

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

ŽMOGAUS PAPILOMOS VIRUSO (ŽPV) NUSTATYMO TECHNOLOGIJŲ
PARINKIMAS IR ĮVERTINIMAS

Magistrantė GINTARĖ KIEVIŠAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas

Prof. Dr. Arvydas Laurinavičius

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Gimdos kaklelio vėžio paplitimas	7
1.2. Iktivėžinės gimdos kaklelio ligos	8
1.3. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai	9
1.4. Žmogaus papilomos virusas (ŽPV)	10
1.5. ŽPV infekcijos patogenezė	12
1.6. Gydyimas ir apsauga	14
1.7. Gimdos kaklelio patikra	15
1.8. Molekuliniai ŽPV nustatymo metodai	16
1.9. Komerciškai prieinami ŽPV nustatymo testai	24
1.10. ŽPV tyrimo klinikinė nauda	31
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	33
2.1. Tyrimo medžiaga	33
2.2. ŽPV nustatymo metodai	33
2.2.1. DNR išskyrimas	33
2.2.2. DNR koncentracijos ir švarumo matavimas	34
2.3. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	35
2.3.1. ŽPV tyrimas „Seeplex [®] HPV4 ACE Screening“ ir „Seeplex [®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu	35
2.3.2. ŽPV tyrimas AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu	38
2.3.3. ŽPV tyrimas „AmpliSens [®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu	40
2.4. Statistinė analizė	41
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	42
3.1. Bendrosios charakteristikos	42
3.2. ŽPV DNR tyrimo rezultatai	44
3.2.1. ŽPV tyrimo „Seeplex [®] HPV4 ACE Screening“ rinkiniu rezultatai	44
3.2.2. ŽPV tyrimo AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu rezultatai	44

3.2.3. ŽPV tyrimo „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu rezultatai	45
3.2.4. ŽPV tyrimo „Seeplex® HPV4A ACE Screening“ ir „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu rezultatai	47
3.3. Rezultatų aptarimas	49
IŠVADOS	53
REKOMENDACIJA	53
SUMMARY	54
LITERATŪROS SĄRAŠAS	55

SANTRUMPOS

AIS – adenokarcinoma *in situ*

ASC-H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL

ASCUS – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės

Ca - karcinoma

CE - *Conformité Européenne* (Europos kokybės sertifikatas)

CIN – gimdos kaklelio intrapitelinė neoplazija

CIS – *Carcinoma in situ*

DNR – dezoksiribonukleorūgšis

DR-ŽPV – Didelės onkogeninės rizikos ŽPV

HC2 – *Hybrid Capture 2*

HSIL – ryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai

ISH – *in situ* hibridizacija

LSIL – neryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai

MR-ŽPV – mažos onkogeninės rizikos ŽPV

Pap – Papanicolaou citologinis tepinėlis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

RNR – ribonukleorūgštis

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

ŽPV – žmogaus papilomos virusas

IVADAS

Gimdos kaklelio vėžys pasaulyje yra antroji, o Lietuvoje ketvirtoji pagal dažnumą moterų onkologinė liga. Lietuvoje kasmet suserga apie 500 moterų, o mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio mūsų šalyje – vienas didžiausių Europoje [1, 24, 25, 26, 31]. Pagrindinė gimdos kaklelio vėžio priežastis yra žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija gimdos kaklelyje. ŽPV yra skirstomi į didelės, galimai didelės ir mažos onkogeninės rizikos grupes [3]. Nuo ŽPV infekcijos praėjus maždaug 8 – 12 mėnesių, pradeda vystytis pokyčiai. Tačiau ŽPV sukeliama gimdos kaklelio vėžio dažniausiai galima išvengti.

Vakarų šalyse ikivėžiniams pokyčiams ar vėžinėms ląstelėms nustatyti yra naudojamas citologija paremtas Papanicolaou testas (*Pap*) ir ŽPV DNR testas [35]. Šiuo metu naudojami ŽPV diagnostiniai testai („*in house*“ ar komerciniai) remiasi molekulinės biologijos tyrimo metodais. Tyrimui buvo pasirinktas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodas, o ne plačiai naudojamas JAV bei Europos kokybės sertifikatus turintis *Hybrid Capture 2 (HC2)* metodas. PGR yra ypač jautrus, greitas, komerciškai prieinamas metodas, kuriam reikalingas nedidelis tiriamosios medžiagos kiekis, ir kuriuo galima tiksliai identifikuoti ŽPV tipus [4]. *HC2* metodas nenustato ŽPV genotipų, galimi klaidingai neigiami rezultatai, nes nėra vidinės kontrolės, o dėl kryžminių reakcijų galimi klaidingai teigiami rezultatai [4, 22, 28, 37]. Naujausi literatūros šaltiniai teigia, kad PGR turi daug perspektyvų ateityje ir manoma, kad ŽPV nustatymo standartas bus 14 DR-ŽPV tyrimas sujungtas su ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų nustatymu [37]. Todėl siekiant ŽPV tyrimams pasirinkti optimaliausią iš Lietuvoje siūlomų komercinių rinkinių Valstybiniame patologijos centre buvo atliekamas šis tyrimas. Tyrimams naudoti trijų gamintojų keturi skirtingi ŽPV diagnostiniai rinkiniai. Visi ŽPV diagnostiniai rinkiniai skirėsi nustatomais ŽPV tipų spektrais, todėl buvo svarbiausia pasirinkti testą, kuris atitiktų tyrėjų ir pacientų poreikius.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Įvertinti ŽPV diagnostikai skirtus komercinius rinkinius ir parinkti tinkamiausią.

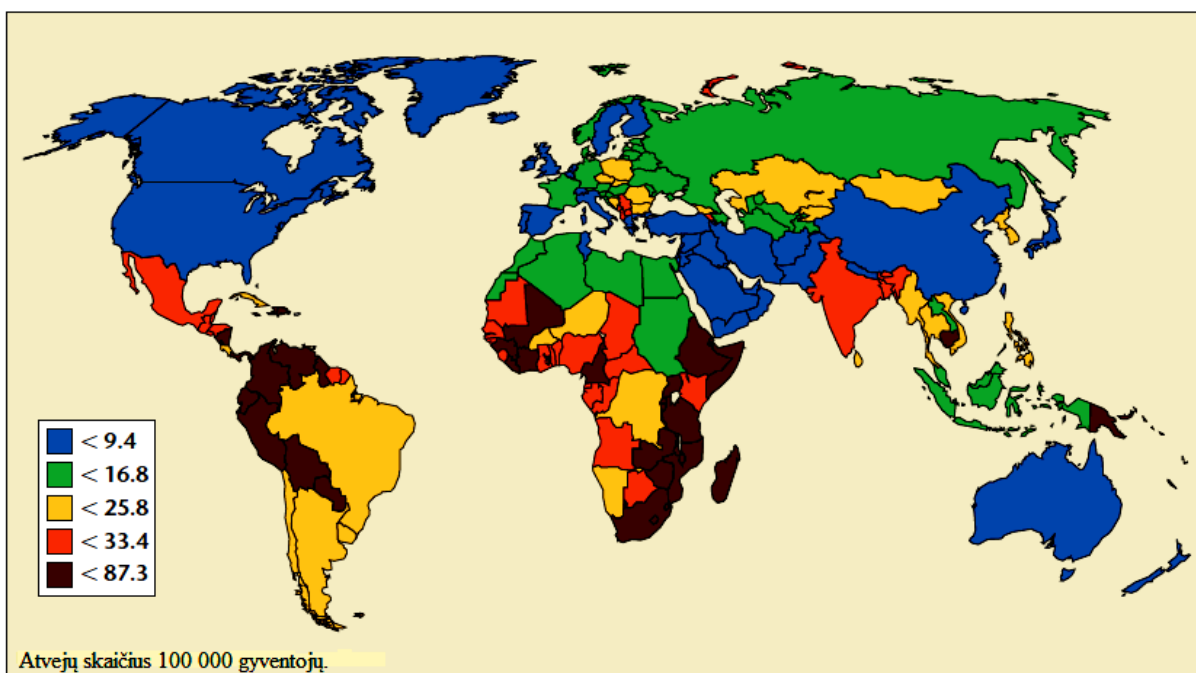
Darbo uždaviniai:

1. Tiriamuosiuose mėginiuose nustatyti ŽPV infekciją šiais rinkiniais:
 - „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“;
 - AB „Sorpo Diagnostics“;
 - „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“;
 - „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“.
2. Sugretinti gautus tyrimų rezultatus, kuriais remiantis parinkti ŽPV diagnostikai tinkamiausią rinkinį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Gimdos kaklelio vėžio paplitimas

Gimdos kaklelio vėžys pasaulyje yra antroji pagal dažnumą moterų onkologinė liga. Besivystančiose šalyse ši liga pirmauja, o išsivysčiusiose – užima šeštąją vietą tarp moterų onkologinių ligų [31]. Lietuvoje gimdos kaklelio vėžys užima 4 vietą pagal sergamumą piktybiniais navikais tarp moterų [26, 24]. Daugiausiai gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų yra Lotynų Amerikoje ir Karibuose, Afrikoje žemiau Sacharos ir Pietryčių Azijoje (1 pav.) [35]. Kiekvienais metais nuo šios ligos miršta apie 250 000 moterų [5].



1 pav. Sergamumas gimdos kaklelio vėžiu pasaulyje [35]

Dažniausiai pasaulyje serga 30 – 50 metų amžiaus moterys. Lietuvoje kasmet suserga apie 500 moterų [25], o 2005 m. nuo gimdos kaklelio vėžio mirė 236 moterys [49]. Mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio mūsų šalyje – vienas didžiausių Europoje. Lietuvoje, kaip ir kai kuriose Europos šalyse, pastebimas sergamumo gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumo didėjimas tarp jaunų moterų. Mažėjimas pastebimas tarp 50 metų ir vyresnių moterų, o jaunesnių kaip 50 metų moterų sergamumas didėja. Sergamumo ir mirtingumo pokyčiai Lietuvoje rodo, kad būtina aktyviai įgyvendinti gimdos kaklelio vėžio profilaktikos priemones. Ankstyva ligos stadija yra

nepaprastai svarbus veiksnys sėkmingam gydymui, ir tai turėtų nulemti mirtingumo mažėjimą. Tačiau Lietuvoje 1994 – 1999 metais tik apie 50 proc. naujai nustatyto gimdos kaklelio vėžio buvo I – II stadijos. Ankstyvosios diagnostikos programų įgyvendinimas, ankstyvas ikivėžinių ligų diagnozavimas ir veiksmingas gydymas leidžia žymiai sumažinti sergamumą gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumą nuo jo [1].

1 lentelė. Sergamumas gimdos kaklelio vėžiu Lietuvoje 1999-2009 m., intensyvinis rodiklis (atvejai/100 000 gyventojų) [49]

Rodikliai	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Sergamumas	23,6	24,0	26,0	25,3	25,1	31,1	27,4	28,0	26,9	27,1	25,0

Lietuvos vėžio registro duomenimis, 2009 metais užregistruoti 448 nauji gimdos kaklelio vėžio atvejai. Iš jų 41,7 proc. – I stadijos, 19 proc. – II, 22,8 proc. – III, 8,5 proc. – IV ir 8 proc. nenurodytos stadijos. Intensyvinis rodiklis (atvejai/100 000 gyventojų) – 25,0 [49].

1.2. Iktivėžinės gimdos kaklelio ligos

Gimdos kaklelio ikivėžinės ligos – tai gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija (angl. *cervical intraepithelial neoplasia* – CIN). CIN – tai nesubrendusio gimdos kaklelio epitelio atipinė proliferacija, neprasisiskverbianti per epitelio bazinę membraną. Pagrindiniai displazijos kriterijai: sutrikęs epitelio brendimas, glikogeno stoka, nenormalūs branduoliai ir mitozės, į liaukas prasiskverbęs epitelis.

Gimdos kaklelio intraepiteliniai pokyčiai skirstomi taip:

CIN1 – mažo laipsnio displazija;

CIN2 – vidutinio laipsnio displazija;

CIN3 – didelio laipsnio displazija;

CIS – *carcinoma in situ*.

Remiantis Bethesda'os sistema, gimdos kaklelio epitelio pokyčiai skirstomi į dvi grupes: neryškūs pažeidimai – CIN1 ir ryškūs pažeidimai – CIN2, CIN3 (lot. *carcinoma in situ*, CIS) [33]. Citologiškai nustatyti nedidelio laipsnio pažeidimai vertinami LSIL (angl. *low-grade squamous intraepithelial lesions*) atitinka histologiškai nustatytą CIN1. Citologiškai nustatyti didelio laipsnio (sunkūs) pažeidimai – HSIL (angl. *high-grade squamous intraepithelial lesions*) atitinka histologinius CIN2 ir CIN3 pažeidimus. Citologiškai nustatyta CIS atitinka histologinius CIS pokyčius. Vertinant citologinius pokyčius nustatomos atipinės plokščio epitelio ląstelės –

ASCUS (angl. *atypical squamous cells of undetermined significance*). Šios ląstelės gali būti klasifikuojamos kaip nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės (ASC-US) ir atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, kai negalima paneigti HSIL (ASC-H) [15, 48].

1.3. Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai

Harald zur Hausen aštuntajame dešimtmetyje nustatė žmogaus papilomos virusą (ŽPV) karpose ir gimdos kaklelio vėžinėse ląstelėse. Vėliau atskyrė ir klonavo skirtingus ŽPV tipus. Jo tyrimų pasekoje buvo padaryta išvada, kad pacientai, infekuoti 16 ir 18 tipo ŽPV turi padidėjusią riziką išsivystyti vėžiui. 2008 m. Dr. Hausen apdovanotas Nobelio premija už novatoriškus ŽPV tyrimus [35]. ŽPV infekcija yra nustatoma nuo 90 iki 100 proc. gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų ir tik 5 – 20 proc. – sveikų moterų. Tačiau tik nedidelė dalis sveikų moterų, infekuotų ŽPV (nuo 3 iki 10 proc. – priklausomai nuo populiacijos), yra infekcijos nešiojos [18]. Moterims sergančioms gimdos kaklelio vėžiu, dažniausiai nustatomi ŽPV tipai yra 16 (49,9 proc.), 18 (13,7 proc.), 45 (8,4 proc.) ir 31 (5,3 proc.). Apie 50 proc. navikų, esant plokščialąsteliniam gimdos kaklelio vėžiui, turi ŽPV-16 tipo infekciją, o esant gimdos kaklelio adenokarcinomai – ŽPV-18 tipo infekciją [33].

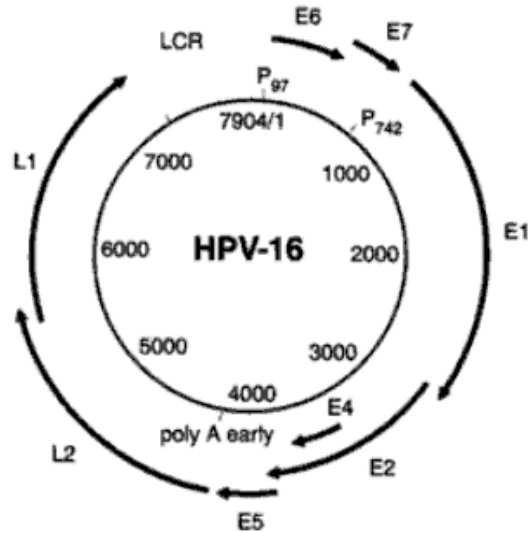
Žmogaus papilomos viruso infekcija yra perduodama dažniausiai lytiniu keliu [35]. ŽPV infekcija gimdos kaklelyje yra būtina, bet nepakankama priežastis vystytis gimdos kaklelio vėžiui. Todėl dabar dėmesys kreipiamas ir į pagalbinius veiksnius, kurie sąlygoja infekcijos progresavimą į didelio laipsnio gimdos kaklelio intraepitelinę neoplaziją (CIN) ir invazinę ligą [10]. Taip pat gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai yra ankstyvi pirmi lytiniai santykiai ir ankstyvas pirmasis nėštumas, hormoninių kontraceptikų vartojimas, didelis gimdymų skaičius, moters ir jos vyro lytinių partnerių skaičius, rūkymas ir kiti [8, 10, 19, 23, 32]. Tabako rūkymas, daug gimdymų, ilgalaikis oralinių kontraceptikų vartojimas, lėtinės ligos ir kitos lytiškai plintančios infekcijos (pvz., *Chlamydia trachomatis* ir herpes simplex viruso 2 tipas (HSV-2)) gali būti didelės ir ilgalaikės NO (azoto oksido) koncentracijos gimdos kaklelio mikroaplinkoje priežastimi. NO – laisvasis radikalas. Didelė NO koncentracija yra siejama su kancerogeneze, nes sukelia DNR pažeidimų ir mutacijų. Taigi, NO yra molekulinis kofaktorius ŽPV infekcijai gimdos kaklelio kancerogenezėje. Vietiškai reguliuojant NO koncentraciją gimdos kaklelyje, būtų galima sudaryti planą, kaip sumažinti su ŽPV infekcija susijusio vėžio riziką [45].

1.4. Žmogaus papilomos virusas (ŽPV)

Papillomaviridae šeimai priklauso daugiau nei 180 didelės įvairovės virusų, kurie infekuoja įvairius gyvūnus, nuo paukščių iki žinduolių, tame tarpe ir žmogų. Daugiau nei 100 žmogaus papilomos viruso (ŽPV) tipų siejami su įvairiais gėrybiniais ir piktybiniais epitelio pažeidimais [3, 42, 47]. ŽPV gali sukelti gimdos kaklelio, makšties, moters išorinių lytinių organų, varpos ir analinės angos vėžius, taip pat kai kuriuos galvos ir kaklo vėžius, kvėpuojamąją papilomatozę, lytinių organų karpas ir kitas ligas [2, 38]. Apie 20 ŽPV tipų yra susiję su gimdos kaklelio vėžiu [24].

