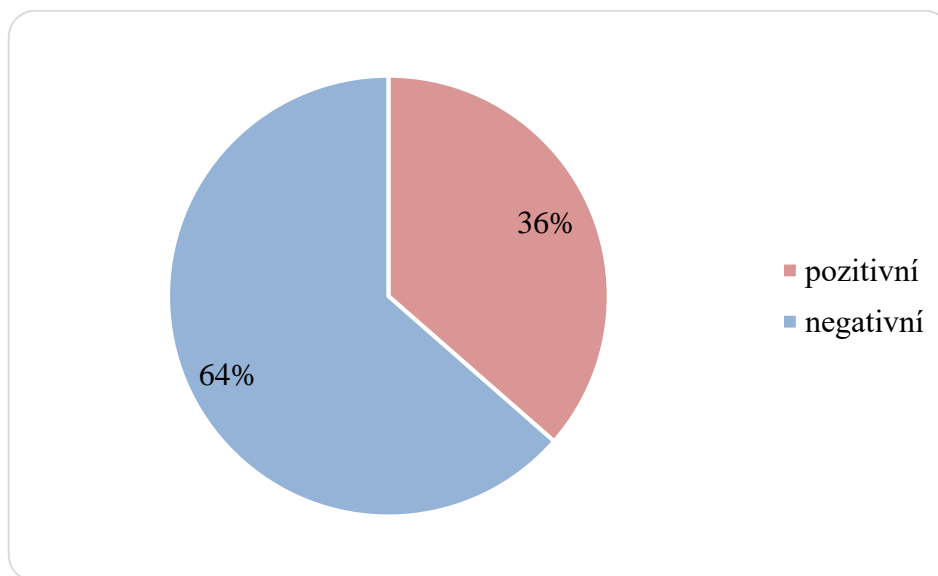


Z celkového počtu 83 vzorků bylo 31 vzorků pozitivních (37%) a 52 negativních (63%).

Tabulka 24 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let

výsledek	počet vzorků
pozitivní	39
negativní	68

Graf 19 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let

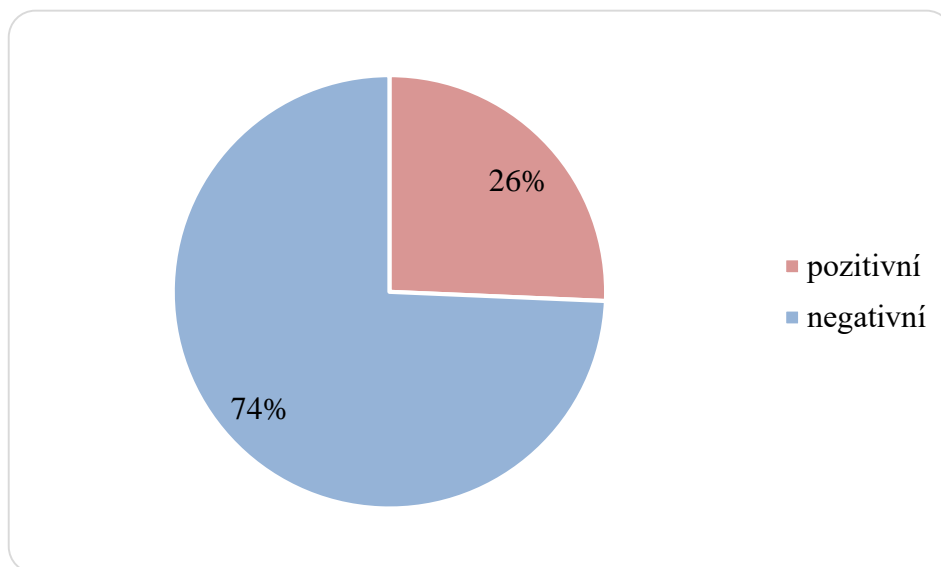


Z celkového počtu 107 vzorků byla prokázána DNA papilomavirů u 39 vzorků (36%) a u 68 vzorků (64%) byl výsledek negativní.

Tabulka 25 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více

výsledek	počet vzorků
pozitivní	19
negativní	55

Graf 20 – Počet vzorků u žen ve věku 50 a více let



Z celkového počtu 74 vzorků bylo pozitivních 19 vzorků (26%) a negativních 55 vzorků (74%).

