

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**CINTEC PLUS IMUNOCITOCHEMINIO TYRIMO VERTĖ DIAGNOZUOJANT
GIMDOS KAKLELIO PATOLOGIJA, LYGINANT SU THINPREP PAP IR ŽMOGAUS
PAPILOMOS VIRUSO DNR TYRIMŲ REZULTATAIS**

Magistrantė VAIGA UMBRASAITĖ

(parašas)

Darbo vadovas
dr. J. Rimienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
doc.dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

2018., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS.....	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Gimdos kaklelio vėžys	7
1.2 Gimdos kaklelio ikivėžiniai pokyčiai	10
1.3 Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija	12
1.4 Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai	16
1.5 Gimdos kaklelio vėžio prevencinė programa	17
1.6. Žmogaus papilomos virusas.....	18
1.6.1. ŽPV infekcijos eiga	20
Adaptuota iš: (Silvia de Sanjose, Maria Brotons and Miguel Angel Pavon. The natural history of human papillomavirus infection. Elsevier. February 2018, vol. 47.).	21
1.6.2. ŽPV geno integracija į žmogaus ląsteles ir kancerogenezė	22
1.7. Gimdos kaklelio patologijos tyrimo metodai	23
1.7.1. Citologiniai metodai	23
1.7.2. Histologiniai metodai	24
1.7.3. Molekuliniai metodai	25
1.7.4. Imunohistocheminiai metodai	27
1.7.5. Imunocitocheminis metodas	27
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS	28
2.1. Tyrimo medžiaga	28
2.1.1 Tiriamoji medžiaga, metodai ir tiriamieji	28
2.2. Tyrimo metodika.....	28
2.2.1 Tiriamosios medžiagos paėmimas gimdos kaklelio tyrimams į skystąją ThinPrep terpę Tiriamoji medžiaga imama naudojant šluotelę.	28
2.2.2 Analizatoriai ir jų veikimo principai.....	29
2.2.3. Rezultatų interpretacija.....	36
3. REZULTATAI.....	40
3.1. Moterų, kurioms nustatytos displazijos, amžius.....	41
3.2. ŽPV infekuotų moterų amžius	43
3.3. Citologija ir ŽPV DNR.....	46
3.4. Citologija ir Cintec Plus	48

3.5. Citologija/ Cintec Plus/ ŽPV DNR.....	49
3.6. Cintec Plus ir ŽPV DNR	50
3.7. Prognostinės vertės	51
4. REZULTATŲ APTARIMAS	53
5. IŠVADOS.....	58
SUMMARY	59
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	61

SANTRUMPOS

AGUS	Atipinės liaukinės ląstelės, nenustatytos reikšmės (<i>angl.</i> atypical glandular cells undeterminate significance)
AR	Aukšta rizika
ASC – H	Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (<i>angl.</i> atypica squamous cell suggestion for high grade squamous intraepithelial lesion)
ASC – US	Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės – nenustatytos reikšmės (<i>angl.</i> atypical squamous cell undeterminate significance)
CIN1	I laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia)
CIN2	II laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia)
CIN3	III laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (<i>angl.</i> cervical intraepithelial neoplasia)
FDA	JAV maisto ir vaistų kontrolės tarnyba (<i>angl.</i> Food and Drug Administration)
GKV	Gimdos kaklelio vėžys
HSIL	Žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (<i>angl.</i> high grade squamous intraepithelial lesions)
LSIL	Nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (<i>angl.</i> low grade squamous intraepithelial lesion)
PAP	Citologinis gimdos kaklelio tepinėlio tyrimas (<i>Papanicolaou tyrimas</i>)
PGR	Polimerazės grandininė reakcija
ROC	kreivės, skirtos diagnostinėms testo charakteristikoms apibūdinti (<i>angl.</i> receiving operating curve)
ŽPV	Žmogaus papilomos virusas

IVADAS

Gimdos kaklelio vėžys – klastinga liga, nuo kurios 2012 m., vien Europos Sąjungos šalyse, mirė 12,977 moterys. Nors kasmet nuo šios ligos miršta vis mažiau moterų, nes veikia efektyvios gimdos kaklelio patikros programos, moterims suteikiama daugiau informacijos apie pačią ligą ir galimybes nuo jos apsisaugoti, tačiau tai išlieka opi problema visame pasaulyje, tame tarpe ir Lietuvoje. Lietuva, pagal sergamumą gimdos kaklelio vėžiu užima pirmą vietą tarp Baltijos šalių, ir yra antra Europos sąjungoje po Rumunijos [37.].

Gimdos kaklelio vėžys yra, palyginti, jaunų moterų liga, amžiaus vidurkis 45 – 65 metai. Vėžys išsivysto ~ per 10 metų, nuo pirmųjų gimdos kaklelio ląstelių pokyčių, kurie dar vadinami ikivėžiniais pakitimais [50,70]. Todėl labai svarbu laiku pasitikrinti ir aptikti šiuos pakitimus kuo anksčiau. Pasitikrinti nėra sudėtinga, tik reikia laiku atlikti citologinį PAP tyrimą [94]. Liga ir jos atsiradimas priklauso nuo daugelio veiksnių. Gyvenimo būdo: rūkymas, mityba, higiena ir kt. [34], seksualinio aktyvumo: ankstyvas seksualinio gyvenimo pradžios amžius, daug lytinių partnerių ir kt., bet svarbiausias veiksnys yra žmogaus papildomos viruso infekcija, kuri sukelia daugiau nei 90 %, visų vėžio formų [4].