ŽPV yra mažas DNR virusas, kuris neturi apvalkalėlio. Virusų dydis apie 55 nm. Jo DNR yra dvigrandė, žiedo formos, uždara, sudaryta iš apytiksliai 7200 – 8000 bazių porų. Virusų genomai yra padalinti į tris regionus: ankstyvąjį (angl. *early-E*), vėlyvąjį (angl. *late-L*) ir genomo reguliacinę sritį (angl. *long control region, LCR*), kuri nekoduoja jokių baltymų. Visiems papilomos virusams būdinga tai, kad šias sritis skiria dvi poliadenilintos (pA) sritys: ankstyvoji pA (A_E) ir vėlyvoji pA (A_L). ŽPV genome yra du struktūriniai (vėlyvieji) (*L1* ir *L2*) ir šeši funkciniai (ankstyvieji) genai (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7*) (2 pav.) [38, 42, 47]. Struktūriniai genai užima apie 40 proc., funkciniai genai apie 50 proc., o *LCR* apie 10 proc. virusų genomo [47]. Genų produktai – baltymai. Visi virusų baltymai turi savo funkcijas:

- *L1* – didysis kapsidės baltymas ir *L2* – mažasis kapsidės baltymas, jungiasi prie genomines DNR. Tai struktūriniai baltymai;
- *E1* baltymas reguliuoja DNR replikacijos pradžią;
- *E2* baltymas yra transkripcijos aktyvatorius, pagalbinis DNR replikacijos veiksnys;
- *E4* baltymas infekcijos židinyje ardo ląstelių citokeratino gijas, todėl yra svarbus viruso išėjimui iš ląstelių;
- *E5* yra membraninis baltymas, pasižymintis transformuojančiomis savybėmis. Baltymas sąveikauja su augimo faktorių receptoriais;
- *E6* yra transformuojantis baltymas, kurio taikinyje p53 baltymas. p53 inaktyvuojamas ir suskaldomas prijungiant ubikvitiną;
- *E7* yra transformuojantis baltymas, kuris jungiasi prie Rb baltymo ir jį inaktyvuoja [42, 47].



2 pav. ŽPV – 16 genomo struktūra [42]

2 paveiksle pavaizduotas ŽPV-16 genominis žemėlapis, kuris gali būti visų ŽPV genotipų prototipiniu genomo žemėlapiu. Kai kurie genomo regionai yra tipui specifiniai. Šiems regionams būdingas sekų kintamumas. *L1* genui, kuris koduoja didį kapsidės baltymą, būdingas didžiausias polimorfizmas. Be to, sekos polimorfizmas būdingas ir *E6*, ir *E7* genams. Šių sekų skirtumai lemia ŽPV tipus, potipius ir variantus. Tipai skiriasi savo onkogeniškumu [28, 47].

2 lentelė. ŽPV genotipų klasifikacija [3]

Viruso Onkogeninės rizikos grupė	ŽPV tipas
Didelės rizikos (DR)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 ir 82
Galimai didelės rizikos	26, 53, 66
Mažos rizikos (MR)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ir CP6108
Nenustatytos rizikos	34, 57, 83

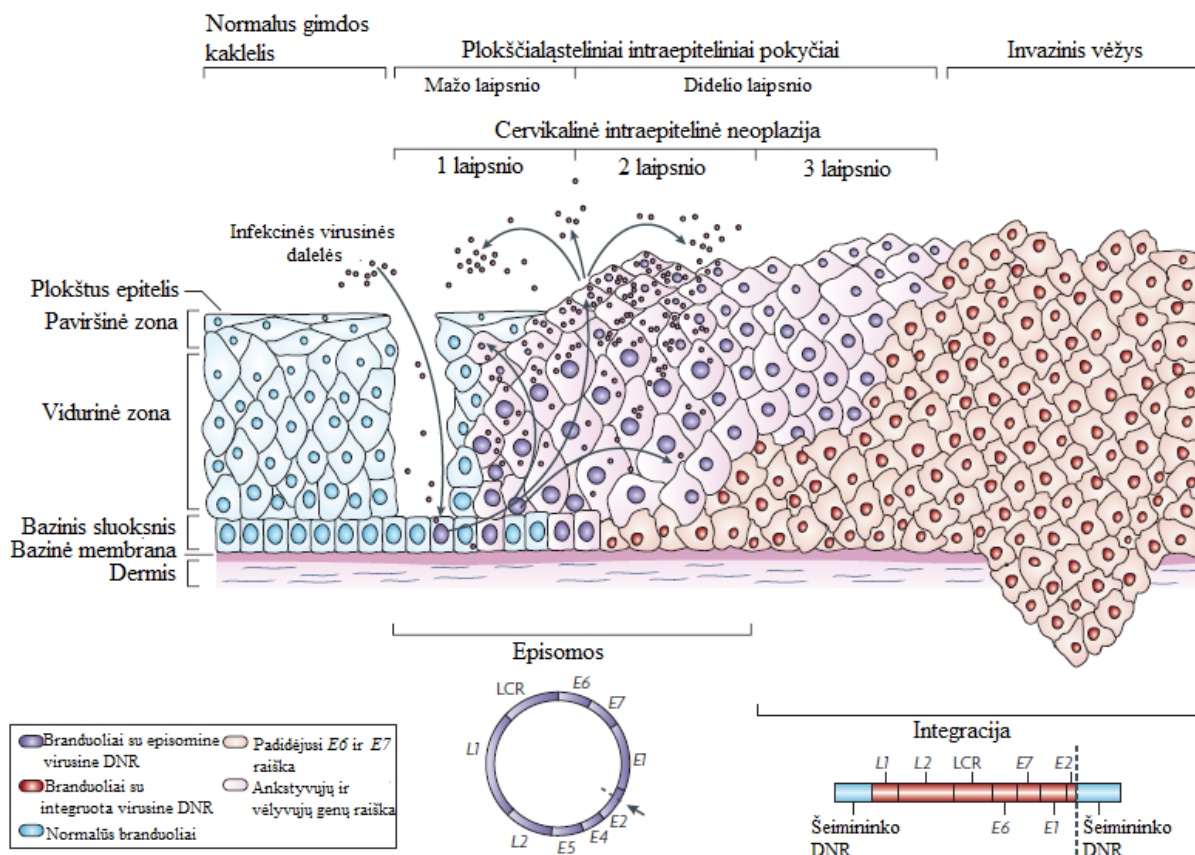
ŽPV skirstomi į didelės, galimai didelės ir mažos onkogeninės rizikos grupes. 15 ŽPV tipų priskiriami didelės onkogeninės rizikos grupei, 3 galimai didelės rizikos, 12 – mažos rizikos ir 3 – nepatikslintos onkogeninės rizikos virusų grupei (2 lentelė) [3]. Gimdos kaklelio piktybiniuose navikuose dažniausiai randami didelės onkogeninės rizikos ŽPV tipai. Vien ŽPV-16 tipas yra atsakingas už 58,9 proc. gimdos kaklelio vėžio atvejų [38, 47]. ŽPV-16 organizme išbūna ilgiausiai. Yra duomenų, kad 18 tipo ŽPV infekcija susijusi su didesnio invazyvumo gimdos kaklelio neoplazija ir blogesne moters gyvenimo prognoze, palyginti su 16 tipo ŽPV infekcija

[41]. Vidutinės onkogeninės rizikos grupei priskiriami tie virusų tipai, kurie vienodai dažnai nustatomi ir gimdos kaklelio vėžiu sergančioms, ir sveikoms moterims. Mažos onkogeninės rizikos grupės virusai rečiau randami piktybiniuose navikuose, nes jų E6 ir E7 baltymai silpniau inaktyvuoja ląstelės vėžio slopinimo baltymus p53 ir pRb, nei didelės onkogeninės rizikos ŽPV tipų E6 ir E7 baltymai. Mažos onkogeninės rizikos virusai sukelia karpas [38, 47]. Remiantis šiomis ŽPV tipų savybėmis gali būti kuriami tipui specifiniai molekuliniai testai [28].

1.5. ŽPV infekcijos patogenezė

Papilomos virusas replikuojasi ir telkiasi išskirtinai tik branduolyje, ir tik baziniame plokščiojo epitelio sluoksnyje. Virusas replikacijai naudoja epitelio diferenciaciją (3 pav.). Virionas patenka į ląstelę per epitelio mikroįbrėžimus ir infekuoja baziniame sluoksnyje esančias kamienines ląsteles. Šiose ląstelėse virusas replikuojasi episominėje formoje, naudodamas du nestruktūrinius baltymus – ankstyvuosius E1 ir E2. ŽPV DNR integracijos metu viruso genomus dažniausiai nutrūksta E1 ir E2 genų atvirame skaitymo rėmelyje. Virusų genomo reguliacinė sritis (LCR) ir genai E6/E7 lieka nepakitę. E2 geno, koduojančio baltymus, kurie slopina E6 ir E7 sričių transkripciją, iškrita sąlygoja nekontroliuojamai padidėjusią E6 ir E7 baltymų raišką. E6 ir E7 genai pasižymi stipriu onkogeniškumu. Nestruktūrinių baltymų E6 ir E7 raiška sutrikdo ląstelių ciklą, apoptozę ir diferenciaciją. Jie užtikrina viruso replikaciją, ląstelės imortalizaciją ir transformaciją. E6 ir E7 baltymai inaktyvuoja ląstelės vėžio slopinimo baltymus p53 ir pRb. Inaktyvius p53 baltymą, sutrinka ląstelės ciklas ir susidaro palanki galimybė mutacijoms ląstelėje atsirasti. E7 genui susijungus su pRb genu atsipalaiduoja transkripcijos veiksnys E2F, kuris aktyvuoja genų, skatinančių DNR sintezę ląstelėje, raišką. pRb baltymas slopina p16^{INK4a} transkripciją. p16^{INK4a} yra geno, koduojančio nuo ciklino priklausomą kinazę, slopiklis. Po pRb inaktyvacijos ląstelėje gausiai sintetinas p16^{INK4a}. Kadangi p16^{INK4a} gausiai sintetinas pakitusiose gimdos epitelio ląstelėse ir jo raiška tiesiogiai koreliuoja su gimdos kaklelio epitelio displazijos laipsniu, tai yra jautrus ir specifinis biologinis žymuo tiriant ŽPV infekciją. Visi šie procesai stebimi epitelio ląstelėms keliaujant nuo bazinės membranos į viršutinius epitelio sluoksnius, kur jie virsta subrendusiais keratinocitais. Subrendę virionai išlaisvinami iš epitelio ir patenka į paviršines epitelio ląsteles [16, 29, 41, 42, 47]. Didelės rizikos ŽPV tipai daug lengviau panaikina ląstelės ciklo patikros taškus nei mažos rizikos ŽPV. Esant tam tikroms sąlygoms, viruso onkobaltymų E6 ir E7 gamyba labai padidėja dėl pagrindinio viruso promotoriaus veiklos

reguliacijos ir dėl padidėjusio šių baltymų iRNR stabilumo. Progresuojant ląstelių pyktibiškėjimui, infekuotos virusu ląstelės praranda galimybę diferencijuotis ir matomi ryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai (HSIL). Tai gimdos kaklelio vėžio pradžia. Be to, galutinė keratinocitų pakitimo stadija nustatoma, jei jie gamina viruso kapsidės baltymus. Didėjant neoplazijos laipsniui, ląstelių diferenciacija mažėja ir L1 bei L2 transkriptai nebenustatomi. Galiausiai, piktybėjimo pokyčiai bus susiję su E6 ir E7 kiekio didėjimu ir L1 bei virusinės DNR mažėjimu [3].



3 pav. Gimdos kaklelio vėžio progresavimas veikiant ŽPV [46]

Nuo infekcijos praėjus maždaug 8 – 12 mėnesių, infekuotose ląstelėse gali pradėti vystytis ikivėžiniai pokyčiai, kurie gali virsti gimdos kaklelio intraepiteline neoplazija (CIN) arba adenokarcinoma *in situ* (AIS). Negydoma CIN2, CIN3 ar AIS gali atitinkamai išsivystyti į epitelio ląstelių karcinomą arba adenokarcinomą [35].

Ikivėžiniuose gimdos kaklelio audiniuose ŽPV DNR paprastai yra episominėje (neintegruotoje į ląstelės DNR) būklėje, o vėžiniuose – ŽPV DNR gali būti ir integruotoje, ir

episominėje formoje. Todėl didelis dėmesys skiriamas naujiems tyrimams, kurių tikslas – nustatyti DR-ŽPV išsiskverbimą į gimdos kaklelio ląstelių genomą, kuris gali turėti įtakos gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių progresijai [41].

1.6. Gydymas ir apsauga

ŽPV sukeliama gimdos kaklelio vėžio dažniausiai galima išvengti. Išsivysčiusiose šalyse, tokio tipo vėžys turi geriausias prognozes iš visų vėžių, nes jam būdingas labai sėkmingas gydymas [3]. Vakarų šalyse ikivėžiniams pokyčiams ar vėžinėms ląstelėms nustatyti yra naudojamas citologija paremtas Papanicolaou testas (*Pap*) ir ŽPV DNR testas. Vėliau seka kolposkopija, kuria įvertinamas gimdos kaklelis ir paimama biopsinė medžiaga. To rezultatas išsivysčiusiose šalyse – sumažėjęs mirtingumas nuo gimdos kaklelio vėžio. Besivystančiose šalyse gimdos kaklelio vėžio patikra ir diagnozė – tai iššūkis, nes susiduriama su finansų, infrastruktūros, patyrusių patologų stoka [35]. Atrankinė moterų patikros programa dėl gimdos kaklelio patologijos Lietuvoje pradėta tik 2004 m. Gimdos kaklelio vėžio profilaktika ir ankstyva diagnostika remiasi citologinėmis atrankinėmis patikros programomis. Tačiau gydant šią patologiją ir vykdant egzistuojančias patikros programas neatsižvelgiama į šios ligos virusinę etiologiją [26]. Šiuo metu pagrindinis gimdos kaklelio vėžio gydymo būdas – chirurginis kombinuotas su radioterapija ar chemoterapija. Tokiu būdu išgydoma beveik 100 proc. vietiško neišplitusio vėžio atvejų. Manoma, kad išplitęs vėžys, kuris dažniausiai diagnozuojamas besivystančiose šalyse, nėra pagydomas [25].

Kas antras žmogus savo gyvenime užsikrečia žmogaus papilomos virusu [38]. Kai ŽPV infekuoja gimdos kaklelio epitelį, nors ir 50 proc. pacientų organizmas pradeda gaminti serumo antikūnus, jie nėra efektyvūs, nebent yra nukreipti prieš L1 baltymą [35]. Pastaruoju metu sukurtos dviejų rūšių vakcinos prieš ŽPV – profilaktinės ir terapinės. Vakcinos, kurios sukelia neutralizuojančių antikūnų gamybą prieš ŽPV struktūrinius L1 ir L2 baltymus, vadinamos profilaktinėmis. Vakcinos, kurios indukuoja ląstelinį imunitetą prieš viruso baltymus ir sugeba sukelti su ŽPV susijusių pažeidimų regresiją, vadinamos terapinėmis. E6 ir E7 baltymai yra natūralūs šių vakcinų taikiniai, nes jie gaminami gimdos kaklelio vėžio ląstelėse [26]. Pasaulinė sveikatos organizacija (PSO) rekomenduoja įtraukti ŽPV vakciną į šalių skiepijimo programas ir skiepyti 9 – 13 metų mergaites, iki jų pirmų lytinių santykių. Tačiau Papanicolaou testas, ŽPV

DNR testas ir ŽPV vakcinės realiai nėra prieinamos moterims, kurios gyvena besivystančiose šalyse [35].

1.7. Gimdos kaklelio patikra

Gimdos kaklelio visuotinio tikrinimo programos, paremtos vien Papanicolaou testu, yra ribotos. *Pap* testas yra labai specifinis neoplazinių pokyčių nustatymui, bet jis nėra labai jautrus [3]. Jautrumo ribos svyruoja nuo 30 iki 80 proc., o specifiškumo – nuo 86 iki 100 proc. Pradėjus naudoti vienasluoksnę (skystų terpių) citologiją *Pap* tepinėlio jautrumas padidėjo nuo 2,8 iki 12,0 proc. [41]. *Pap* testas reikšmingas diagnozuojant CIN diferenciacijos laipsnį nuo normalaus epitelio iki pakitusio. Nustačius labai ryškius pokyčius, rekomenduojama atlikti kolposkopiją. *Pap* testas daugiau skirtas nustatyti patologijai (pvz., \geq CIN1), o genotipavimas tiksliausiai nustato ligos stadiją CIN2 ar daugiau [3].

Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugija (ASCCP) sukūrė rekomendacijas, kurios leis geriau pasirūpinti moterimis ir padės sumažinti netikslingai atliekamų ŽPV tyrimų skaičių [40]. Rekomendacijos yra kuriamos remiantis įrodymais paremtais duomenimis. Taip bendru susitarimu sudaroma sistema, kuria remiantis galima teikti optimalias sveikatos priežiūros paslaugas kiekvienai moteriai skirtingu jos gyvenimo laikotarpiu. Tačiau rekomendacijos negali ir neturėtų trukdyti kiekvieno paciento atveju priimant klinikinius sprendimus. Klinikiniame darbe nuokrypis nuo rekomendacijų turėtų būti labiau išimtis nei taisyklė [11].

1. Didelės rizikos (onkogeninius) ŽPV tipus yra tikslinga tirti šiais atvejais:
 - 1.1. Rutiniškai atliekant gimdos kaklelio vėžio patikras kartu su citologija (dvigubas tyrimas) moterims, kurioms yra 30 ir daugiau metų.
 - 1.1.1. Moterims, kurių citologinio tyrimo rezultatai yra neigiami, o ŽPV – teigiami, kartoti abu tyrimus 12 mėnesių bėgyje.
 - 1.1.2. Moterims, kurių abiejų tyrimų rezultatai neigiami, kartoti abu tyrimus kas tris metus.
 - 1.2. Moterims, kurioms yra 21 metai ir daugiau bei citologiškai nustatyti atipiniai nenustatytos kilmės plokščiojo epitelio pokyčiai (ASC-US).
 - 1.3. Moterims po menopauzės, kurioms nustatyti neryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai (LSIL).

- 1.4. Bet kokio amžiaus moterims po kolposkopijos, kurioms pirminio citologinio tyrimo metu buvo rastos atipinės liaukinio epitelio ląstelės (AGC) ar atipinės plokštaus epitelio ląstelės, kai negalima atmesti HSIL (ASC-H).
- 1.5. 21 metų ir vyresnėms moterims po kolposkopijos, kurios pirminės citologinės patikros metu buvo nustatyta ASC-US arba LSIL.
- 1.6. Sekimui po gimdos kaklelio vėžio gydymo.
2. Didelės rizikos (onkogeninių) ŽPV tipų tyrimas yra dažniausiai nereikalingas tokiais atvejais:
 - 2.1. Rutiniškai atliekant gimdos kaklelio vėžio patikras jaunesnėms nei 30 metų moterims.
 - 2.2. Rutiniškai atliekant ŽPV ir citologinį tyrimus dažniau nei kas 3 metus 30 metų moterims ir vyresnėms, kurioms prieš tai atlikti abu tyrimai buvo neigiami.
 - 2.3. Paauglių ir jaunų moterų (20 metų ir jaunesnių) su bet kokias citologiniais pokyčiais stebėjimui; jei ŽPV tyrimas atliekamas, jo rezultatai neturėtų įtakoti pacientės priežiūros.
 - 2.4. LSIL patvirtinimui (išskyrus moteris po menopauzės).
 - 2.5. Kaip pirminė priemonė ASC-H, HSIL ar AGC/AIS patvirtinimui bet kokio amžiaus moterims.
3. Pakartotiniai didelės rizikos (onkogeninių) ŽPV tipų DNR tyrimai neturėtų būti atliekami dažniau nei kas 12 mėnesių.
 - 3.1. Išskyrus tuos atvejus, kai yra stebima pacientė po CIN2, CIN3 gydymo ir, kai nustatomos atipinės liaukinės ląstelės, kurios kitaip nepatikslintos (AGC NOS).
4. Mažos rizikos (neonkogeninių) ŽPV tipų nustatymas neturi jokios reikšmės rutininei gimdos kaklelio vėžio patikrai ir gimdos kaklelio citologinių pokyčių vertinimui [40].