10 VÝSLEDKY HPV DIAGNOSTIKY PROVÁDĚNÉ VE FAKULTNÍ NEMOCNICI HRADEC KRÁLOVÉ

Z výše uvedených grafů lze zjistit, že u metody PCR HPV4A ACE Screening kit (Seeplex) bylo z celkového počtu 296 vzorků 103 pozitivních (35%) a 193 vzorků (65%) negativních.

U věkových skupin vyšlo nejvíce pozitivních výsledků u žen ve věku 20 – 29 let (47%) a nejméně u žen ve věku 50 let a více – 19 vzorků (26%). U žen ve věku 30 – 39 let bylo z celkového počtu 83 vzorků 31 vzorků pozitivních (37%), u věkové skupiny 40 až 49 let bylo 39 vzorků pozitivních (36%).

11 DISKUZE

Podle předchozí screeningové studie na 1393 vzorcích cervikálních stěrů od českých žen autorů Tachezy a kol., se pozitivita HPV pohybovala souhrnně 28,3%, z toho činily nízkorizikové HPV genotypy 6,0% a vysoce rizikové HPV 22,3% (28). V našem souboru se u vzorků ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze pohybovalo procento pozitivit u vzorků vyšetřených metodou Cobas[®] 4800 kolem 28% a u vzorků vyšetřených metodou Linear Array Genotyping test dokonce 35%, tedy stejně jako ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Vyšší procento pozitivních nálezů může být způsobeno jinou skladbou pacientek. V našem souboru se nejedná o klasické screeningové vyšetření, ale jsou v něm zařazeny jak vzorky od pacientek s různými obtížemi, tak pacientky zcela bez obtíží, a proto lze předpokládat i vyšší celkové procento pozitivních nálezů.

V našem souboru se u obou pracovišť objevilo nejvíce pozitivních výsledků ve věkové skupině 20 až 29 let, naopak pozitivní výsledky HPV po 30. roce postupně ubývaly. Podobný výsledek byl zjištěn i u výše zmiňované screeningové studie z ČR, kde nejvíce pozitivit bylo zachyceno ve věkové skupině 21 – 25 let (31,5% všech pozitivních nálezů) s významně nižšími počty u ostatních věkových skupin (28). Pro tuto věkovou distribuci existuje hned několik možných vysvětlení. Může to být způsobeno tím, že mladší ženy nepřikládají velký význam prevenci proti HPV a jsou více vystaveny rizikovým faktorům jako např. nechráněný pohlavní styk s nedostatečným používáním bariérové kontracepce a vyšší promiskuita v mladé populaci. Další důvodem může být imunitní systém, kdy v mladším věku dochází často k zvýšenému výskytu lidských papilomavirů, které však mohou být během několika let eliminovány imunitním systémem a dojde k jejich postupnému vymizení bez rozvoje onemocnění.

Z obou našich studií plyne, že nejčastějším záchytem při typizačním vyšetření jsou vysoce rizikové HPV, především HPV 16, což dokázala i studie autorů Tachezy a kol., kdy byl genotyp HPV 16 nejrozšířenějším typem jak na celém světě (3,2%), tak i v populaci českých žen s normálním cytologickým nálezem (4,8%), za ním pak následovaly genotypy HPV 18, 52, 31, a 58. V případě pacientek s karcinomem děložního však jsou procentuální zastoupení jednotlivých genotypů významně vyšší. V evropských studiích byl u pacientek s dlaždicobuněčným karcinomem prokázán genotyp HPV 16 v 66,2% a genotyp HPV 18 poté v 10,8%, celkem tedy ve skupině pacientek s tímto

nádorovým onemocněním tvoří tyto dva genotypy 77% všech zachycených HPV genotypů (23). Ve skupině pacientek s adenokarcinomy děložního hrdla byl HPV 16 zachycen v 54,2% a HPV 18 v 40,4% a tak oba tyto hlavní HR HPV genotypy tvoří neuvěřitelných 94,6% všech zachycených HPV u pacientek s tímto typem agresivního nádoru (23). V našem souboru ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze byl metodou Linear Array HPV Genotyping Test zachycen genotyp HPV 16 v cca 50% pozitivních nálezů následovaný dalšími genotypy ve významně nižších procentech. Poněkud rozdílný výsledek byl obdržen ze souboru Všeobecné fakultní nemocnice v Praze vyšetřených ale metodou Cobas[®] 4800, kdy výsledek HPV-HR (jiné genotypy než 16 a 18) se nacházel u 55% pozitivních vzorků, genotyp HPV 16 pak „pouze“ u celkem 36% pozitivních vzorků a genotyp HPV 18 u 9% pozitivních nálezů. Tyto rozdílné výsledky mohou být způsobeny nesourodostí jednotlivých souborů pacientek. Z výše citovaných prací plyne, že pozitivita HPV 16 a 18 ve screeningových studiích zdravé populace se pohybují v jednotkách procent, ale u studií pacientek s prokázaným karcinomem děložního hrdla se pohybují v desítkách procent. A právě rozdílný poměr těchto dvou skupin v jednotlivých našich souborech tak velmi pravděpodobně zapříčinil rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých genotypů. Ke klinickým korelátům k našim výsledkům, tj. kolik procent pacientek mělo histologicky prokázaný karcinom děložního hrdla, bohužel nemáme přístup a tak není možné oba soubory z Všeobecné fakultní nemocnice v Praze validně porovnat v jednotlivých skupinách dle závažnosti histologického nálezu.

Neustálý nárůst žen nakažených HPV a obava z tzv. replacementu (tj. ze změny v zastoupení nejčastějších genotypů HPV pod „tlakem“ vakcinace na nevakcinální genotypy) vedl také k vývoji nové vakcíny registrované pod názvem Gardasil 9 (Merck[®]), která je oproti vakcínám Silgard a Cervarix již devítivalentní a působí nejen na genotypy 6, 11, 16, 18, ale i 31, 33, 45, 52 a 58, které jsou nejčastější příčinou prekanceróz děložního hrdla. Díky zavedení této vakcíny se předpokládá pokrytí více jak 90% HPV typů způsobujících všechny druhy karcinomů děložního hrdla a zabránění vzniku prekarcinózních lézí na děložním čípku.

Během klinické studie vakcíny Gardasil 9 byla prokázána vysoká účinnost právě díky devítivalentnímu složení, které působí na vysoce rizikové HPV 16 a 18, ale i na ostatní typy, které způsobují prekancerózy a je tedy i pravděpodobný jejich maligní zvrst. Testování přípravku Gardasil 9 bylo provedeno i u žen, které byly již očkovány vakcínou Silgard a výsledek prokázal, že nové očkování vakcínou Gardasil 9 je u takových žen

dobře tolerováno. Účinnost byla prokázána také u mužů, především jako ochrana proti kondylomatům, rakovině konečníku a dalším prekancerózám. Z těchto studií poté vychází i předpoklad, že pokud by toto očkování nahradilo čtyřvalentní a dvouvalentní vakcíny, redukoval by se výskyt cervikálních, vaginálních i análních karcinomů až o 91,8% (33).

12 ZÁVĚR

Lidské papilomaviry patří mezi nejčastější původce sexuálně přenosných onemocnění. Nízkorizikové papilomaviry způsobují především vznik genitálních bradavic, kondylomat či laryngeálních papilomů. Vysoce rizikové, jako HPV 16 a 18, se pak podílí na vzniku prekanceróz a následně i karcinomů děložního hrdla.

Nejčastěji se přenáší sexuálním stykem, možnost přenosu je však možná i přes infikované ručníky, z matky na plod nebo přímým kontaktem s kůží.

Rakovina děložního hrdla patří mezi druhou nejčastější rakovinu u žen na celém světě. Téměř za všechny nádory děložního hrdla je zodpovědná infekce lidským papilomavirem. Nejčastěji se rakovina vyskytuje u žen po 20. roce života a následně kolem 50. roku života. Pro prevenci je nejdůležitější minimalizovat rizikové faktory, docházet na pravidelný screening děložního hrdla a v neposlední řadě se nechat očkovat.