Žmogaus papilomos virusas neturėtų būti tiriamas ir kaip lytiškai plintanti liga (LPL). ŽPV yra labai dažnas ir, priešingai nei kitoms LPL, jam nėra gydymo. ŽPV taip pat nereiktų tirti patikrai prieš skiepimą nuo ŽPV [11]. Derinant abu testus (ŽPV tyrimą ir *Pap* tepinėlį), bendras šių testų jautrumas siekia 99–100 proc., todėl Lietuvoje šiuo metu svarstoma galimybė įtraukti ŽPV testą į pirminės patikros programą [41, 46].

1.8. Molekuliniai ŽPV nustatymo metodai

Žmogaus papilomos viruso neįmanoma auginti įprastose ląstelių kultūrose *in vitro*. Kitiems klasikiniams tiesioginiams virusų diagnostikos metodams, tokiems kaip elektroninė mikroskopija ar imunohistochemija, trūksta jautrumo ir specifiškumo tam, kad juos būtų galima taikyti

rutininiuose ŽPV tyrimuose. Serologiniams tyrimams, kuriais būtų galima nustatyti anti-ŽPV antikūnus, būdingas ribotas analitinis tikslumas ir šio tyrimo galima klinikinė nauda kol kas nenustatyta. Todėl visi šiuo metu naudojami ŽPV diagnostiniai testai („*in house*“ ar komerciniai) remiasi molekulinės biologijos tyrimo metodais. Egzistuoja daugybė molekulinių metodų ŽPV aptikimui ir kiekybiniam nustatymui [28, 44, 37].

Tyrimo metodus apibūdina jautrumo ir specifiškumo rodikliai. Metodo jautrumas – nustatymo riba arba mažiausias galimas DNR kiekis, kurį dar galima aptikti. Specifiškumas apibrėžia tyrimo metodo tikslumo lygį. Tyrimo metodo tikslumą didina kuo mažesnis klaidingai teigiamų ir klaidingai neigiamų atsakymų skaičius. Kiekvienas diagnostinis tyrimas turi siekti aukščiausios teigiamos ir neigiamos prognozuojamos vertės, kurias apibrėžia jautrumas ir specifiškumas [28].

Kai kurių ŽPV tyrimo metodų analitinis jautrumas labai didelis, tačiau nustatyta ŽPV infekcija gali būti kliniškai nereikšminga. Taip yra todėl, kad ŽPV infekcija gali būti trumpalaikė, dėl to kliniškai nesukels su ŽPV susijusių ligų. Siekiant padidinti klinikinį ŽPV tyrimo metodų jautrumą reikėtų:

1. tirti tik kliniškai svarbius didelės rizikos ŽPV tipus;
2. atlikti viruso kiekio matavimus;
3. nustatyti didelės rizikos ŽPV tipų E6 ir E7 transkriptus;
4. pasidomėti paciento ankstesnių ŽPV infekcijų tyrimo istorija [44].

ŽPV infekcijos diagnostikai taikomi metodai pasižymi skirtingu jautrumu ir specifiškumu. Metodai, kuriuose naudojami įvairūs DNR ar RNR zondai (*Southern Blot*, *in situ* hibridizacija) yra mažiausiai jautrūs. Didžiausiu jautrumu pasižymi DNR padauginimu paremti metodai. ŽPV nustatymui naudojamos trys pagrindinės nukleorūgščių hibridizacijos metodų formos:

1. Tiesioginiai nukleorūgščių zondų metodai (angl. *direct nucleic acid probe methods*);
2. Hibridizacijos signalo amplifikacija (angl. *hybridization signal amplification*);
3. Taikinio padauginimas (angl. *target amplification*) [28].

1.8.1. Tiesioginis zondų metodas

Southern blot – tai technologija, kuri anksčiausiai buvo pradėta naudoti ŽPV tyrimams [28]. *Southern blot* (arba RNR molekulių tyrimo metodas *Northern blot*) yra labai geras kokybinis DNR molekulių tyrimo metodas. Tačiau tyrimo atlikimas užima daug laiko ir jam reikia didelio

kiekio labai gerai išgrynintų nukleorūgščių. Ypač netinka tiriamoji medžiaga išskirta iš fiksuotų audinių, nes jų DNR jau yra apirusi. Tyrimas taip pat netinkamas didelės apimties populiacijų tyrimams, nes technologija yra sudėtinga ir tyrimo atlikimas užima nemažai laiko [44].

Kitas tiesioginių zondų metodas – *in situ* hibridizacija (ISH). Tai technologija, kurios dėka specifinės nukleotidų sekos yra nustatomos ląstelėse arba audinių pjūviuose išsaugojusiuose morfologiją. Taigi, metodas suteikia galimybę nustatyti taikinio genomo buvimo vietą biologiniame mėginyje [37, 44]. Technologija panaši į imunohistochemiją [28]. *In situ* hibridizacija paremti tyrimai nustato ŽPV antigenines struktūras arba nukleorūgštis (DNR ar iRNR) [22]. Tyrimo rezultatai vertinami mikroskopiškai. Jei epitelio ląstelių branduoliuose yra matomi atitinkami precipitatai, tai tiriamajame mėginyje yra ŽPV. Intergruotoms viruso formoms būdingas taškinis signalas, o difuziškas signalas – episominėms viruso formoms. Nors ŽPV tyrimai paremti ISH yra techniškai patvirtinti, bet jų klinikinė vertė nepakankama [37]. Didelis ISH privalumas, kuris įveikia palyginti mažą tyrimo jautrumą, yra tai, kad juo galima tirti audinius, kurie prieš tai buvo fiksuoti ar kitaip apdoroti. Jautrumas gali būti padidintas sujungus ISH su PGR. Tokia metodika žinoma kaip *in situ* PGR. ISH gali būti naudojamas informacinės RNR nustatymui, kuri yra geno raiškos žymuo, kai viruso baltymo kiekis yra labai mažas. Pastaruoju metu patobulinus šį metodą, ISH tapo plačiausiai naudojamu ŽPV DNR ir RNR nustatymo metodu audiniuose. Didžiausias metodo trūkumas yra galima pradmenų kryžminė hibridizacija, dėl ko gali būti klaidingai nustatomi ŽPV tipai [44]. Klinikiniais tyrimais nustatyta tyrimo teigiama prognostinė vertė gimdos kaklelio ligų atveju apytiksliai 60 proc., neigiama prognostinė vertė – 97 proc., jautrumas – 86 proc., specifiškumas – 90 proc. [22].

Monokloniniai ir polikloniniai antikūnai taip pat naudojami ŽPV nustatymui. Jie jungiasi prie ŽPV būdingo linijinio didžiojo kapsidės baltymo epitopo. *GenPoint System* naudoja biotinu žymėtus zondus, kurie leidžia nustatyti ŽPV apdorotuose audiniuose (ir formaline fiksuotus) ar ląstelių preparatuose [22, 37].

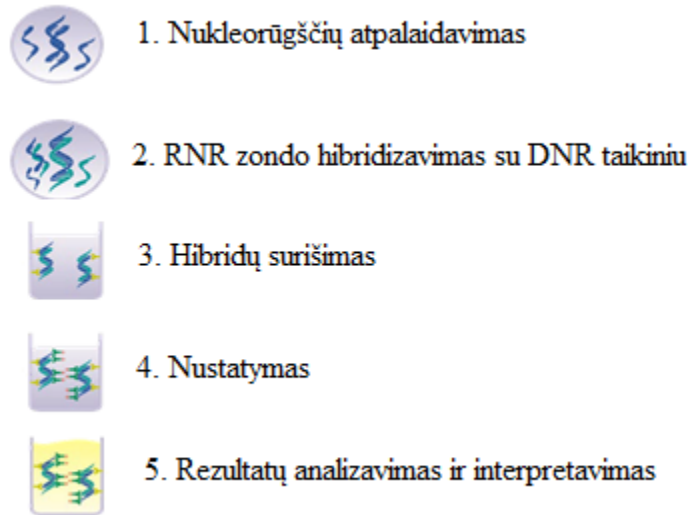
Tiesioginio zondų metodo trūkumai: mažas jautrumas, laiko užimanti technologija, reikalingas didelis kiekis labai gerai išgrynintos DNR, galimos kryžminės reakcijos [28].

1.8.2. Hibridzacijos signalo amplifikacija

Hibridzacijos signalo amplifikacijos metodai – tai praplėsta tiesioginių zondų metodika, kuri leido pasiekti didesnę nustatymo metodų jautrumą [28]. Šiuo metu viena iš pagrindinių ŽPV nustatymo technologijų yra „hibrido pagavimas“ 2 (angl. *Hybrid Capture*[®]2, HC2). Tai yra

trečiasis (prieš tai buvo *ViraPap* ir *Hybrid Capture[®]1*) 2003 metais JAV maisto ir vaistų administracijos (angl. *Food and Drug Administration, FDA*) patvirtintas gimdos kaklelio mėginių testas [4, 37]. Šis tyrimo metodas geriausiai tinka vidutinio dydžio ir didelėms laboratorijoms, kuriose jis būtų atliekamas kartu su skystų terpių Papanicolaou testu [4]. Tiriamoji DNR gali būti gaunama iš gimdos kaklelio biopsinės medžiagos, skystos terpės citologinių mėginių arba iš gimdos kaklelio nuograndų. ŽPV genotipų nustatymui *HC2* yra naudojami specialūs RNR zondai, kurie tiesiogiai jungiasi su komplementaria DNR seka [28]. *HC2* tyrimas susideda iš 5 etapų (4 pav.): 1) DNR išskyrimas ir denatūracija; 2) RNR zondų ir taikinio DNR hibridizacija; 3) RNR-DNR hibridų „pagavimas“, įtvirtinimas ant kietos fazės panaudojant antikūnus; 4) RNR-DNR hibridų nustatymas žymėtais antikūnais, sujungtais su šarmine fosfataze; 5) chemiliuminescencinio signalo matavimas. Molekulių išspinduliuota šviesa išmatuojama liuminometru santykiniais šviesos vienetais (SŠV, angl. RLUs). Kuo stipresnis švytėjimas, tuo didesnis DNR–RNR molekulių kiekis [4, 28, 44]. Tai pusiau kiekybinis viruso nustatymas [44]. *HC2* metodas suskirsto pacientus į grupes, infekuotas mažos ir didelės rizikos ŽPV. Nors tokie tyrimų rezultatai yra labai naudingi, tačiau jie nepateikia svarbios informacijos apie tai, kurio ŽPV genotipo infekcija yra mėginyje. Kadangi didelės rizikos ŽPV siejamas su gimdos kaklelio ligomis, svarbu tiksliai nustatyti ŽPV genotipą, nes jie skiriasi savo onkogeniniu stiprumu [28]. *HC2* „A“ RNR zondų mišiniu nustatomi 5 mažos rizikos ŽPV tipai: 6, 11, 42, 43, 44, o „B“ RNR zondų mišiniu nustatoma 13 didelės/vidutinės rizikos ŽPV tipų: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ir 68 [22, 28, 37, 44]. *HC2* tyrimas yra atliekamas 96 šulinėlių mikroplokštelėse, kuri yra patogi klinikinių tyrimų atlikimui ir jų automatizavimui [44].

HC2 yra standartizuotas metodas, turintis JAV maisto ir vaistų administracijos (angl. *FDA*) ir Europos (pranc. *Conformité Européenne, CE*) kokybės sertifikatus [4, 37].



4 pav. *Hybrid Capture*[®] technologijos veikimo principas [50]

HC2 privalumai: metodas turi JAV ir Europos kokybės sertifikatus, yra sukaupta daug duomenų, remiančių šią technologiją, metodo klinikinis jautrumas – 93 proc., neigiama prognostinė vertė – 99 proc. [4, 22, 37].

HC2 trūkumai: nėra vidinės kontrolės – galimi klaidingai neigiami rezultatai, nenustatomi ŽPV genotipai, dėl kryžminių reakcijų galimi klaidingai teigiami rezultatai. Vieno atlikto tyrimo rezultatai rodo, kad dėl kryžminių reakcijų buvo gauti 7,8 proc. klaidingai teigiamų atsakymų [7], kiti autoriai nurodo, kad 5 – 10 proc. atsakymų yra abejotini, neaiškūs arba paribiniai [22]. *HC2* tyrimui atlikti reikia 6 – 7 valandų, taigi daug laiko, intensyvaus darbo ir tyrimo metu reikia atlikti daug tikslių žingsnių, o tam būtini geri darbo laboratorijoje įgūdžiai. Tyrimo analitinis jautrumas – 1,0 pg taikinio DNR/ml, o tai yra maždaug 120 000 viruso dalelių [28, 22, 4, 37].

1.8.3. Taikinio padauginimas

Taikinio nukleorūgščių padauginimas, dažniausiai PGR, leidžia *in vitro* padauginti konkretias DNR sritis. Taikinio padauginimas yra lanksčiausias ir jautriausias iš visų DNR analizės metodų. Šie metodai yra labiausiai atrankūs. Jie gali atskirti mažiausius taikinio DNR sekos skirtumus. Technologija gali būti naudojama viruso kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui, DNR sekoskaitai ir mutacijų analizei. Šie tyrimai leidžia vienu metu atlikti dauginę analizę panaudojant ne vieną taikinį DNR sekoje [28].

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) yra jautriausias, labai plačiai naudojamas ŽPV infekcijos nustatymo metodas. Tai gali būti efektyviausia, veiksmingiausia ir universaliausia dabar esanti technologija ir ji turi daug perspektyvų ateityje [4, 44]. Tyrimo analitinis jautrumas svyruoja nuo 10 iki 200 ŽPV DNR kopijų [22]. PGR metodu galima nustatyti ŽPV DNR, ŽPV tipus, atskirų genų raišką, ŽPV įsiterpimo į ląstelės genomą žymenį – *E2* geno iškritą [41].

PGR paremtų metodų jautrumas ir specifiskumas varijuoja daugiausiai dėl:

- pradmenų komplekto;
- PGR produkto dydžio;
- reakcijos sąlygų ir reakcijai naudojamos DNR polimerazės aktyvumo;
- dauginamų ŽPV tipų spektro ir galimybės vienu metu nustatyti daug tipų;
- tipui specifinių tyrimų tinkamumo [44].

PGR yra temperatūrų kaita paremta ciklinė reakcija, susidedanti iš trijų pagrindinių žingsnių: DNR denatūracijos, pradmenų prijungimo ir pradmenų pratęsimo. Tokiu būdu panaudojant specifinius pradmenis, galima padauginti norimą DNR fragmentą daugybę kartų [4]. Reiktų saugotis klaidingai teigiamo rezultato, kuris gali atsirasti dėl kryžminių reakcijų, užteršus mėginį arba reagentus [44]. Daugumoje laboratorijų to išvengiama naudojant uracil-N-glikozilazę (AMPerazę), kuri pašalina PGR fragmentus (amplikonus) [28].

ŽPV nustatymui PGR metodu gali būti naudojami plataus spektro pradmenys: GP5+/GP6+, SPF10, MY09/11, PGMY. Jų dėka galime nustatyti daugelį ŽPV tipų vienos PGR metu. Šie pradmenys dažniausiai atpažįsta komplementarią seką *L1* geno srityje [28]. Tačiau iškrita *L1* kapsidės baltymo gene, gali būti priežastis klaidingai neigiamo rezultato [22]. Taip pat yra sukurti ŽPV tipams specifiniai pradmenys, kurie leidžia nustatyti konkretų ŽPV tipą [44].

Dažniausiai PGR produktai analizuojami agarozės gelio elektroforezės būdu. Agarozės gelio elektroforezės metu mėginys veikiant elektros srovei yra išskirstomas pagal fragmentų dydį. Maži fragmentai geliu juda greičiau nei dideli fragmentai. Kontrolės juostoje leidžiami fragmentai yra žinomo dydžio, taigi pagal juos galima nustatyti PGR produktų dydį.

ŽPV genotipavimas gali būti atliekamas įvairiais metodais: DNR sekoskaita, restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analize, taškine hibridizacija (angl. *dot blot*) [4]. ŽPV genotipavimas naudingas individualios rizikos, gydymo galimybių vertinimui, epidemiologijos tyrinėjimui ir vakcinų kūrimui [28].

Sekoskaita (sekvenavimas)

Vienintelis tyrimo metodas, galintis nustatyti visus ŽPV tipus ir variantus biologiniame mėginyje, yra viruso genomo DNR sekos nustatymas. Ši technologija teikia vilčių, kad bus sužinota kol kas neapibūdintų ŽPV genotipų sekų informacija, taip pat informacija leis nustatyti mutacijas atsiradusias jau žinomuose ŽPV genotipuose. Tačiau šis metodas yra labiau tinkamas moksliniams tyrimams, nes yra brangus, tyrimo atlikimo laikas yra ilgas ir jo panaudojimo galimybės kaip *in vitro* diagnostinio testo yra ribotos [28, 37, 44].

Tikro laiko PGR (TL-PGR)

Kitas, naujesnis ŽPV infekcijos ir įsiterpimo į genomą nustatymo būdas yra tikro laiko PGR (TL-PGR). Atliekant TL-PGR naudojami tipui specifiniai arba plataus spektro pradmenys, kurie jungiasi su fluorescuojančiais žymenimis ir stebimas produkto pagausinimas realiame laike, tiesiogiai vykstant reakcijai. Šiuo būdu galima nustatyti ir atskirų onkogenų *E6*, *E7* raišką, integruotus transkriptus (*E6*, *E7* iRNR), nustatyti jų kiekį, *E2* geno iškritą [41].

Visos TL-PGR sistemos remiasi kokybiniu ir kiekybiniu fluorescuojančių signalų nustatymu. Signalo stiprumas yra tiesiogiai proporcingas PGR produkto kiekiui. Remiantis šia technologija, matematiškai iš reakcijos kreivių galima apskaičiuoti viruso kiekį. Reakcija vyksta 96 šulinėlių plokštelėje, todėl PGR produktų analizei nereikia naudoti gelių. Tai naudinga tuo, kad vienu metu galima atlikti daug tyrimų. Tikro laiko kiekybinis PGR (angl. *RQ-PCR*) yra jautriausias taikinio padauginimo metodas. Teoriškai TL-PGR analitinis jautrumas yra viena taikinio nukleorūgščių seka [28].

PGR privalumai: ypač jautrus, greitas, reikalingas nedidelis tiriamosios medžiagos kiekis, tiksliai nustato ŽPV tipus, komerciškai prieinamas [4].

PGR trūkumai: tai ypatingai jautrus metodas, todėl galimi klaidingai teigiami rezultatai dėl mėginio užteršimo tiriamąja ar padauginta medžiaga. Galimi klaidingai neigiami rezultatai dėl galimų reakcijos slopiklių klinikiniuose mėginiuose, dėl iškritos tiriamame L1 kapsidės baltymo gene [22, 44].

1.8.4. Alternatyva ŽPV DNR tyrimams – ŽPV iRNR tyrimai

Neseniai ŽPV RNR tapo svarbiu ŽPV infekcijos molekulinės diagnostikos taikiniu. Priešingai nei ŽPV DNR tyrimai, kurie parodo tik ŽPV genomo buvimą, RNR tyrimų tikslas – įvertinti ŽPV genomo raišką, vadinasi viruso aktyvumą infekuotose ląstelėse. Naudojant PGR

paremtus metodus (atvirkštinės transkriptazės PGR, kiekybinį TL-PGR ir TL-PGR) gali būti nustatyti ŽPV E6 ir E7 transkriptai [44].

PreTect *HPV-Proof*er tyrimas (*NorChip*) nustato ŽPV E6/E7 onkogeninį aktyvumą. Tiriama penkių dažniausiai pasitaikančių didelės rizikos ŽPV tipų (16, 18, 31, 33 ir 45) E6/E7 iRNR raiška. Šie didelės rizikos ŽPV tipai nustatomi beveik 89 – 97 proc. gimdos kaklelio karcinomos atvejų. Tyrimas jungia nukleorūgščių sekos padauginimo technologiją ir nustatymą tikru laiku naudojant molekulinis žymenis. Reakcijos principas: iRNR paverčiama kDNR atvirkštinės transkriptazės fermento pagalba; Rna-zė H suardo RNR iš RNR-DNR hibrido – lieka tik viengrandė DNR; pridėjus pradmenų ir polimerazę, vyksta komplementarios RNR grandinės sintezė, kuri vėl naudojama naujame cikle [22, 37].

Neseniai atlikti tyrimai parodė, kad ŽPV 16, 18, 31, 33 ir 45 tipų E6/E7 transkriptų nustatymas nukleorūgščių seka paremtu amplifikacijos tyrimu (angl. *Nucleic acid sequence based amplification, NASBA*) (*PreTect HPV-Proof*er; *Norchip*) buvo daug specifiškesnis nustatant didelio laipsnio gimdos kaklelio pakitimus nei ŽPV DNR nustatymas PGR naudojant GP5+/6+ pradmenis [44]. Taip pat tyrimais nustatyta, kad *HPV-Proof*er testui būdingas mažesnis nei DNR tyrimų kliniškinis jautrumas nustatant CIN2+ pokyčius, tačiau būdingas ženkliai didesnis kliniškinis specifiškumas. Manoma, kad *HPV-Proof*er jautrumas yra mažesnis dėl to, kad tiriami tik penki DR-ŽPV tipai, kai tuo tarpu DNR yra tiriama 13 – 14 ŽPV tipų [37].

APTIMA ŽPV tyrimas – tai transkripcijos sąlygojamas amplifikacija paremtas testas, kuris leidžia nustatyti 14 ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) E6/E7 iRNR transkriptus. Tyrimas yra kokybinis. Tipas nėra tiksliai nustatomas. Tyrimas *APTIMA* testu susideda iš trijų pagrindinių žingsnių:

- Taikinio E6/E7 iRNR „pagavimas“ panaudojant ŽPV specifinius oligomerus sujungtus su magnetinėmis mikrodalelėmis;
- Taikinio E7 iRNR padauginimas;
- Gautų PGR fragmentų nustatymas vykdant hibridizaciją su chemiliuminescencinėmis dalelėmis žymėtais zondais.

Reakcijose yra vidinės kontrolės transkriptas užtikrinantis kokybišką kiekvieno tyrimo žingsnio atlikimą. Analitinis tyrimo jautrumas yra 38 – 488 iRNR kopijos/mėginyje pusiau automatizuotose sistemose. Vykdamas tyrimus su pilnai automatizuota sistema, analitinis jautrumas

– 17 – 275 iRNR kopijos/mėginyje. Tyrimui nebūdingos kryžminės reakcijos su MR-ŽPV tipais, su normalia flora ar kitais gimdos kaklelio mėginyje galinčiais būti organizmais [37].

Kitas ŽPV RNR tyrimo metodas yra papildomos viruso onkogeno transkriptų padauginimas (*APOT*). Taikant šį metodą galima atskirti episominių ir integruotų ŽPV onkogenų transkriptus. Gimdos kaklelio vėžio atveju, DR-ŽPV genomai dažniausiai būna integravęsis į šeimininko chromosomas, tuo tarpu normaliuose arba be piktybinių pokyčių audiniuose viruso DNR būna episomų pavidale [44].

Privalumai: RNR tyrimui būdingas didelis konkordantiškumą (97 proc.) tarp ŽPV DNR ir E6/E7 iRNR, kuris parodo nuolatinę ŽPV onkogenų raišką gimdos kaklelio navike. RNR tyrimu paremti testai pasižymi aukštesne prognostine verte ir didesniu specifiškumu nei DNR tyrimais paremti testai [22].

Trūkumai: RNR yra mažiau stabili molekulė nei DNR, todėl ją sunkiau išskirti iš biologinių mėginių. Sėkmingam ŽPV tyrimui yra svarbu tiriamosios medžiagos laikymo terpės, kuriose būtų išsaugoma ląstelių morfologija, DNR, RNR ar baltymų vientisumas [44].

1.9. Komerciškai prieinami ŽPV nustatymo testai

Šiuo metu išskiriamos penkios svarbiausios komercinių ŽPV nustatymo testų grupės:

- 1. DR-ŽPV DNR nustatymu paremti testai.** Tai grupė kokybinių ir pusiau kiekybinių testų, kuriais ŽPV DNR nustatoma panaudojant kelių ŽPV tipų zondų mišinį. Šiais testais nėra nustatomas konkretus ŽPV tipas. Tyrimo atsakymas būna ŽPV teigiamas arba neigiamas.
 - *Hybrid Capture 2* ŽPV DNR testas. Tai *FDA* patvirtintas, populiariausias pastarųjų dešimtmečių testas dar ir dabar plačiai naudojamas pasaulyje. *HC2* nustato, bet ne tipuoja 13 DR-ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) ir 5 MR-ŽPV (6, 11, 42, 43, 44) tipus [28, 22, 44, 4, 37].
 - *Cervista* DR-ŽPV testas. Tai dar vienas *FDA* patvirtintas kokybinis signalo amplifikacijos testas. Testas nustato 14 ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Analitinis 14 DR-ŽPV tipų nustatymo jautrumas siekia nuo 1250 iki 7500 viruso kopijų mėginyje priklausomai nuo tipo. *HIST2H2BE* histono 2 genas yra vidinė kontrolė [12, 37].
 - *Amplicor* ŽPV testas. Tai kokybinis PGR paremtas testas, kuris nustato tuos pačius 13 ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) kaip ir *HC2*. PGR produktų

analizė vykdoma mikroplokštelėse. *Amplicor* yra analitiškai specifiškesnis DR-ŽPV tipų tyrimas nei *HC2*. Tačiau dėl didesnio analitinio jautrumo, *Amplicor* klinikinis specifiskumas žymiai mažesnis nei *HC2* [36, 37].

- *Care* ŽPV testas. Tai testas paremtas supaprastinta *HC2* technologija. Testas per 3 valandas nustato 13 ŽPV tipų kaip ir *HC2* originalas, plus ŽPV-66 tipą. Tai greitas, paprastas ir įperkamas ŽPV testas. Tyrimai parodė, kad *Care* ŽPV testas yra daug žadantis kaip pirminės gimdos kaklelio vėžio patikros testas neturtingose šalyse. Per kelias valandas gaunamas tikslus ŽPV tyrimo atsakymas ir to paties vizito metu galima pradėti didelio laipsnio CIN gydymą.
- *HPV/STD4 ACE* testas. Testu nustatomas 21 ŽPV tipas. Naudojami du pradmenų mišiniai. Pirmu mišiniu nustatoma 16 DR-ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 70), o antru – 5 MR-ŽPV tipai (6, 11, 42, 43, 44) bei *Chlamydia trachomatis* ir *Neisseria gonorrhoeae*.

2. DR-ŽPV DNR nustatymu paremti testai tuo pačiu metu arba vėliau genotipuojantys ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipus. Testais nustatoma 13 – 16 ŽPV tipų ir ŽPV-16, ŽPV-18 tipai. Atskirai nuo kitų didelės rizikos ŽPV tipų atliekant ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų nustatymą galima įvertinti didesnę CIN3 riziką ir skirti mažiau agresyvių gydymą, jei nustatomas kitas DR-ŽPV tipas.

- DR-ŽPV DNR nustatymu paremti testai, kurių metu kartu atliekamas ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų nustatymas [37]:
 - Abbott RealTime didelės rizikos ŽPV testas – tai tikro laiko PGR testas, kuriuo nustatomi ŽPV-16, ŽPV-18 tipai ir dar 12 ŽPV tipų: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Žmogaus β -globino genas naudojamas kaip vidinė kontrolė. Tyrimo analitinis jautrumas – 500–5000 ŽPV DNR kopijų mėginyje priklausomai nuo ŽPV tipo. Tirtas analitinis specifiskumas nerodė jokių kryžminių reakcijų su tirtais organizmais, kurie gali būti aptinkami moters lytiniuose takuose [27, 37].
 - *Cobas* 4800 ŽPV testas. Tai tikro laiko PGR tyrimu paremtas testas, kuris genotipuoja ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipus bei bendrai nustato dar 12 ŽPV tipų: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Žmogaus β -globino genas naudojamas kaip vidinė kontrolė. Per 8 valandas galima atlikti 288 tyrimus, o pirmų 94 mėginių rezultatus galima stebėti jau po 5 valandų.

- *HPV4A ACE screening CE* testas. Šis testas leidžia atlikti dauginę PGR: taikant *HPV4A ACE* testą vienu metu galima nustatyti 16 DR-ŽPV tipų (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) ir atskirai genotipuoti 16, 18 tipus bei 6/11 tipus. PGR produktų analizė atliekama elektroforezės būdu.
- DR-ŽPV DNR nustatymu paremti testai, kuriais nustatčius DR-ŽPV galima genotipuoti ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipus:
 - *Cervista* ŽPV 16/18 testas – tai signalo amplifikacija paremtas kokybinis testas, skirtas ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų nustatymui. Tyrimas atliekamas, kai *Cervista* testu gaunamas ŽPV teigiamas atsakymas. Tai vienintelis *FDA* patvirtintas ŽPV genotipavimo testas [37].
 - DR-ŽPV 16/18/45 zondų rinkinio testas – tai signalo amplifikacija paremtas kokybinis testas. Testas paremtas *HC2* technologija ir skirtas specialiai ŽPV-16, ŽPV-18, ŽPV-45 tipų nustatymui, bet jų atskirai negenotipuoja. Gaunamas teigiamas arba neigiamas atsakymas, kuris rodo, yra ar ne šių trijų tipų infekcija. Tačiau neseniai patobulintas, naujausias DR-ŽPV 16/18/45 genotipavimo testas jau atskirai genotipuoja kiekvieną tipą [37, 43].
- 3. **ŽPV DNR genotipavimo testai.** Šiuo metu tai didžiausia komerciškai prieinamų ŽPV nustatymo testų grupė. Tačiau jų klinikinė vertė iki šiol galutinai nėra nustatyta. Šiuo metu ŽPV genotipavimo metodai yra nepakeičiami ŽPV moksliniuose tyrimuose, tačiau labai tikėtina, kad artimiausioje ateityje, genotipavimo testai bus svarbūs ir klinikinėje praktikoje. Tačiau tam reikalingi standartizuoti ir patvirtinti metodai, leidžiantys specifiskai nustatyti apibrėžtą ŽPV tipų spektrą.
 - Atvirkštinė *line – blot* hibridizacija paremti ŽPV genotipavimo testai. Tai dažniausiai šiandien naudojami ŽPV genotipavimo testai. Tiriamoji DNR padauginama PGR būdu, gauti produktai hibridizuojami su membranoje įtvirtintais oligonukleotidiniais žymenimis. Po reakcijų su konjugatu ir substratu yra vertinami juostelių spalviniai signalai. Šiuo metu yra mažiausiai penki komerciškai prieinami testai, kurie remiasi šia technologija [37].
 - *INNO–LiPA* ŽPV genotipavimo testas – tai vienas dažniausiai naudojamų ŽPV genotipavimo testų. Viena iš daugelio šio testo versijų *INNO–LiPA₂₅* leidžia nustatyti 26 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 31, 33 – 35, 39, 40, 42 – 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 74. *INNO–LiPA₂₅* neatskiria ŽPV-68 nuo ŽPV-73. *INNO–LiPA Extra* testo

jautrumas yra 20 – 70 viruso kopijų mėginyje. Šis testas gali nustatyti 28 skirtingus ŽPV tipus: visus kaip *INNO-LiPA₂₅*, išskyrus ŽPV-34 ir ŽPV-42, ir dar nustato ŽPV-26, ŽPV-69/ŽPV-71 ir ŽPV-82 [30, 37].

- *Linear Array* ŽPV genotipavimo testas – tai taip pat vienas dažniausiai naudojamų ŽPV genotipavimo testų, kuris nustato 36 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66 – 73, 81 – 84, 89 ir vieną potipį (82 ŽPV potipį arba IS39) [37].
 - *Digene* ŽPV genotipavimo *RH* testas *RUO*. *Digene RH* testas yra neseniai sukurtas testas, skirtas 18 ŽPV tipų nustatymui: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82. Kaip vidinė kontrolė, nustatomas žmogaus β -globino genas [20, 37].
 - *EasyChip HPV blot* rinkinys – tai atvirkštinis *dot-blot* tyrimas, kuriuo galima nustatyti 37 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 26, 31 – 33, 35, 37, 39, 42 – 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66 – 72, 74, 81 – 85 ir vieną potipį (44 ŽPV potipį arba ŽPV-55). *HPV Blot* rinkinio V1.0 analitinis jautumas yra 1 – 50 ŽPV genomo kopijų ir nebuvo pastebėta jokių kryžminių reakcijų tarp netiriamų ŽPV tipų.
 - *REBA-HPV-ID* – tai neseniai pradėtas naudoti atvirkštinis *line-blot* tyrimas, kuriuo nustatomi 25 ŽPV tipai: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42 – 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 72, 81, 84, 87. *REBA-HPV-ID* neskiria ŽPV-59 nuo ŽPV-68 ir ŽPV-81 nuo ŽPV-87.
- Mikrogardelių tyrimu paremti ŽPV genotipavimo testai. Testo principas – atvirkštinė hibridizacija. PGR produktai yra hibridizuojami su oligonukleotidų zondais, kurie yra įtvirtinti ant netirpių paviršių arba DNR gardelių. DNR gardelė gali būti sudarytas iš vienos arba kelių mikrogardelių, kas sudaro sąlygas, vienu metu atlikti daug tyrimų. Po hibridizacijos, fluorescencija yra sužadinama monochromatine šviesa ir išmatuojama lazerinių skaitytuvų pagalba. Fluorescuojantys žymenys gali būti prijungiami PGR arba hibridizacijos metu [37].
 - *PapilloCheck* ŽPV patikros testas – tai vienas iš dviejų dažniausiai naudojamų PGR–mikrogardelių tyrimu paremtų testų. Testas gali nustatyti 24 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42 – 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82. Žmogaus

ADAT1 genas naudojamas kaip vidinė kontrolė. *PapilloCheck* nustato nuo 30 iki 750 viruso kopijų mėginyje, priklausomai nuo viruso tipo [13, 37].

- *Clart HPV 2* – papilomos viruso klinikinės mikrogardelės. Tyrimas jungia PGR padauginimą ir oligonukleotidų mikrogardelėmis paremtą nustatymo technologiją, kuri nustato 35 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42 – 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70 – 73, 81 – 85, 89. Žmogaus *CFTR* genas naudojamas kaip vidinė kontrolė.
- *HPV GenoArray* testo rinkinys vienu metu gali nustatyti 21 ŽPV tipą: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42 – 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66, 68, 81. Naudojama vidinė kontrolė.
- *GeneTrack* ŽPV DNR mikrogardelės leidžia nustatyti iki 28 ŽPV tipų: 6, 11, 16, 18, 31, 33 – 35, 39, 40, 42 – 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 62, 66 – 72. Žmogaus interferono – 2 genas naudojamas kaip vidinė kontrolė.
- *GeneSQUARE* ŽPV mikrogardelių testas leidžia nustatyti 23 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33 – 35, 39, 40, 42, 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68. Tyrimo jautrumas yra 10^2 – 10^3 viruso kopijų mėginyje, priklausomai nuo viruso tipo [37].
- *Infiniti* ŽPV tyrimų šeima susideda iš trijų tyrimų: *Infiniti* ŽPV genotipavimo tyrimo, *Infiniti HR-HPV Quad* tyrimo ir *Infiniti HPV-Quad* tyrimo. *Infiniti* ŽPV genotipavimo tyrimu galima nustatyti 26 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 33 – 35, 39, 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66 – 70, 73, 82, 85. *Infiniti HR-HPV Quad* tyrimu galima nustatyti 14 ŽPV tipų: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. *Infiniti HPV-Quad* tyrimu galima nustatyti penkis atskirus ŽPV tipus (16, 18, 31, 33, 45) ir penkis ŽPV tipų derinius: ŽPV-6/ŽPV-11, ŽPV-35/ŽPV-68, ŽPV-39/ŽPV-56, ŽPV-58/ŽPV-52, ŽPV-59/ŽPV-51. *HPV-Quad* tyrimo analitinis ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų jautrumas yra 300 ir 3000 viruso kopijų mėginyje [17, 37].
- *PANArray* ŽPV genotipavimo mikrogardelės nustato 31 ŽPV tipą: 6, 11, 16, 18, 26, 31 – 35, 39, 40, 42 – 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 62, 66, 68 – 70, 73, 81, 83 ir vieną potipį (44 ŽPV potipį arba ŽPV-55). Žmogaus β -globino genas naudojamas kaip vidinė kontrolė. Tyrimo jautrumas – 10 viruso kopijų mėginyje [9, 37].
- *HPVDNAChip* leidžia vienu metu nustatyti 22 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 31, 33 – 35, 39, 40, 42 – 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69. Žmogaus β -globino genas naudojamas kaip vidinė kontrolė.