V České republice jsou k dostání vakcíny Cervarix (GlaxoSmithKline®), Silgard (Merck®) a nová vakcína Gardasil 9 (Merck®), které chrání před nejčastějšími HPV genotypy.

I přes možnost očkování je nárůst HPV v populaci vysoký, což dokazují výsledky studie provedené ve Všeobecné fakultní nemocnici Praha a Fakultní nemocnici Hradec Králové. Ve VFN Praha bylo metodou Cobas® 4800 diagnostikován HPV u 28% žen a u metody Linear Array HPV dokonce u 35%, tedy stejně jako ve FN Hradec Králové. Nejrizikovější skupinou jsou ženy ve věku 20 – 29 let.

Pro snížení výskytu HPV jsou zapotřebí důsledné a pravidelné lékařské prohlídky, vyšší informovanost veřejnosti o lidském papilomaviru a samotné prevenci, ale také možnost očkování, která riziko výskytu HPV a rakoviny děložního čípku výrazně snižuje.

13 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CIN	cervikální intraepiteliální neoplazie
CT	computed tomography, výpočetní tomografie
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HIV	human imunodeficiency virus
HPV	lidský papilomavirus
HR	high risk
LR	low risk
PCR	polymerázová řetězová reakce
STD	sexuálně přenosná onemocnění

14 SEZNAM VYSVĚTLIVEK

Agens	patogen
Anus	řitní otvor
Autoinokulace	přenos z jednoho místa organismu na druhé
Dysurie	obtížné a bolestivé močení
Ektopie	výskyt mimo své obvyklé místo
Excize	vyříznutí
High-risk	vysoce rizikové
Imunodeficiencie	porucha obranyschopnosti
In vitro	kultivace „ve zkumavce“
Kancerogeneze	nádorové bujení
Koitarche	zahájení pohlavního života
Konizace	kruhovitě vytětí tkáně děložního hrdla
Latentní	skytý
Léze	poškození orgánu či tkáně
Low-risk	nížkorizikové
Patogeneze	vznik a vývoj chorobných změn v těle
Perzistence	odolnost
Prekanceróza	předrakovinný stav
Simultánní	současný, zároveň probíhající
Vakcinace	očkování

15 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Lidský papilomavirus (upraveno podle Oncogyn.com).....	12
Obrázek 2 – Organizace genomu papilomavirů (upraveno podle Roche.cz)	13
Obrázek 3 – Četnost projevů infekce viry HPV (upraveno podle hpv-guide.cz).....	17
Obrázek 4 – Vývoj HPV infekce (upraveno podle remedia.cz)	18
Obrázek 5 – Výskyt karcinomu děložního hrdla v ČR – vývoj incidence a mortality (upraveno podle remedia.cz).....	20
Obrázek 6 – Nádorové buňky děložního čípku (upraveno podle cancer.org).....	21
Obrázek 7 – Karcinom děložního čípku (upraveno podle onkogyn.cz).....	22
Obrázek 8 – Cobas® 4800 (upraveno podle roche.com)	28
Obrázek 9 – Příprava vzorků pro vyšetření (upraveno podle roche.com).....	29
Obrázek 10 – Linear Array HPV Genotyping test (upraveno podle roche.com)	30
Obrázek 11 – Vyhodnocení genotypizačního proužku s referenčním návodem (foto autora)	31

16 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Počet vyšetřených vzorků	33
Graf 2 – Stanovení vysoce rizikových genotypů	34
Graf 3 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let	35
Graf 4 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let	36
Graf 5 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let	37
Graf 6 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více	38
Graf 7 – Počet vyšetřených vzorků	39
Graf 8 – Počet vzorků odebraných z děložního hrdla	40
Graf 9 – Počet vzorků odebraných z konečníku	41
Graf 10 – Počet vzorků odebraných z ústní dutiny	42
Graf 11 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let	43
Graf 12 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let	44
Graf 13 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let	45
Graf 14 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více	46
Graf 15 – Počet nejčastějších genotypů	47
Graf 16 – Počet vyšetřených vzorků	50
Graf 17 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let	51
Graf 18 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let	52
Graf 19 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let	53
Graf 20 – Počet vzorků u žen ve věku 50 a více let	54