- GG ŽPV mikrogardelės leidžia nustatyti 41 ŽPV tipą: 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26, 27, 30 – 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51 – 54, 56 – 59, 61, 62, 66 – 70, 72, 73, 81 – 84, 91 ir vieną potipį (44 ŽPV potipį arba ŽPV-55). Žmogaus β -globino genas naudojamas kaip vidinė kontrolė.
 - Suspencinėmis gardelėmis (xMAP, Luminex) paremti ŽPV genotipavimo tyrimai. Principas – hibridizacija su fluoroforais žymėtais polistireno rutuliukais. ŽPV tyrimuose naudojami rutuliukų mišiniai. Kiekvienas rutuliukas yra sujungtas su skirtingais oligonukleotidų zondais, kurių kiekvienas yra specifiškas konkrečiam ŽPV tipui. Vykdoma atvirkštinė hibridizacija tarp biotinu žymėtų PGR produktų ir zondu esančių rutuliukų paviršiuje. Tyrimo pabaigoje matuojant fluorescenciją galima gauti pusiau kiekybinį tyrimo atsakymą. Šiuo metu yra bent du komerciškai prieinami testai.
 - Dauginis ŽPV genotipavimo rinkinys (*Multiplex HPV Genotyping Kit*) V1.0 leidžia aptikti ir nustatyti 24 ŽPV tipus: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42 – 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 . Žmogaus β -globino genas naudojamas kaip vidinė kontrolė.
 - *Digene* ŽPV genotipavimo *LQ* testas *RUO* leidžia nustatyti 18 ŽPV tipų: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51 – 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82. Vėliausioje (2009 m.) *Digene LQ* testo (V1.0) versijoje kartu vykdomas ir žmogaus β -globino geno padauginimas ir nustatoma nuo 5 iki 10 000 viruso kopijų mėginyje, priklausomai nuo viruso tipo.
 - Gelio elektroforeze paremti ŽPV genotipavimo tyrimai. Padauginti produktai yra analizuojami agarozės gelyje. Priklausomai nuo naudojamų pradmenų, nustatomi skirtingi ŽPV spektrai. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė taikoma ŽPV tipui specifinių restrikcijos fragmentų nustatymui.
 - *BIOTYPAP* rinkinys leidžia vienu metu aptikti ir nustatyti 31 ŽPV tipą: 6, 11, 13, 16, 18, 30 – 35, 39, 40, 42 – 44, 51 – 54, 56 – 59, 61, 62, 64, 66 – 69 ir vieną potipį (44 ŽPV potipį arba ŽPV-55). Padauginti produktai yra sukarpomi 5 skirtingomis restrikcijos endonukleazėmis ir analizuojami agarozės gelyje [37].
4. **DR-ŽPV E6/E7 iRNR nustatymu paremti testai.** Atlikti tyrimai parodė, kad ŽPV iRNR tyrimai gali būti kliniškai naudingi. Diagnostiškai svarbiausi viruso E6 ir E7 onkobaltymų transkriptai. Virusų iRNR nustatymas gali būti atliekamas atvirkštinės transkripcijos būdu

arba nukleorūgščių seka paremta amplifikacija (angl. NASBA). Komerciškai prieinami trys testai, kurie remiasi E6/E7 transkriptų nustatymu.

- *PreTect HPV-Proofer* – tai tyrimas paremtas NASBA technologija, kuri leidžia kokybiškai nustatyti penkių dažniausiai gimdos kaklelio vėžio ląstelėse aptinkamų DR-ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 45) E6/E7 iRNR transkriptus. Testas pasižymi mažesniu klinikiniu jautrumu, tačiau žymiai didesniu klinikiniu specifiškumu nei ŽPV DNR tyrimu paremti testai [22, 37, 44].
 - *NucliSENS EasyQ ŽPV* testas paremtas originalia *HPV-Proofer* metodika, kuri buvo šiek tiek patobulinta. Analitinis tyrimo jautrumas yra nuo $2,3 \times 10^2$ iki $3,0 \times 10^4$ viruso kopijų/ml. Testui nebūdingos kryžminės reakcijos su kitomis medžiagomis, kurių gali būti tiriamojoje medžiagoje [37].
 - *APTIMA ŽPV tyrimas* leidžia nustatyti 14 ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) E6/E7 iRNR transkriptus. Testas yra kokybinis ir ŽPV tipas nėra tiksliai nustatomas. Testo jautrumas yra 38 – 488 iRNR kopijos/mėginyje [14, 37].
5. **In situ hibridizacija (ISH)** – tai vienintelis molekulinis metodas leidžiantis patikimai aptikti ir nustatyti ŽPV buvimo vietą pažeistose plokštaus epitelio ląstelėse. Integruotas virusas matomas kaip taškinis signalas, o episomų formos virusas matomas difuziškai pasklidęs po branduolį. Tačiau ISH tyrimų jautrumas yra nepakankamas, kad juos būtų galima naudoti rutiniuose tyrimuose [37, 44].
- *INFORM HPV* – tai kelių rūšių komerciškai prieinami ISH zondų mišiniai, kuriais ŽPV DNR gali būti nustatoma citologiniuose ir histologiniuose mėginiuose. Pvz., *INFORM HPV III* zondų mišiniu galima nustatyti 12 ŽPV tipų: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66. *INFORM HPV III* testo jautrumas yra 10 – 50 viruso kopijų ląstelėje, kai tiriami formaline fiksuoti audiniai [37].
 - *GenPoint* ŽPV biotinu žymėti DNR zondai – tai zondų mišinys, kuriuo galima tirti citologinius ir histologinius mėginius. Juo galima nustatyti 13 ŽPV tipų: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 [22, 37].
 - *ZytoFast* ŽPV zondai. Jais galima nustatyti platų spektrą MR-ŽPV ir DR-ŽPV tipų tiek citologiniuose, tiek ir histologiniuose mėginiuose. *ZytoFast* ŽPV zondai yra nukreipti prieš E6/E7 ir L1 baltymų DNR ir iRNR sekas. Neseniai atliktuose tyrimuose *ZytoFast*

ŽPV zondai buvo sėkmingai panaudoti p16^{INK4A} baltymo ir ŽPV infekcijos nustatymui tuo pačiu metu, tame pačiame gimdos kaklelio karcinomos pjūvyje [34, 37].

- *ŽPV OncoTect testas*. Testas yra paremtas ląstelių tyrimu panaudojant *FISH*. DR-ŽPV E6/E7 iRNR transkriptai nustatomi sveikose ląstelėse. Testą pasiūlyta naudoti kartu su kitais ŽPV testais kaip indikatorium, kuris parodo ligos aktyvumą. *OncoTect* kiekybiškai parodo E6/E7 iRNR kiekį kiekvienoje tirtoje ląstelėje ir procentiškai išreiškia ląstelių kiekį, kuriose yra žymiai padidėjusi E6/E7 iRNR raiška [37].

Be komerciškai prieinamų testų, egzistuoja ir laboratorijose kurti testai (angl. „*in-house*“ testai). Daugelis biomedicinos tyrimo laboratorijų turi pačių sukurtas ir įdiegtas PGR technologijas, paremtas naujausių mokslinių tyrimų duomenimis ir veiksmingai jas taiko ŽPV nustatymui ir tipavimui. Tačiau „*in house*“ PGR testams, trūksta tarplaboratorinės standartizacijos [2, 4, 28]. Taigi tokie testai, kurie nėra kliniškai patvirtinti, ekspertų nuomone, negali būti naudojami nei moterų patikrai esant CIN, nei pirminei patikrai [37].

Kelis paskutinius dešimtmečius ŽPV tyrimų standartu buvo laikomi DNR tyrimu paremti testai, kuriais galima nustatyti 13 – 14 žmogaus papilomos viruso tipų be tikslaus tipų identifikavimo. Manoma, kad ateities ŽPV nustatymo standartas bus 14 DR-ŽPV tyrimas sujungtas su ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų nustatymu. Klinikinė ŽPV genotipavimo testų vertė kol kas dar nėra nustatyta, taip pat daug dėmesio skiriama naujų ŽPV infekcijos molekulinų žymenų nustatymo testų kūrimui. Taip pat labai svarbūs RNR tyrimu paremti testai, kurie pasižymi aukštesne prognostine verte ir didesniu specifiškumu nei DNR tyrimais paremti testai. Taigi, automatizacija, kainos mažėjimas ir klinikinio specifiškumo pagerinimas – tai pagrindiniai uždaviniai kuriant ŽPV testus ateityje [22, 37].

1.10. ŽPV tyrimo klinikinė nauda

Anogenitalinė ŽPV infekcija labai dažna populiacijoje tarp jaunu, seksualiai aktyvių asmenų. Kai kurių tyrimų duomenimis iki 70 proc. studentų amžiaus merginų nustatoma ŽPV infekcija. Laimei, dauguma šių infekcijų yra trumpalaikės ir tik labai mažai daliai moterų išsivysto ilgalaikė infekcija. Jei moteris užsikrėtusi didelės onkogeninės rizikos ŽPV, ilgalaikė infekcija gali sukelti CIN2, CIN3 ar gimdos kaklelio vėžį. Todėl, atliekant ŽPV nustatymą kaip pirminę patikrą, svarbu atskirti didelę dalį moterų su trumpalaikė infekcija ir sutelkti dėmesį į tas moteris, kurių infekcija jau yra ilgalaikė. Laikina ŽPV infekcija yra retesnė moterims, vyresnėms

nei 30 metų. Po 30 metų ŽPV teigiamų moterų skaičius žymiai sumažėja. Taigi, norint išvengti trumpalaikių ŽPV infekcijų nustatymo, rekomenduojama ŽPV tyrimus atlikti moterims nuo 30 metų.

Kaip patikros testas, ŽPV DNR tyrimas turi daugiau privalumų lyginant su citologiniu įvertinimu ar vizualiniu gimdos kaklelio apžiūrėjimu:

1. Didesnis jautrumas, o tai ypač svarbu tada, jei toks tyrimas moteriai bus atliekamas tik vieną kartą gyvenime;
2. Atliekant ŽPV DNR tyrimą yra nustatomos ne tik moterys, sergančios kuria nors gimdos kaklelio liga, bet taip pat ir tos, kurioms yra padidėjusi rizika per 3 – 10 metų išsivystyti gimdos kaklelio neoplazijai;
3. Testo interpretacija yra objektyvi ir neturi vizualiniams patikros metodams ar gimdos kaklelio citologiniam vertinimui būdingo subjektyvumo [44].

Atlikta 14 mokslinių tyrimų apžvalga parodė, kad citologinio tyrimo vidutinis jautrumas ir specifiškumas atitinkamai buvo 60 proc. ir 95 proc. Atitinkamai buvo įvertintas ŽPV DNR tyrimo jautrumas ir specifiškumas, kurio rezultatai buvo 85 proc. ir 84 proc. [39]. Atlikus ŽPV DNR nustatymo tyrimus moterims vyresnėms nei 30 metų, jautrumo ir specifiškumo rezultatai buvo ženkliai geresni: vidutinis jautrumas ir specifiškumas buvo 89 proc. ir 90 proc. Be to, atliktiems didelės rizikos ŽPV DNR tyrimams nustatyta labai didelė neigiama prognostinė vertė (NPV), t.y., jei ŽPV DNR testas neigiamas, tikėtina, jog nėra jokio ligos. Tai labai svarbu patikros programoms. Jei moteriai virš 30 metų ŽPV DNR testas yra neigiamas, tada galima padidinti patikros laiko intervalus. Jei ir citologinis tyrimas neigiamas, tai tikėtina, kad gimdos kaklelio vėžio rizika sumažėja labai ilgam laikui. Taigi patikrų metu galima atlikti abu tyrimus arba yra kita galimybė, t.y. atlikus ŽPV DNR testą atrinkti moteris citologiniam tyrimui. Jei ŽPV DNR testas teigiamas, o citologinių pokyčių nėra arba nustatomas ASCUS, tyrimą kartoti po 12 mėnesių. ŽPV DNR nustatymui būdingas gana mažas specifiškumas, nes dauguma moterų, kurioms ŽPV DNR testas yra teigiamas, neturi jokių citologinių ar histologinių pokyčių, kurie rodytų ligą. Tyrimai rodo, kad per laiką ŽPV DNR tyrimų specifiškumas auga ženkliai, nes ŽPV DNR tyrimas nustato grupę moterų, kurioms būtina atidesnė priežiūra [44].

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo medžiaga

ŽPV tyrimui buvo naudojami DNR mėginiai, išgryninti iš skystų terpių urogenitalinių nuograndų ėminių. Tyrimas buvo vykdomas nuo 2010 m. kovo mėnesio iki 2011 m. vasario mėnesio Valstybiniame patologijos centre. Tyrimas atliktas 25 moterims. 2011 m. gegužės mėnesį tyrimas atliktas dar 7 moterims.

2.2. ŽPV nustatymo metodai

Mėginiai buvo tiriami PGR metodu su keturiais skirtingais rinkiniais:

- „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“;
- „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“;
- AB „Sorpo Diagnostics“;
- „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“.

Pirmiausiai buvo išskirta DNR, naudotas „QIAamp MinElute Virus Spin“ reagentų rinkinys.

2.2.1. DNR išskyrimas

Virusinės DNR išskyrimas buvo atliekamas kolonėlių metodu (5 pav.). Išskyrus DNR, buvo nustatoma jos koncentracija ir švarumas.

1. Lizavimas:

- 1) Į 1,5 ml mėgintuvėlį įpilti 25 µl proteazės K, 200 µl mėginio ir 200 µl lizės buferio (sudėtyje turinčio 6,2 µl nešėjo RNR), uždaryti ir purtyti 15 s.
- 2) Inkubuoti 15 min maišyklėje su šildymo funkcija 56 °C temperatūroje.
- 3) Trumpai centrifuguoti (30 s).
- 4) Į mėginį įpilti 250 µl 96 proc. etanolio, purtyti 15 s. Lizatą su etanoliumi inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje (15 – 25 °C).
- 5) Trumpai centrifuguoti (30 s).

2. Lizato filtravimas per kolonėlę:

- 6) Visą lizatą iš mėgintuvėlio perpilti tiesiai ant kolonėlės, uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min 1 min. Filtratą išmesti, o kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį.

3. DNR išgryninimas:

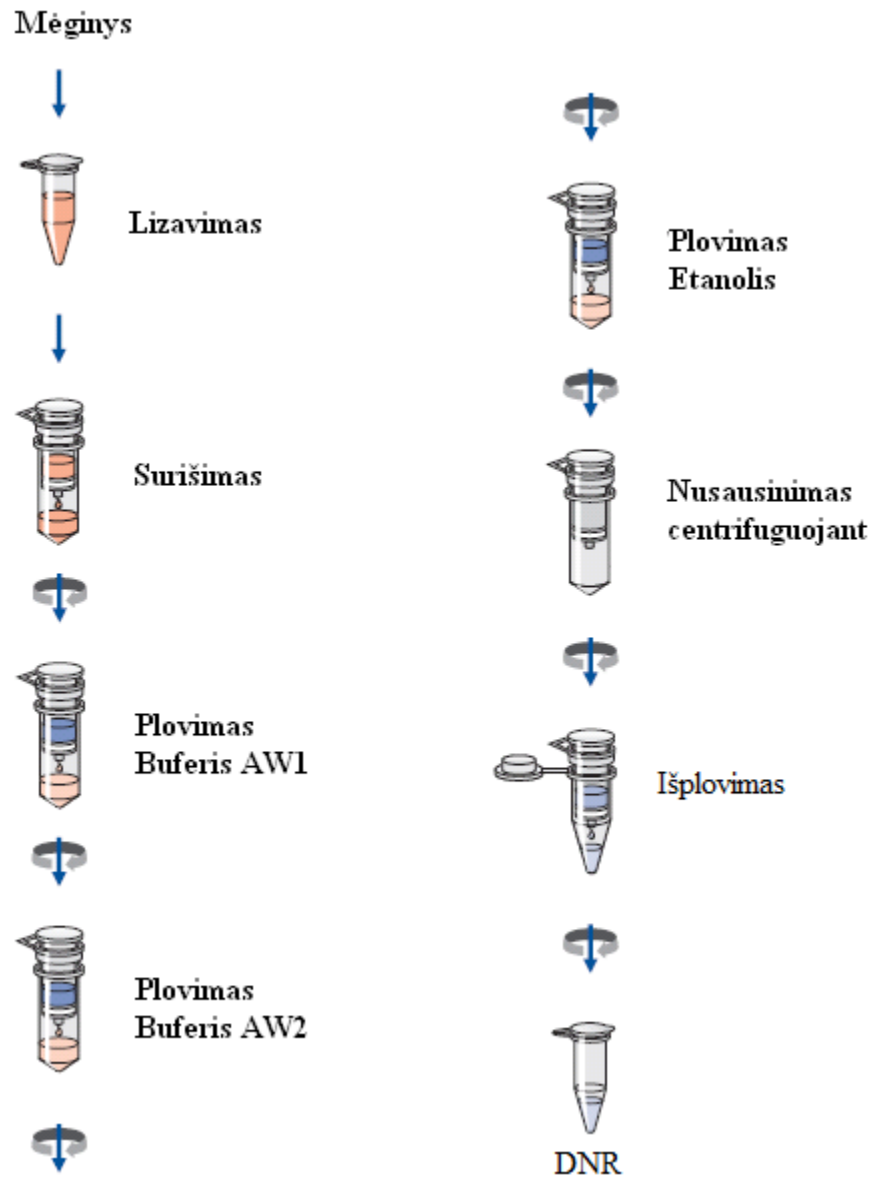
- 7) Įpilti 500 µl plovimo buferio 1. Mėgintuvėlį uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min 1 min. Filtratą išmesti, o kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį.
- 8) Įpilti 500 µl plovimo buferio 2. Mėgintuvėlį uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min 1 min. Filtratą išmesti, o kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį.
- 9) Įpilti 500 µl 96 proc. etanolio. Mėgintuvėlį uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min 1 min. Filtratą išmesti, o kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį.
- 10) Centrifuguoti 14000 aps/min 3 min tam, kad nusausėtų membrana.
- 11) Patalpinti kolonėlę į naują 1,5 ml mėgintuvėlį, jį atidaryti ir inkubuoti 3 min 56°C temperatūroje.

4. DNR išplovimas

- 12) Tiesiai ant kolonėlės membranos įpilti 50 µl išplovimo buferio. Mėgintuvėlį uždaryti ir inkubuoti 5 min kambario temperatūroje. Centrifuguoti 14000 aps/min 1 min.

2.2.2. DNR koncentracijos ir švarumo matavimas

Matavimai atlikti Lambda 25 UV/VIS spektrofotometru. DNR koncentracija ir švarumas įvertinamas matuojant DNR tirpalų sugertis 260 nm ir 280 nm spektrometro bangų ilgiais.



5 pav. DNR išskyrimas kolonėlių metodu

2.3. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

2.3.1. ŽPV tyrimas „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ ir „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu

1. PGR mišinio paruošimas

1) Mėgintuvėlyje (1,5 ml) paruošti PGR komponentų mišinys. Vienam mėginiui:

- 10 µl 2 x pagrindinio mišinio,
- 4 µl pradmenų mišinio,
- 3 µl 8-MOP tirpalo.

Priklausomai nuo vienu metu tiriamų mėginių skaičiaus, PGR mišinio sudedamųjų dalių kiekis dauginamas iš to skaičiaus, kiek mėginių yra tiriama. Pvz., jei atliekama 10 tyrimų, tai pilama 100 µl 2 x pagrindinio mišinio, 40 µl pradmenų mišinio ir t.t. Paruoštą mišinį supurtyti, centrifuguoti 30 s 8000 aps/min.

- 2) PGR mišinį išpilstyti po 17 µl į 0,2 ml talpos PGR mėgintuvėlius. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilti po 3 µl tiriamo mėginio DNR. Galutnis reakcijos tūris – 20 µl. Mėgintuvėliai supurtomi ir centrifuguojami 30 s 8000 aps/min.

2. PGR programa

Paruoštus 0,2 ml talpos mėgintuvėlius su PGR mišiniu ir mėginio DNR sudėti į termociklerį. PGR ciklas ŽPV nustatymui pateiktas 3 lentelėje:

3 lentelė. PGR programa

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
94 °C	15 min	1
94 °C	30 s	40
60 °C	1 min 30 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	10 min	1

3. Agarozės gelio elektroforezė

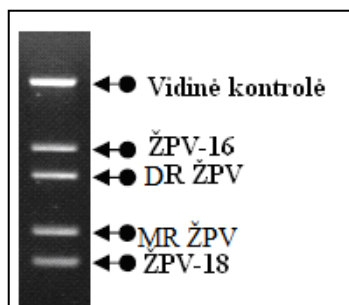
- 1) Paruošiamas 2 proc. agarozės gelis. Atvėsintą agarozės tirpalą tolygiai supilti į paruoštą formą ir įstatyti „šukutes“. Geliui sustingus, „šukutes“ atsargiai ištraukti, o gelį perkelti į elektroforezės vonelę, kuri užpildyta 1xTBE buferiu.
- 2) 5 µl PGR produkto įnešti į agarozės gelio šulinėlį. Į pirmąjį šulinėlį įnešti 5 µl standarto.
- 3) Elektroforezė vykdoma nuo 40 min iki 1 val., esant 110 V įtampai.
- 4) Gelis nudažomas etidžio bromido tirpalu.
- 5) Gelis nufotografuojamas UV šviesoje (šviesos bangos ilgis 312 nm), panaudojant gelių dokumentavimo sistemą UVITEC.

4. PGR rezultatų interpretavimas

„Seeplex® HPV4 ACE Screening“ rinkiniu galima nustatyti specifiškai 16 ir 18 ŽPV tipus, didelės onkogeninės rizikos (11 tipų: 31, 33, 35, 45, 51, 56, 58, 59, 66, 67, 70) ir mažos onkogeninės rizikos (5 tipus: 6, 11, 42, 43, 44) ŽPV tipus. Šių tipų nustatymas atliekamas pagal padaugintų fragmentų dydį, lyginant juos su DNR fragmentų ilgio standartu (6 pav.).

4 lentelė. ŽPV tipų DNR fragmentų ilgiai („Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“)

ŽPV tipas	Padauginto fragmento dydis (bp)
Vidinė kontrolė	1000
ŽPV-16	588
Didelės rizikos (DR) tipas	465
Mažos rizikos (MR) tipas	302
ŽPV-18	230

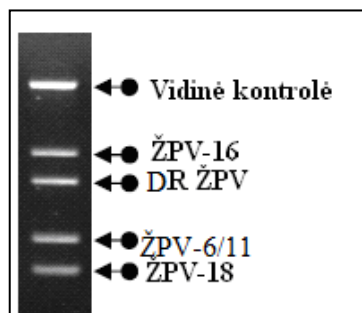


6 pav. Standartas ŽPV nustatymui

„Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu galima nustatyti specifiškai 16 ir 18 ŽPV tipus, ŽPV-6/11 tipus ir 16 didelės onkogeninės rizikos ŽPV tipų (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82). Šių tipų nustatymas atliekamas pagal padaugintų fragmentų dydį, lyginant juos su DNR fragmentų ilgio standartu (7 pav.).

5 lentelė. ŽPV tipų DNR fragmentų ilgiai („Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“)

ŽPV tipas	Padauginto fragmento dydis (bp)
Vidinė kontrolė	1000
ŽPV-16	588
Didelės rizikos (DR) tipas	465
ŽPV-6/11	302
ŽPV-18	230



7 Pav. Standartas ŽPV nustatymui

2.3.2. ŽPV tyrimas AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu

1. PGR mišinio paruošimas

- 1) 1,136xŽPV MM reakcijos mišinį atitirpinti kambario temperatūroje, sumaišyti ir 2-3 s centrifuguoti.
- 2) PGR atliekama 25 µl mišinyje. Reakcijos mišinio komponentai pateikti 6 lentelėje:

6 lentelė. PGR mišinių paruošimas

Komponentas	Mėginys	Teigiama kontrolė	Neigiama kontrolė
1,136xŽPV MM	22 µl	22 µl	22 µl
Tiriama DNR	3 µl	-	-
ŽPV teigiama kontrolė	-	3 µl	-
Vanduo be nukleazių	-	-	3 µl
Bendras tūris	25 µl	25 µl	25 µl

2. PGR programa

PGR mišinius lengvai sumaišyti ir mėgintuvėlius sudėti į termociklerį. PGR ciklas ŽPV nustatymui pateiktas 7 lentelėje:

7 lentelė. PGR programa

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
50 °C	2 min	1
95 °C	7 min	1
95 °C	30 s	40
56 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	2 min	1

3. Agarozės gelio elektroforezė

- 1) Paruošiamas 2 proc. agarozės gelis. Atvėsintą agarozės tirpalą tolygiai supilti į paruoštą formą ir įstatyti „šukutes“. Geliui sustingus, „šukutes“ atsargiai ištraukti, o gelį perkelti į elektroforezės vonelę, kuri užpildyta 1xTBE buferiu.
- 2) 12 µl ŽPV PGR mišinio įnešti į agarozės gelio šulinėlius. Šalia analizuojamų mėginių į atskirą šulinėlį įnešti 4 µl DNR fragmentų ilgio standarto. Tai keturių DNR fragmentų mišinys: 100, 250, 400 ir 700 bazių porų.
- 3) ŽPV elektroforezė vykdoma 30 – 35 min, esant 110 V įtampai.
- 4) Gelis nudažomas etidžio bromido tirpalu.
- 5) Gelis nufotografuojamas UV šviesoje (šviesos bangos ilgis 312 nm), panaudojant gelių dokumentavimo sistemą UVITEC.

4. PGR rezultatų interpretavimas

AB „*Sorpo diagnostics*“ bendroju ŽPV PGR rinkiniu galima nustatyti 16 didelės rizikos ŽPV tipų: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 45, 66, 68, 73, 82 ir šiuos mažos rizikos ŽPV tipus: 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 72, IS39, CP8304, CP6108, MM4, MM7, MM8 ir kt. (iš viso apie 45 tipus). Analizuojamų mėginių takeliuose esantis 166 bp PGR produktas rodo, kad tiriamame mėginyje yra ŽPV DNR. Nustačius ŽPV tiriamuosiuose mėginiuose, atliekamas ŽPV genotipų nustatymas „*Sorpo Diagnostics*“ genotipavimo rinkiniu.

5. ŽPV genotipavimas

1) Į AB „*Sorpo diagnostics*“ genotipavimo rinkinio sudėtį įeina keturi skirtingi PGR mišiniai, kurių kiekviename yra tiriamiesiems ŽPV tipams specifiniai pradmenys:

- ŽPV MM–1 nustatomi ŽPV genotipai yra 16, 18, 39, 58;
- ŽPV MM–2 nustatomi ŽPV genotipai yra 52, 33, 56, 31;
- ŽPV MM–3 nustatomi ŽPV genotipai yra 35, 68, 59, 45;
- ŽPV MM–4 nustatomi ŽPV genotipai yra 6/11, 66, 51.

Kiekvienas ŽPV teigiamas mėginys analizuojamas su visais keturiais ŽPV MM. Prieš tyrimą, ŽPV MM atitirpinti, pamaišyti, 2-3 s centrifuguoti.

2) Reakcijos mišinius paruošti pagal informaciją, pateiktą 8 lentelėje:

8 lentelė. PGR mišinių paruošimas

Komponentas	Mėginys	Teigiama kontrolė	Neigiama kontrolė
ŽPV MM	22 µl	22 µl	22 µl
Tiriama DNR	3 µl	-	-
ŽPV teigiama kontrolė	-	3 µl	-
Vanduo be nukleazių	-	-	3 µl
Bendras tūris	25 µl	25 µl	25 µl

3) PGR mišinius lengvai sumaišyti, mėgintuvėlius sudėti į termociklerį. PGR ciklas ŽPV nustatymui pateiktas 9 lentelėje:

9 lentelė. PGR programa

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
50 °C	2 min	1
95 °C	7 min	1
95 °C	30 s	35
62 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	2 min	1

- 4) 12 µl ŽPV PGR mišinio įnešti į agarozės gelio šulinėlius. Šalia analizuojamų mėginių į atskirą šulinėlį įnešti 4 µl DNR fragmentų ilgio standarto. Tai keturių DNR fragmentų mišinys: 100, 250, 400 ir 700 bp.
- 5) Elektroforezė vykdoma 40 – 50 min, esant 110 V įtampai.
- 6) Gelis nudažomas etidžio bromido tirpalu.
- 7) Gelis nufotografuojamas UV šviesoje (šviesos bangos ilgis 312 nm), panaudojant gelių dokumentavimo sistemą UVITEC.

6. ŽPV genotipavimo rezultatų įvertinimas

Rinkiniu galima nustatyti 14 didelės rizikos ir 2 mažos rizikos ŽPV tipų DNR. Pagal PGR produktų išsifracionavimą agarozės gelyje, nustatoma, kokio tipo ŽPV yra tirtame mėginyje. PGR produktų dydis lyginamas su DNR fragmentų ilgio standartu.

10 lentelė. Dauginė PGR sistema ŽPV genotipų nustatymui

PGR sistema	Nustatomi ŽPV genotipai	ŽPV genotipų PGR produktų dydis
ŽPV MM-1	16, 18, 39, 58;	ŽPV-16: 473 bp; ŽPV-18: 338 bp; ŽPV-39: 245 bp; ŽPV-58: 144 bp;
ŽPV MM-2	52, 33, 56, 31;	ŽPV-52: 533 bp; ŽPV-33: 414 bp; ŽPV-56: 346 bp; ŽPV-31: 279 bp;
ŽPV MM-3	35, 68, 59, 45;	ŽPV-35: 450 bp; ŽPV-68: 349 bp; ŽPV-59: 231 bp; ŽPV-45: 167 bp;
ŽPV MM-4	6/11, 66, 51;	ŽPV-6/11: 350 bp; ŽPV-66: 293 bp; ŽPV-51: 239 bp;

2.3.3. ŽPV tyrimas „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu

1. PGR mišinio paruošimas

1) PGR mišinys N mėginių ruošiamas taip:

- 5*(N+1) µl *PCR-mix-1*
- 10*(N+1) µl 2,5x PGR buferio
- 0,5*(N+1) µl polimerazės (*TaqF*)

Ruošiamos trys kontrolės: neigiama, teigiama žmogaus DNR kontrolė (ŽPV-), teigiama 31, 39, 56 ŽPV tipų ir žmogaus DNR kontrolė (ŽPV+). Paruoštą mišinį supurtyti, centrifuguoti 30 s 8000 aps/min.

2) Mišinį išpilstyti į PGR mėgintuvėlius po 15 µl. Į atitinkamus mėgintuvėlius įpilti 10 µl tiriamosios DNR, teigiamas ir neigiamą kontrolę. Vieno mėginio reakcijos mišinio tūris – 25 µl.

2. PGR programa

Paruoštus 0,2 ml talpos mėgintuvėlius su PGR mišiniu ir tiriamąją DNR sudėti į termociklerį. PGR ciklas ŽPV nustatymui pateiktas 11 lentelėje:

11 lentelė. PGR programa

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
95 °C	15 min	1
95 °C	15 s	42
63 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	60 s	1

3. Agarozės gelio elektroforezė

- 1) Paruošiamas 1,7 proc. agarozės gelis. Atvėsintą agarozės tirpalą tolygiai supilti į paruoštą formą ir įstatyti „šukutes“. Geliui sustingus, „šukutes“ atsargiai ištraukti, o gelį perkelti į elektroforezės vonelę, kuri užpildyta 1xTBE buferiu.
- 2) 12 µl tiriamojo mėginio ir kontrolių įnešti į gelio šulinėlius.
- 3) Elektroforezė vykdoma apie 50 min, esant 110 V įtampai.
- 4) Gelis nudažomas etidžio bromido tirpalu.
- 5) Gelis nufotografuojamas UV šviesoje (šviesos bangos ilgis 312 nm), panaudojant gelių dokumentavimo sistemą UVITEC.

4. PGR rezultatų interpretavimas

Tiriamajoje medžiagoje „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu galima nustatyti didelės onkogeninės rizikos ŽPV tipų 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 DNR ir žmogaus genomo DNR fragmentą (β -globino geną). Padauginți DNR fragmentai nustatomi pagal jų ilgį. Vidinės kontrolės (β -globino geno fragmento) ilgis – 723 bp, o ŽPV tipų 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 DNR fragmentų ilgiai nuo 267 iki 325 bp. Tyrimo atsakymas yra ŽPV teigiamas, jei gelio nuotraukoje matomas 267 – 325 bp ilgio fragmentas.

2.4. Statistinė analizė

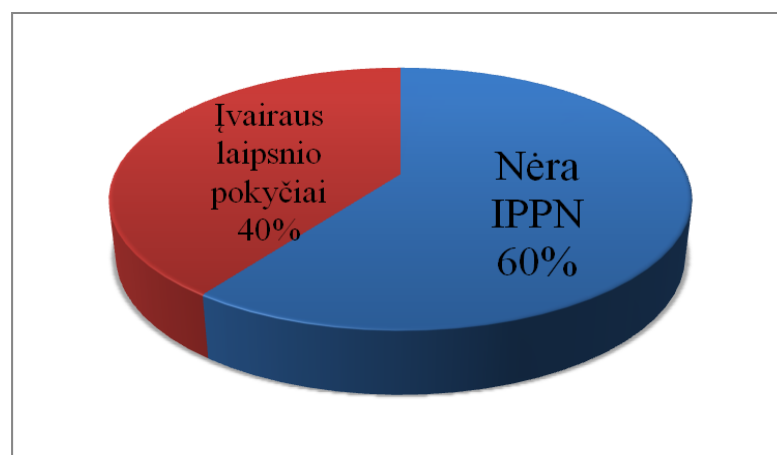
Gauti duomenys statistiškai apdoroti *MS Excel* programine įranga.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Bendrosios charakteristikos

Atlikto tyrimo tikslas buvo skirtingais komerciniais rinkiniais iširti ŽPV infekciją tiriamuosiuose mėginiuose ir parinkti ŽPV nustatymui tinkamiausią diagnostinį rinkinį. Tyrimui buvo pasirinktas PGR metodas, o ne plačiai naudojamas JAV bei Europos kokybės sertifikatus turintis HC2 metodas. PGR yra ypač jautrus, greitas, komerciškai prieinamas metodas, kuriam reikalingas nedidelis tiriamosios medžiagos kiekis, ir kuriuo galima tiksliai identifikuoti ŽPV tipus. HC2 metodas nenustato ŽPV genotipų, galimi klaidingai neigiami rezultatai, nes nėra vidinės kontrolės, o dėl kryžminių reakcijų galimi klaidingai teigiami rezultatai. Naujausi literatūros šaltiniai teigia, kad PGR turi daug perspektyvų ateityje ir manoma, kad ŽPV nustatymo standartas bus 14 DR-ŽPV tipų tyrimas sujungtas su ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipų nustatymu [4, 22, 37, 44]. Todėl įvertinus šių metodų privalumus ir trūkumus buvo pasirinktas PGR metodas.

Tyrimo dalyvavo 25 įvairaus amžiaus moterys. Jauniausia tyrimo dalyvė buvo 19 metų (gimusi 1991 m.), o vyriausia – 62 metų (gimusi 1948 m.). Amerikos kolposkopijos ir gimdos kaklelio patologijos draugija (ASCCP) rekomenduoja ŽPV testą atlikti moterims, kai joms bus 30 metų ir daugiau [40, 44]. Šiame tyrime dalyvavo 16 moterų 30 ir daugiau metų ir 14 jaunesnių nei 30 metų moterų (12 lentelė). Visoms moterims prieš ŽPV tyrimą buvo atliktas citologinis gimdos kaklelio tyrimas.



8 pav. Tiriamųjų citologinio gimdos kaklelio tyrimo atsakymai

Intraepitelinų pokyčių nenustatyta 60 proc. (n=14) pacienčių. Vienai moterų tikėtini reaktyvūs pokyčiai vietoj nenustatytų intraepitelinų pokyčių, o antrajai – ASCUS. Įvairaus laipsnio gimdos kaklelio plokštaus epitelio pažeidimai nustatyti 40 proc. (n=11) tirtų moterų (8 pav.). Nustatyta ASCUS, ASC-H, LSIL, HSIL pokyčiai. Dviejų moterų citologinio tyrimo atsakymai dvejopi. Vienos iš tirtų moterų diagnozė HSIL arba ASC-H, o antros – LSIL arba ASCUS (12 lentelė).

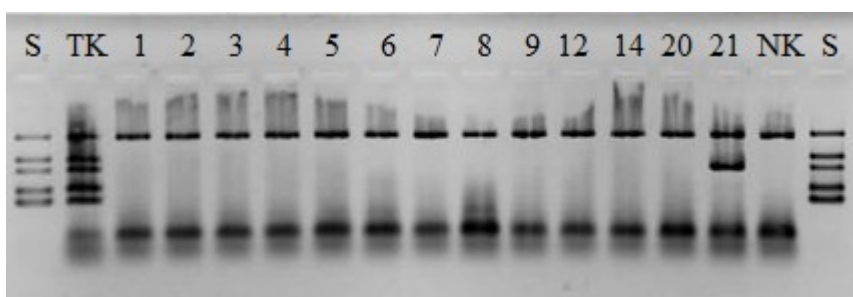
12 lentelė. Informacija apie pacientės, kurioms buvo atliktas ŽPV tyrimas

Tyrimo mėginio numeris	Pacientės gimimo metai	Citologija
1.	1970	Nėra IPPN, reaktyvūs pokyčiai
2.	1985	Nėra IPPN
3.	1980	Nėra IPPN
4.	1981	Nėra IPPN
5.	1983	Nėra IPPN
6.	1984	Nėra IPPN
7.	1979	Nėra IPPN
8.	1979	Nėra IPPN
9.	1984	Nėra IPPN
10.	1985	Nėra IPPN
11.	1979	Nėra IPPN
12.	1970	ASCUS
13.	1984	Nėra IPPN
14.	1959	ASCUS
15.	1975	ASCUS
16.	1977	LSIL
17.	1948	Nėra IPPN
18.	1963	HSIL
19.	1984	ASCUS
20.	1977	Nėra IPPN
21.	1991	ASCUS
22.	1974	ASCUS
23.	1978	HSIL, ASC-H
24.	1957	LSIL, ASCUS
25.	1969	ASCUS, nėra IPPN

3.2. ŽPV DNR tyrimo rezultatai

3.2.1. ŽPV tyrimo „Seeplex® HPV4 ACE Screening“ rinkiniu rezultatai

„Seeplex® HPV4 ACE Screening“ rinkiniu tirti 25 mėginiai. Nustatyti 5 ŽPV teigiami mėginiai: 15, 16, 21, 23 ir 24. Dviems tiriamosioms (15 ir 23) nustatyta ŽPV-16 tipo teigiama infekcija, o likusioms trims – didelės onkogeninės rizikos ŽPV infekcija. Visoms šioms moterims, kurioms ŽPV tyrimo atsakymas buvo teigiamas, citologinio tyrimo metu nustatyta įvairaus laipsnio intraepitelinų plokščialąstelinų gimdos kaklelio pokyčių (nuo ASCUS iki HSIL). Likusioms šešioms moterims, kurioms citologiniu tyrimu nustatyti gimdos kaklelio epitelio pokyčiai, ŽPV infekcija nenustatyta.