17 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Dělení HPV dle maligního potenciálu na vznik karcinomu děložního hrdla	14
Tabulka 2 – Onemocnění a související typy HPV (upraveno dle citace 16).....	15
Tabulka 3 – Karcinomy asociované s HPV infekcí v USA v letech 2004 - 2007 (upraveno dle citace 23).....	16
Tabulka 4 – Riziko maligního zvratu (upraveno dle citace 32)	22
Tabulka 5 – Základní charakteristiky vakcín (upraveno dle citace 25).....	24
Tabulka 6 – Počet vyšetřených vzorků.....	33
Tabulka 7 – Stanovení vysoce rizikových genotypů.....	34
Tabulka 8 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let.....	35
Tabulka 9 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let.....	36
Tabulka 10 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let.....	37
Tabulka 11 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více	38
Tabulka 12 – Počet vyšetřených vzorků.....	39
Tabulka 13 – Počet vzorků odebraných z děložního hrdla.....	40
Tabulka 14 – Počet vzorků odebraných z konečníku	41
Tabulka 15 – Počet vzorků odebraných z ústní dutiny.....	42
Tabulka 16 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let.....	43
Tabulka 17 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let.....	44
Tabulka 18 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let.....	45
Tabulka 19 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více	46
Tabulka 20 – Počet nejčastějších genotypů.....	47
Tabulka 21 – Počet vyšetřených vzorků.....	50
Tabulka 22 – Počet vzorků u žen ve věku 20 – 29 let.....	51
Tabulka 23 – Počet vzorků u žen ve věku 30 – 39 let.....	52
Tabulka 24 – Počet vzorků u žen ve věku 40 – 49 let.....	53
Tabulka 25 – Počet vzorků u žen ve věku 50 let a více	54

18 POUŽITÁ LITERATURA A PRAMENY

1. **Národní referenční laboratoř pro papillomaviry.** *Úvodem trocha historie.* [online]. [cit. 2014-10-09]. Dostupné z: <<http://www.papillomavirus.cz/historie.html>>
2. **3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy.** *Genetický průkaz původce.* Výukové materiály. [online]. [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: <<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/genetika/genetika.htm>>
3. **American College of Obstetricians and Gynecologists.** *Cervical Cancer Screening.* 2014-07 [online] [cit. 2014-11-09]. Dostupné z: <<http://www.acog.org/Patients/FAQs/Cervical-Cancer-Screening>>
4. **Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al.** *Classification of Papillomaviruses.* *Virology.* 2010; 401(1):70–79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002.
5. **Cibula D.** *Kombinovaná hormonální kontracepce.* *Moderní gynekologie a porodnictví,* 2001;10(2):136–51.
6. **Drozenová H.** *Bradavice.* *Interní Med.* 2010; 12(7-8): 372–373.
7. **Durst M, Gissmann L, Zur Hausen H, et al.** *A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.* *Proc Natl Acad Sci* 1983;80:3812-15.
8. **De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H.** *Classification of papillomaviruses.* *Virology* 2004; 324(1):17-27

9. **Fait T.** *Co dokáží lidské papilomaviry?* [online]. [cit. 2014-10-09]. Dostupné z: <<http://www.hpv-guide.cz/clanek-mudr-tomas-fait-phd-co-dokazi-lidske-papilomaviry>>
10. **Fait T.** *Klinické využití kvadrivalentní HPV vakcíny Silgard.* [online]. 2007-12-03 [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/klinicke-vyuziti-kvadrivalentni-hpv-vakciny-silgard-333286>>
11. **Freitag P.** *Papillomaviry: papillomavirové infekce v gynekologii.* Praha: Triton, 1998, ISBN 80-858-7593-4
12. **Halada P et Špaček J.** *Epidemiologie, etiopatogeneze karcinomu děložního hrdla a současné možnosti jeho prevence.* [online]. 2011-02-08 [cit. 2015-01-08]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/epidemiologie-etipatogeneze-karcinomu-delozniho-hrdla-a-soucasne-moznosti-jeho-prevence-457919>>
13. **Hamšíková E.** *Papilomaviry a jejich role v patogenezi karcinomu děložního hrdla.* [online]. 2007-09 [cit. 2015-01-08]. Dostupné z: <<http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Papilomaviry-a-jejich-role-v-patogenezi-karcinomu-delozniho-hrdla/8-1c-it.magarticle.aspx>>
14. **Hamšíková E.** *Profylaktické vakcíny proti lidským papillomavirům.* Zprávy CEM 2005; 14(10–11). Dostupné z: <<http://www.papillomavirus.cz/odborna/vakciny.pdf>>