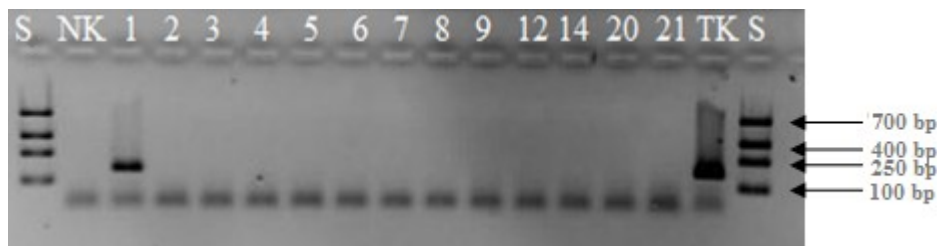
9 pav. Tyrimo, atlikto „Seeplex® HPV4 ACE Screening“ rinkiniu, rezultatai (iš kairės į dešinę: S – fragmentų ilgio standartas (7 pav.); TK – teigiama kontrolė; mėginiai 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 20, 21; NK – neigiama kontrolė; S – fragmentų ilgio standartas (7 pav.))

3.2.2. ŽPV tyrimo AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu rezultatai

AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu tirti 25 mėginiai. Bendru rinkiniu nustatyti 5 ŽPV teigiami mėginiai: 1, 15, 19, 23, 24. Šių pacienčių citologinio tyrimo metu buvo nustatyti įvairaus laipsnio intraepiteliniai plokščialąsteliniai gimdos kaklelio pokyčiai. Du kartus atliktas 19 ir 24 mėginių tyrimas, nes vienu atveju atsakymas buvo teigiamas, o kitu – neigiamas. „Seeplex® HPV4 ACE Screening“ rinkiniu nustatyta, kad 16, 21 mėginiai yra ŽPV teigiami. Atlikus AB „Sorpo Diagnostics“ testą, abu šie mėginiai buvo neigiami.

„Seeplex® HPV4 ACE Screening“ ir AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniais nustatyti ŽPV teigiami mėginiai (1, 15, 16, 19, 21, 23, 24) ištirti genotipavimo rinkiniu. Pastebėti keli nesutapimai tarp ŽPV bendro ir genotipavimo testų. Gauti genotipavimo rezultatai: 1 mėginys –

ŽPV neigiamas, 15 – infekuotas ŽPV-16, 16 – ŽPV-56, 19 – ŽPV neigiamas, 21 – infekuotas ŽPV-58, 23 – ŽPV-16, 24 – ŽPV-56 tipo.

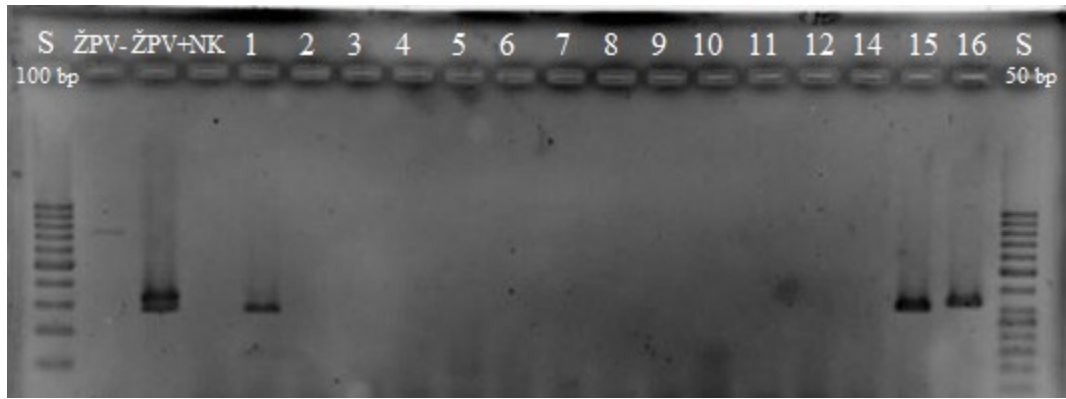


10 pav. Tyrimo, atlikto AB „Sorpo Diagnostics“ bendru rinkiniu, rezultatai (iš kairės į dešinę: S – fragmentų ilgio standartas; NK – neigiama kontrolė; mėginiai 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 20, 21; TK – teigiama kontrolė; S – fragmentų ilgio standartas)

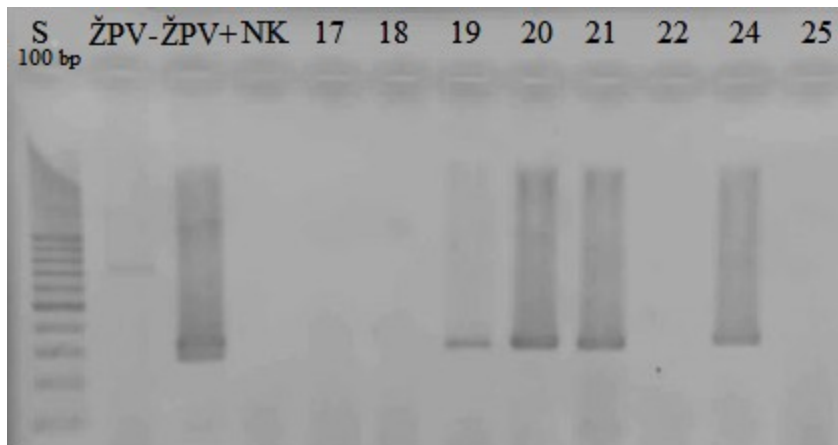
3.2.3. ŽPV tyrimo „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu rezultatai

„AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu tirti 23 mėginiai. Netirtas 13 ir 23 mėginiai, nes pritrūko tiriamosios medžiagos. Testu nustatyti 7 ŽPV teigiami mėginiai: 1, 15, 16, 19, 20, 21 ir 24. ŽPV infekcija nustatyta visuose mėginiuose, kuriuose ŽPV rastas ir pirmais dviem testais. ŽPV aptiktas ir 20 mėginyje. Šio mėginio atsakymas tiriant „Seeplex® HPV4 ACE Screening“ ir AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniais buvo neigiamas. 20 pacientės citologinis gimdos kaklelio tyrimas buvo be pakitimų. Visoms kitoms ŽPV teigiamoms pacientėms nustatyti įvairaus laipsnio citologiniai gimdos kaklelio epitelio pokyčiai.

„AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkinio gamintojas informacijoje apie rinkinį pateikia, kad PGR metu turi būti padauginama vidinė kontrolė – 723 bp ilgio fragmentas (β -globino genas). Tačiau atliekant tyrimą, vidinės kontrolės nepavyko aptikti nei ŽPV+ kontroliniame mėginyje nei tiriamuosiuose mėginiuose. ŽPV- kontroliniame mėginyje vidinė kontrolė būdavo padauginama, tačiau dažniausiai buvo gaunamas silpnas signalas.



11 pav. Tyrimo, atlikto „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu, rezultatai (iš kairės į dešinę: S – 100 bp ilgio standartas; kontrolės: ŽPV-, ŽPV+, NK – neigiama kontrolė; mėginiai 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16; S – 50 bp ilgio standartas)



12 pav. Tyrimo, atlikto „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu, rezultatai (iš kairės į dešinę: S – 100 bp ilgio standartas; kontrolės: ŽPV-, ŽPV+, NK – neigiama kontrolė; mėginiai 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25)

13 lentelė. ŽPV tyrimo, atlikto PGR metodu, rezultatai

Tyrimo mėginio numeris	„Seeplex® HPV4 ACE Screening“	AB „Sorpo Diagnostics“ bendras r.	AB „Sorpo Diagnostics“ genotipavimo r.	„AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“
1.*	Neigiamas	Teigiamas	Neigiamas	Teigiamas
2.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
3.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
4.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
5.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
6.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
7.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
8.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
9.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
10.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
11.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
12.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
13.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Netirta
14.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
15.*	ŽPV-16	Teigiamas	ŽPV-16	Teigiamas
16.*	DR ŽPV	Neigiamas	ŽPV-56	Teigiamas
17.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
18.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
19.*	Neigiamas	Teigiamas/ Neigiamas	Neigiamas	Teigiamas
20.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Teigiamas
21.*	DR ŽPV	Neigiamas	ŽPV-58	Teigiamas
22.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas
23.*	ŽPV-16, DR ŽPV	Teigiamas	ŽPV-16	Netirta
24.*	DR ŽPV	Teigiamas/ Neigiamas	ŽPV-56	Teigiamas
25.	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas	Neigiamas

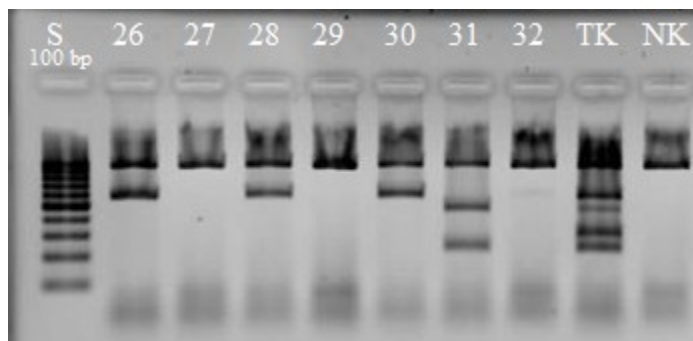
* AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu genotipuoti mėginiai

3.2.4. ŽPV tyrimo „Seeplex® HPV4A ACE Screening“ ir „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu rezultatai

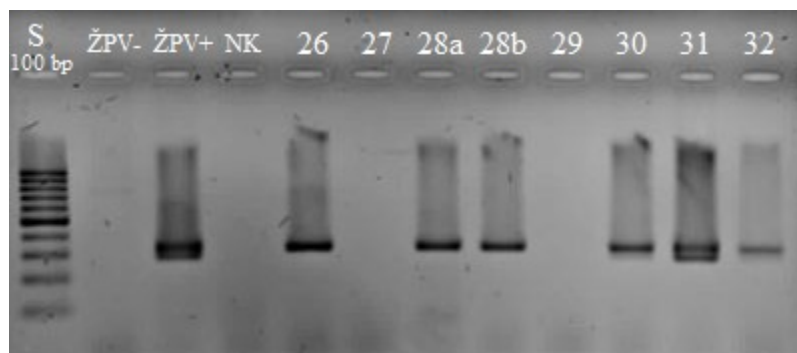
„Seeplex® HPV4A ACE Screening“ testu ir „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“ testu iširti dar 7 nauji mėginiai. Tyrimo rezultatai pateikiami 14 lentelėje. Penkioms tiriamosioms citologiškai nustatyti ryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai (HSIL), o dviems moterims atlikta gimdos kaklelio biopsija ir nustatyta plokščialąstelinė karcinoma (Ca). „Seeplex® HPV4A ACE Screening“ testu nustatyti 2 ŽPV neigiami mėginiai ir 5 ŽPV – teigiami:

ŽPV-16 tipo infekcija nustatyta 26, 28, 30 ir 32 mėginyje, o 31 mėginyje nustatyta dviejų tipų infekcija: ŽPV-18 tipo ir DR-ŽPV tipo. „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ testu taip pat nustatyti 2 ŽPV neigiami mėginiai ir 5 ŽPV teigiami mėginiai.

Atlikus tyrimą „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ testu, vidinės kontrolės fragmentų nepavyko aptikti nei kontroliniuose mėginiuose, nei tiriamuosiuose mėginiuose.



13 pav. Tyrimo, atlikto „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu, rezultatai (iš kairės į dešinę: S – 100 bp ilgio standartas; mėginiai 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32; TK – teigiama kontrolė; NK – neigiama kontrolė)



14 pav. Tyrimo, atlikto „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu, rezultatai (iš kairės į dešinę: S – 100 bp ilgio standartas; kontrolės: ŽPV-, ŽPV+, NK – neigiama kontrolė; mėginiai 26, 27, 28a (skiestas), 28b (neskiestas), 29, 30, 31, 32)

14 lentelė. 7 pacienčių citologinio tyrimo ir ŽPV tyrimo rezultatai

Tyrimo mėginio numeris	Citologija/biopsija	„AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“	„Seeplex® HPV4A ACE Screening“
26.	HSIL	Teigiamas	ŽPV-16
27.	Ca plokščialąstelinė	Neigiamas	Neigiamas
28.	HSIL	Teigiamas	ŽPV-16
29.	HSIL	Neigiamas	Neigiamas
30.	HSIL	Teigiamas	ŽPV-16
31.	HSIL	Teigiamas	DR-ŽPV ir ŽPV-18
32.	Ca plokščialąstelinė	Teigiamas	ŽPV-16

3.3. Rezultatų aptarimas

ŽPV tyrimų, atliktų su trimis skirtingais rinkiniais („Seeplex® HPV4 ACE Screening“, AB „Sorpo Diagnostics“, „AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“), rezultatai ne visi sutapo. Iš 25 tirtų mėginių, 19 mėginių atsakymai buvo vienodi – nustatyta 17 ŽPV neigiamų ir 2 ŽPV teigiami. Neatitikimų nustatyta ištyrus 1, 16, 19, 20, 21, 24 mėginius. ŽPV infekcija šiuose mėginiuose nustatyta ne su visais trimis rinkiniais. Naudoti ŽPV diagnostiniai rinkiniai skiriasi nustatomais ŽPV tipų spektrais (15 lentelė).

15 lentelė. ŽPV diagnostiniai rinkiniai ir jais nustatomi ŽPV tipai

Diagnostinis rinkinys	Nustatomi ŽPV tipai
„Seeplex® HPV4 ACE Screening“	DR-ŽPV: 31, 33, 35, 45, 51, 56, 58, 59, 66, 67, 70; MR-ŽPV: 6, 11, 42, 43, 44; Genotipuojami: 16, 18.
AB „Sorpo Diagnostics“ bendras rinkinys	DR-ŽPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 45, 66, 68, 73, 82; MR-ŽPV: 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 72, IS39, CP8304, CP6108, MM4, MM7, MM8 ir kt.
AB „Sorpo Diagnostics“ genotipavimo rinkinys	DR-ŽPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; MR-ŽPV: 6, 11.
„AmpliSens® HPV HCR screen-Eph“	DR-ŽPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70.
„Seeplex® HPV4A ACE Screening“	DR-ŽPV: 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82; MR-ŽPV: 6, 11; Genotipuojami: 16, 18, 6, 11.

Visais trimis rinkiniais galima nustatyti 11 DR-ŽPV tipų ir net 8 DR-ŽPV tipais rinkiniai skiriasi. Rinkinių aprašymuose pastebėtas neatitikimas dėl 53, 67 ir 70 ŽPV tipų priskyrimo didelės ir mažos rizikos ŽPV grupėms: 70 ŽPV tipas „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ ir „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniuose yra DR-ŽPV tipas, o AB „Sorpo Diagnostics“ bendrame rinkinyje – MR-ŽPV tipas; 67 – DR-ŽPV tipas „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ rinkinyje, o AB „Sorpo Diagnostics“ bendrame rinkinyje – MR-ŽPV tipas; 53 – DR-ŽPV tipas „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkinyje, o AB „Sorpo Diagnostics“ bendrame rinkinyje – MR-ŽPV tipas. Moksliniuose straipsniuose vis dar diskutuojama dėl šių ŽPV tipų bei dar 26, 73, 82 tipų priskyrimo didelės onkogeninės rizikos ŽPV grupei ir būtinybės juos įtraukti į diagnostinius testus. Epidemiologiškai yra maža rizika, kad jie sukels gimdos kaklelio vėžį, tačiau genetiškai jie yra artimesni didelės onkogeninės rizikos ŽPV tipams, todėl neapsisprendžiama, kuriai rizikos grupei šiuos tipus priskirti ir, ar verta juos tirti [6].

„Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ rinkiniu atlikus 1 ir 19 mėginio tyrimą, gautas ŽPV neigiamas atsakymas. Tačiau AB „Sorpo Diagnostics“ ir „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniais, gauti ŽPV teigiami šių mėginių atsakymai. AB „Sorpo Diagnostics“ genotipavimo rinkiniu gauti ŽPV neigiami atsakymai. Sulyginus testais nustatomų ŽPV tipų spektrus, būtų galima manyti, kad 1 ir 19 mėginiai infekuoti ŽPV-53 tipu, nes tik AB „Sorpo Diagnostics“ bendru rinkiniu ir „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu galima nustatyti šį ŽPV tipą.

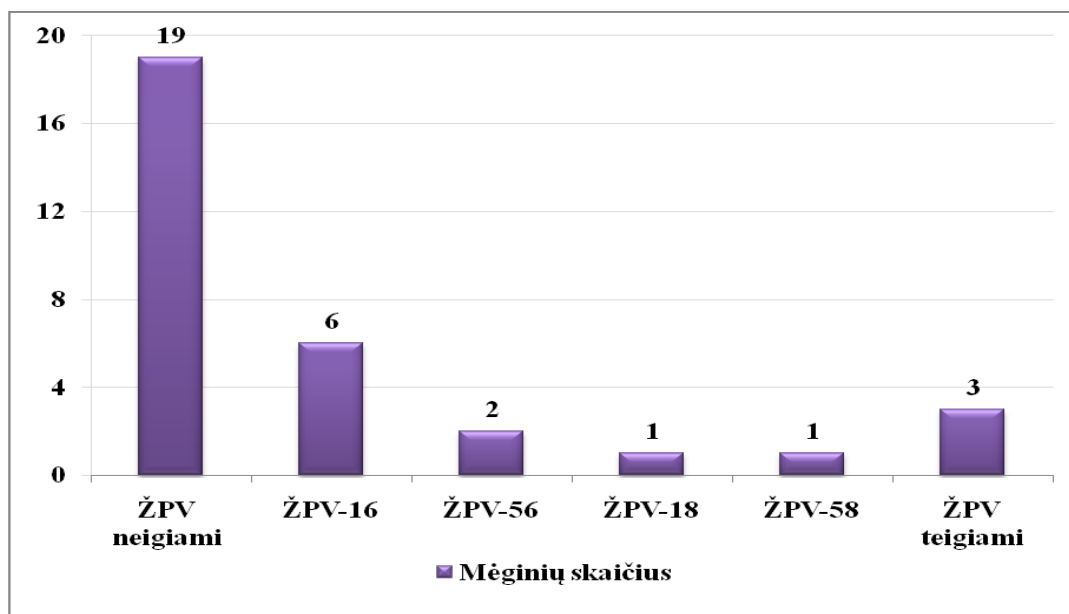
Tačiau paaiškinti visų ŽPV tyrimo rezultatų nesutapimo vien skirtingais rinkinių ŽPV tipų nustatymo spektrais negalima.

„Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ ir „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu ištyrus 16, 21 ir 24 mėginius buvo nustatyta ŽPV infekcija. Tačiau su AB „Sorpo Diagnostics“ bendru rinkiniu šių mėginių tyrimo rezultatai buvo neadekvatūs (žr. 13 lentelę). AB „Sorpo Diagnostics“ genotipavimo rinkiniu nustatyta, kad 16 ir 24 mėginys infekuoti ŽPV-56 tipu, o 21 mėginys – ŽPV-58 tipu. Būtent su AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniais gauta daugiausiai neatitikimų nustatant ŽPV infekciją. AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniai yra laboratorijoje ruošti (angl. „in-house“) rinkiniai. Literatūroje teigiama, kad tokie rinkiniai nėra standartizuoti, neturi CE kokybės patvirtinimo. Ekspertų nuomone, laboratorijoje ruošti rinkiniai negali būti naudojami nei moterų patikrai esant CIN, nei pirminei moterų patikrai [2, 4, 28, 37]. Be to, norint dirbti su laboratorijoje kurtais rinkiniais, reikia atlikti daug tyrimų metodikos išstobulinimui.

„AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu nustatytos visos ŽPV infekcijos, kurios prieš tai buvo aptiktos „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ ir AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniais. Tačiau

„AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu ŽPV infekcija nustatyta ir 20 mėginyje. Literatūroje teigiama, kad skirtingais rinkiniais nustatant ŽPV infekcija rezultatai gali skirtis dėl rinkinių analitinio jautrumo, kai kurių kryžminės hibridizacijos reakcijų [21]. Tačiau mūsų naudotų visų rinkinių jautrumas panašus ir yra ribose tarp 10–30 viruso kopijų/mėginyje. Taigi, gali būti, jog teigiamas 20 mėginio rezultatas gautas dėl galimų kryžminių hibridizacijos reakcijų. Be to, „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkinio vidinės kontrolės nepavyko padauginti, todėl šiuo rinkiniu gauti tyrimo rezultatai vertinami kaip nepakankamai patikimi.

„Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ testu ir „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ testu ištirti dar 7 nauji mėginiai. Abiejų testų tyrimų atsakymai sutapo, 5 iš 7 mėginių – ŽPV teigiami. 27 ir 29 mėginiai buvo ŽPV neigiami. „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu ŽPV-16 tipo infekcija nustatyta 26, 28, 30 ir 32 mėginyje, ŽPV-18 tipo ir DR-ŽPV tipo infekcija nustatyta 31 mėginyje. „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu nustatoma bendra ŽPV infekcija (genotipai nenustatomi). ŽPV teigiami buvo 26, 28, 30, 31 ir 32 mėginiai. Jei atsakymas teigiamas, tyrimą dar kartą reikėtų atlikti genotipavimo rinkiniu, o jį reikėtų išigyti atskirai. Šiuo atveju „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkinys turi daugiau privalumų, nes iš karto yra genotipuojami 16, 18, 6 ir 11 ŽPV tipai. Moterims sergančioms gimdos kaklelio vėžiu, dažniausiai yra nustatomi 16 (49,9 proc.) ir 18 (13,7 proc.) ŽPV tipai [8], o 6 ir 11 tipų infekcija sukelia lytinių organų karpas [38, 47]. Taigi 6 ir 11 ŽPV tipus naudinga tirti tiems pacientams, kuriems dažnai kartojasi ši liga. „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkinys turi vidinę kontrolę, kuri buvo padauginama kartu su tiriamąja DNR ir jos fragmentai matomi gelio nuotraukose. „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkinio vidinės kontrolės nepavyko padauginti, todėl šiuo rinkiniu gauti tyrimo rezultatai nepakankamai patikimi.



15 pav. Tirtų mėginių infekuotumas ŽPV

Iš 32 tirtų mėginių, 19 mėginių buvo ŽPV neigiami, 13 – ŽPV teigiami, kurių 6 infekuoti ŽPV-16 tipu, 2 – ŽPV-56 tipu, 1 – ŽPV-18 ir 1 – ŽPV-58 tipu, o likę trys – ŽPV teigiami, nes šie mėginiai nebuvo genotipuoti (15 pav.). Nors atlikto tyrimo imtis maža, tačiau daugiausiai aptikta ŽPV-16 tipo infekcijų, o tai atitinka literatūroje pateikiamus duomenis, kad dažniausiai gimdos kaklelio vėžio atveju nustatoma ŽPV-16 tipo infekcija [33]. Todėl didesnę pranašumą turi tie ŽPV diagnostiniai rinkiniai, kuriais iš karto nustatoma 16 ir 18 ŽPV tipų infekcija.

IŠVADOS

1. „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ rinkiniu ištyrus 25 mėginius, ŽPV infekcija nustatyta 5 mėginiuose (15, 16, 21, 23, 24). Gauti rezultatai sutampa su AB „Sorpo Diagnostics“ ir „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkinių tyrimo rezultatais, o keli nesutapimai galėjo būti dėl šių dviejų rinkinių trūkumų.
2. Bendru AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniu ištyrus 25 mėginius, ŽPV infekcija nustatyta 5 mėginiuose (1, 15, 19, 23, 24). AB „Sorpo Diagnostics“ genotipavimo rinkiniu tirti 7 ŽPV teigiami mėginiai. ŽPV infekcija nustatyta 5 mėginiuose (15, 16, 21, 23, 24). Su AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniais gauta daugiausiai neatitikimų nustatant ŽPV infekciją.
3. „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkiniu atliekant tyrimą, tiriamuosiuose ir kontroliniuose mėginiuose nepavyko aptikti vidinės kontrolės, todėl tyrimo rezultatai vertinami kaip nepakankamai patikimi.
4. „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu iširti 7 mėginiai. ŽPV-16 tipo infekcija nustatyta 4 mėginiuose (26, 28, 30, 32) ir viename mėginyje (31) nustatyta ŽPV-18 tipo ir DR-ŽPV infekcija. Rezultatai visiškai sutapo su „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkinio rezultatais.
5. AB „Sorpo Diagnostics“ rinkiniai ruošti laboratorijoje, nėra kokybės patvirtinimo ir reikia atlikti daug tyrimų metodikos išstobulinimui. „AmpliSens[®] HPV HCR screen-Eph“ rinkinys nepakankamai patikimas, nes nėra vidinės kontrolės. „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ ir „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniai turi kokybę patvirtinančius sertifikatus, vidinę kontrolę, genotipuoja 16 ir 18 ŽPV tipus. Be to, „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkiniu galima genotipuoti ir ŽPV-6/11 tipus bei nustatyti daugiau DR-ŽPV tipų, nei „Seeplex[®] HPV4 ACE Screening“ rinkiniu.

REKOMENDACIJA

ŽPV tyrimams pasirinkti „Seeplex[®] HPV4A ACE Screening“ rinkinį. Šiuo rinkiniu dar reikėtų iširti daugiau mėginių, tačiau jau atlikti tyrimai parodė, kad rinkinys tikrai turi vidinę kontrolę, genotipuoja 16 ir 18 ŽPV tipus bei aptinka kitus DR-ŽPV tipus. Be to, rinkiniu galima genotipuoti ir 6/11 ŽPV tipus, kurių nustatymas svarbus pacientams, turintiems lytinių organų karpų.

SUMMARY

Cervical cancer is the second oncological disease in women in the world, and the fourth one in Lithuania. The main cause of the cervical cancer is Human papillomavirus (HPV) infection in the cervix uteri. In order to detect precancerous changes or cancer cells, a Papanicolaou (*Pap*) test based on cytology and HPV DNA test are used in the Western world. Currently used HPV diagnostic tests are based on molecular biology testing methods. The polymerase chain reaction (PCR) method, not the extensively used Hybrid Capture 2 (HC2) method awarded the certificate of quality by both the USA and Europe, was chosen. PCR is a particularly sensitive, fast, and commercially available method that needs a small quantity of research material and can identify the types of HPV. *HC2* method does not detect HPV genotypes, false-negative results are possible because there is no internal control, and due to cross reactions, false-positive results are possible. The newest written sources state that PCR will have much potential in the future and it is thought that HPV detection standard will become 14 HR-HPV test combined with the detection of the types of HPV-16 and HPV-18. Therefore, in order to chose the optimum one for HPV tests from the commercial kits offered in Lithuania, this investigation was carried out in the National Centre of Pathology. Four different HPV diagnostic kits were used for the research. Having evaluated the research results, „Seeplex® *HPV4A ACE Screening*“ HPV diagnostic kit was chosen for further investigation.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aleknavičienė B., Smailytė G., Elaawar B., Kurtinaitis J. Gimdos kaklelio vėžys. Sergamumo bei mirtingumo pokyčiai Lietuvoje. *Medicina*. 2002; 38 (2): 223 – 230.
2. Ambrasienė D., Popendikytė V. Žmogaus papilomos viruso tyrimai. *Laboratorinė medicina*. 2008; 2 (38): 78 – 88.
3. Antonishyn N. A., Horsman G. B., Kelln R. A., Severini A. Human papillomavirus typing and viral gene expression analysis for the triage of women with abnormal results from papanicolaou test smears to colposcopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009; 133 (10): 1577 – 1586.
4. Bolick D. R. Laboratory implementation of human papillomavirus testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 984 – 990.
5. Bosch F.X., Lorincz A., Munoz N., Meijer C.J., Shah K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 244–265.
6. Castle P. E. The evolving definition of carcinogenic human papillomavirus. *Infectious Agents and Cancer*. 2009; 4:7.
7. Castle P. E., Solomon D., Wheeler C. M., Gravitt P. E., Wacholder S., Schiffman M. Human Papillomavirus Genotype Specificity of Hybrid Capture 2. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (8): 2595 – 2604.
8. Castellsague X., Bosch F. X., Munoz N. The male role in cervical cancer. *Salud. Publ. Mex*. 2003; 45(Suppl. 3): S345 – S353.
9. Choi J. J., Kim C., Park H. Peptide nucleic acid-based array for detecting and genotyping human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol*. 2009; 47 (6): 1785 – 1790.
10. Collins S. Rollason T. P., Young L. S., Woodman C. B. J. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *Eur J Cancer*. 2010; 46(2): 405 – 411.
11. Cox J. T., Moriarty A. T., Castle P. E. Commentary on Statement on Human Papillomavirus Test Utilization. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133: 1192 – 1194.
12. Day S. P., Hudson A., Mast A., *et al.* Analytical performance of the investigational use only Cervista HPV HR test as determined by a multi-center study. *Journal of Clinical Virology*. 2009; 45 (1): S63 – S72.

13. Dalstein V., Merlin S., Bali C., Saunier M., Dachez R., Ronsin C., Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J. Virol. Methods.* 2009; 156 (1–2): 77 – 83.
14. Dockter J., Schroder A., Eaton B., Wang A., Sikhamsay N., Morales L., Giachetti C. Analytical characterization of the APTIMA HPV Assay. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (1): S39 – S47.
15. Domža G., Domža B., Rinkevičius A. Gimdos kaklelio citologinių ir histologinių tyrimo duomenų palyginimas. *Medicinos teorija ir praktika.* 2008; 14 (1): 71 – 73.
16. Domža G., Gudlevičienė Ž., Kazbarienė B., Didžiapetrienė J. Gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių, atsiradusių dėl žmogaus papilomos viruso poveikio, progresavimo rizikos įvertinimas. *Medicinos teorija ir praktika.* 2008; 14(4): 346 – 350.
17. Erali M., Pattison D. C., Wittwer C. T., Petti C. A. Human papillomavirus genotyping using an automated film-based chip array. *J. Mol. Diagn.* 2009; 11 (5): 439 – 445.
18. EUROGIN. Conclusions: cervical cancer control, priorities and new directions. International Charter. Paris; 2003.
19. Franceschi S., Plummer M., Clifford G., de Sanjose S., Bosch X., Herrero R., Munoz N., Vaccarella S. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. *Br J Cancer.* 2009; 101: 865 – 870.
20. Geraetsa D. T., Heidemanb D. A. M., de Koninga M. N. C., Snijdersb P. J. F., van Alewijkka D. C. J. G., Meijerb C. J. L. M., van Doorna L. J., Quin W. G. V. High-throughput genotyping of high-risk HPV by the *digene* HPV Genotyping LQ Test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology. *J. Clin. Virol.* 2009; 46 (3): S16 – S20.
21. Gillio-Tos A., De Marco L., Ghisetti V., Snijders P. J., Segnan N., Ronco G., Merletti F. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J. Clin. Virol.* 2006; 36 (2): 126 - 132.
22. Ginocchio Ch. C. Assays for the detection of human papillomavirus. *Pan American Society for clinical virology.* 2004; 31(1).
23. Green J., Berrington D. G., Sweetland S., Beral V., Chilvers C., Crossley B., Deacon J., Hermon C., Jha P., Mant D., Peto J., Pike M., Vessey M. P. Risk factors for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix in women aged 20– 44 years: the UK National Case-Control Study of Cervical Cancer. *Br J Cancer.* 2003; 89: 2078 –2086.
24. Gudlevičienė Ž., Didžiapetrienė J., Sužiedėlis K., Lapkauskaitė L. Žmogaus papilomos viruso, jo tipų ir variantų tyrimai. *Medicina.* 2005; 41 (11): 910 – 915.

25. Gudlevičienė Ž., Ivanucha J. Ar vakcinosis prieš žmogaus papilomos virusą padės išvengti gimdos kaklelio vėžio? *Internistas*. 2005; 4(45): 91 – 94.
26. Gudlevičienė Ž., Mozūraitienė J. Gimdos kaklelio vėžio profilaktika panaudijant vakcinosis prieš žmogaus papilomos viruso infekciją: ateities perspektyvos. *Sveikatos mokslai*. 2006; 1-2: 111 – 117.
27. Huang S., Tang N., Mak W. B., Erickson B., *et al.* Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test. *Journal of Clinical Virology* 2009; 45 (1): S13 – S17.
28. Hubbard R. A. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(8): 940 – 945.
29. Kissel'jov F. L. Virus – Associated Human Tumors: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses. *Biochemistry*. 2000; 65(1): 68 – 77.
30. Kleter B., van Doorn L. J., Schrauwen L., Molijin A., *et al.* Development and Clinical Evaluation of a Highly Sensitive PCR-Reverse Hybridization Line Probe Assay for Detection and Identification of Anogenital Human Papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (8): 2508 – 2517.
31. Koroltchouk V. Cervical cancer screening: worldwide experience. *Cancer Strategy*. 1999; 6:1-14.
32. Louie K.S.,¹ De Sanjose S., Diaz M., Castellsague X., Herrero R., Meijer C.J., Shah K., Franceschi S., Munoz N., Bosch F.X. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br. J. Cancer*. 2009; 100: 1191 – 1197.
33. Milde-Langosch K., Riethdorf S., Loning T. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch*. 2000; 437: 227-33.
34. Mirasoli M., Guardigli M., Simoni P., Venturoli S., Ambretti S., Musiani M., Roda A. Multiplex chemiluminescence microscope imaging of P16(INK4A) and HPV DNA as biomarker of cervical neoplasia. *Anal. Bioanal. Chem*. 2009; 394 (4): 981 – 987.
35. Nour N. M. Cervical cancer: A preventable death. *Rev Obstet Gynecol*. 2009; 2(4): 240–244.
36. Poljak M., Fujs K., Seme K., Kocjan B. J., Vrtačnik-Bokal E. Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannon. Adriat*. 2005; 14 (4): 147 – 152.
37. Poljak M., Kocjan B. J. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2010; 8 (10): 1139 – 1162.

38. Principles and practice of clinical virology (Fifth edition), UK, 2004.
39. Sherman M. E., Lorincz A. T., Scott D. R., Wacholder S., Castle P. E., Glass A. G., *et. al.* Baseline cytology human papillomavirus testing and risk for cervical neoplasia: a 10-years cohort analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95: 46 – 52.
40. Solomon D., Papillo J. L., Davey D. D. Statement on Human Papillomavirus DNA Test Utilization. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133: 1276 – 1277.
41. Šepetienė A., Gudlevičienė Ž., Didžiapetrienė J., Drąsutienė G. Kancerogenezės rizikos veiksnių, susijusių su žmogaus papilomos viruso infekcija, įtaka gimdos kaklelio intraepitelinių pokyčių progresavimui. *Sveikatos mokslai.* 2008; 5: 1912 – 1917.
42. Tannock I. F., Hill R. P., Bristow R. G., Harrington L. The basic science of oncology (Fourth edition). 2005; 105 – 107.
43. Thai H., Rangwala S., Gay T., Keating K., McLeod S., *et al.* An HPV 16, 18, and 45 genotyping test based on hybrid capture technology. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (1): S93 – S97.
44. Villa L. L., Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2006; 94 (1): 71 – 80.
45. Wei L., Gravitt P. E., Song H., Maldonado A. M., Ozbun M. A. Nitric Oxide Induces Early Viral Transcription Coincident with Increased DNA Damage and Mutation Rates in Human Papillomavirus – Infected Cells. *Cancer Res.* 2009; 69 (11): 4878 – 4884.
46. Woodman C. B. J., Collins S. I., Young L. S. The nature history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer.* 2007; 7 (1): 11 – 22.
47. Zheng Z. M., Baker C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006; 11: 2286 – 2302.
48. Žilinskas K., Čigriejienė V. M., Inčiūra A. Gimdos kaklelio vėžio diagnostikos ir gydymo pagrindai. Vilnius, 2002; p. 9 – 13.
49. <http://www.vuoi.lt/index.php?-2043095342> [Žiūrėta 2011 m. balandžio 19 d.]
50. http://old.interlux.lt/lt/disp.php/lt_products/lt_products_11/lt_products_11_8/lt_products_11_8_1/lt_products_11_8_1_3 [Žiūrėta 2011 02 07]