15. **Kalábová R.** *Zhoubné nádory děložního čípku.* [online]. 2003-04-24 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/zhoubne-nadory-delozniho-cipku-153473>
16. **Bonnez W et Reichman RC.** *Papillomaviruses in Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases, seventh edition.* Churchill Livingstone 2010; ISBN 978-0-4430-6839-3
17. **Mouková L.** *Očkovat proti HPV?* [online]. 2010-10-04 [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/ockovat-proti-hpv-454764>
18. **Ondruš J.** *Klinické projevy infekce lidskými papilomaviry, léčba a prognóza.* [online]. 2008-04-21 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/klinicke-projevy-infekce-lidskymi-papilomaviry-lecba-a-prognoza-355832>
19. **Ondruš J, Dvořák V.** *Přirozený průběh infekce virem lidských papilomatózních lézí (HPV) a kancerogeneze děložního hrdla.* [online]. 2008-01-10 [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/prirozeny-prubeh-infekce-virem-lidskych-papilomatoznich-lezi-hpv-338168>
20. **Rob L, Halaška M, Robová H.** *Nerve-sparing and individually tailored surgery for cervical cancer.* The Lancet Oncol 2010;11(3):292-01
21. **Roche Diagnostics.** Příbalový leták *cobas® 4800 HPV Test*, 04/2014 05990289001-09CS, Doc Rev. 9.0

22. **Roche Diagnostics.** Příbalový leták *Linear Array HPV Genotyping Test*, 09/2012, 04392116001-10PT, Doc Rev. 10.0
23. **Sehnal B, Vojáčková N, Driák D, et al.** *Předpokládaná účinnost HPV vakcinace v profylaxi nongenitálních karcinomů.* *Klin Onkol* 2014;27(4):239-46.
24. **Schwarz E, Freese U, Gissmann L, et al.** *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells.* *Nature*, 1985;314(6006):111-114.
25. **Sláma J.** *Očkování proti HPV.* *Klin Farmakol Farm* 2008;22(4):153–155. [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: <<http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/04/08.pdf>>
26. **Sláma J.** *Pozor na karcinom děložního hrdla.* [online]. 2010-03-01 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z:< <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-pacientske-listy/pozor-na-karcinom-delozniho-hrdla-450004>>
27. **Tachezy R.** *Dermatovenerologické projevy infekcí vyvolaných papillomaviry.* [online]. 2006-09-22 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/dermatovenerologicke-projevy-infekci-vyvolanych-papillomaviry-267215>>
28. **Tachezy R, Smekalova J, Kaspirkova J at Salakova M.** *Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer creening population of Czech woman.* *PLoS ONE* 2013;8(11): e79156. doi:10.1371/journal.pone.0079156

29. **Tikovský K.** *Současné možnosti léčby karcinomu hrdla děložního.* [online]. 2001-03-17 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/soucasne-moznosti-lecby-karcinomu-hrdla-delozniho-134176>>
30. **Toman J, Feyereisl J.** *Prekancerózy.* [online]. 2001-09-17 [cit. 2015-02-23]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/prekancerozy-138909>>
31. **Velčevský P.** *Nový pohled na léčbu kondylomat.* [online]. 2010-11-01 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/novy-pohled-na-lecby-kondylomat-455347>>
32. **Vrtišková M.** *Zdravotní nauky.* Vyšší odborná škola sociálně právní, Praha, 2012 ISBN 978-80-87779-01-9. Dostupné z: <http://www.vossp.cz/wp-content/uploads/2013/11/zdravotni_nauky.pdf>
33. **Vakciny.net** (oficiální portál České vakcinologické společnosti). Dostupné z: <<http://www.vakciny.net>>