Šiai dienai, yra žinoma ir atliekama daug diagnostinių tyrimų gimdos kaklelio patologijos nustatymui. Diagnostika yra nesudėtinga ir tiksli. Paprasčiausias tyrimas yra PAP tepinėlis, kuris taikomas kaip pirminės gimdos kaklelio vėžio patikros priemonė. Radus pakitimų PAP tepinėlyje, atliekami kiti, patvirtinantys tyrimai. Anksčiau PAP testas buvo laikytas aukso standartu, tačiau dabar vis dažniau kalbama apie alternatyvius pirminės patikros metodus, tokius kaip skystų terpių citologija ar ŽPV DNR tyrimas, kurie yra kokybiškesni ir tikslesni, nes PAP metodas, dėl įvairių priežasčių: netinkamas medžiagos paėmimas, giliau kaklelio kanale esantys pakitimai, gali būti netikslus [36,49,55]. Šiuo metu aukso standartu laikomas histologinis gimdos kaklelio tyrimas.

Atsiranda vis naujų klinikinių tyrimų, patvirtinančių ir imunohistocheminių, bei imunocitocheminio, Cintec Plus tyrimo vertę [46]. Nors palyginti šis metodas pradėtas naudoti neseniai, jis suteikia taip reikiamo aiškumo ginekologams, dėl tolesnės pacientės būklės.

Šis metodas ne tik leidžia nustatyti gimdos kaklelio ląstelių supiktybėjimą, tačiau tuo pat metu parodo ir tai, jog šiuos ląstelių pakitimus sukėlė integruotos formos ŽPV infekcija [22].

Taigi Cintec Plus tyrimas padeda tiksliai nustatyti gimdos kaklelio pokyčių lygį, bei juos sukėlusią priežastį, todėl galimas greitesnis diagnozės patvirtinimas ir efektyvesnis gydymo taktikos parinkimas, kuris gali padėti išvengti nebūtinų invazinių procedūrų arba suteikti greitesnę kolposkopijos galimybę. [22].

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

DARBO TIKSLAS:

Įvertinti Cintec Plus tyrimo vertę nustatant gimdos kaklelio patologiją.

DARBO UŽDAVINIAI:

1. Įvertinti sąsajas tarp gimdos kaklelio pakitimų ir moters amžiaus.
2. Įvertinti sąsajas tarp ŽPV DNR tyrimo rezultatų ir konkretaus ŽPV tipo bei moterų amžiaus.
3. Nustatyti citologinio tyrimo rezultatų ir ŽPV infekcijos paplitimo ryšį.
4. Nustatyti citologinio tyrimo rezultatų ir Cintec Plus tyrimo ryšį.
5. Įvertinti sąsajas tarp ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų rezultatų, nustatant gimdos kaklelio patologiją.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Gimdos kaklelio vėžys

Gimdos kaklelio vėžys – piktybinis gimdos kaklelio navikas, atsirandantis supiktybėjus gimdos kaklelio epitelio ląstelėms. Gimdos kaklelio ląstelės yra dviejų tipų: plokščiasis epitelis – dengia didžiąją išorinio gimdos kaklelio dalį, neragėjančios, atsparios rūgščiai makšties terpei ir liaukinis epitelis – sudarytas iš stulpinių ląstelių, dengia endocerviksą (gimdos kaklelio vidinę dalį – kanalą), nedidelė dalis randama ir egzocervikse (išorinėje gimdos kaklelio dalyje) [50]. Supiktybėjus plokščiojo epitelio ląstelėms (80-95 proc. atvejų) vėžys vadinamas plokščialąsteline karcinoma, o liaukinio epitelio (5-20 proc. atvejų) – adenokarcinoma [90]. Taip pat navikas gali būti mišrus – plokščiojo ir liaukinio epitelio ląstelių, toks navikas vadinamas adenoplokščialąstelinis arba smulkialąstelinis vėžys [47,70]. Plokščialąstelinė karcinoma vystosi egzocervikalinėje gimdos kaklelio dalyje, o adenokarcinomos išsivysto iš gleives gaminančių liaukų endocervikalinėje gimdos kaklelio dalyje [62]. Gimdos kaklelio pokyčiai vystosi transformacijos zonoje [3,8]. Jos vieta gali skirtis priklausomai nuo moters amžiaus: paauglystėje ji būna gimdos kaklelio paviršiuje ir yra imlesnė infekcijoms, o vyresnio amžiaus moterų transformacijos zona lokalizuojasi gimdos kaklelio kanale ir yra didesnė [8]. Gimdos kaklelio vėžio išsivystymo amžiaus vidurkis 45-65 metai.

Gimdos kaklelio vėžys pagal jo išplitimą skiriamas į šias stadijas:

I stadija - navikas yra tik gimdos kaklelyje.

II stadija – navikas išplitęs už gimdos kaklelio ribų į šalia esančius audinius, tačiau nesiekia kaulinių mažojo dubens sienų ar makšties apatinės dalies.

III stadija - navikas išplitęs iki kaulinių mažojo dubens sienų ir makšties apatinės dalies, gali blokuoti šlapimtakių. II ir III stadijos dar vadinamos – vietiškai išplitusiais navikais.

IV stadija - navikas įaugęs į šlapimo pūslės ar tiesiosios žarnos sienelę, išplitęs už mažojo dubens ribų ar metastazavęs į tolimesnius organus: plaučius, kepenis ar kaulus (pasitaiko retais atvejais) [62,70].

Gimdos kaklelio vėžys klasifikuojamas pagal TNM (T – naviko apimtis/dydis, N – išplitimas į limfmazgius, M – naviko plitimas (metastazavimas) į tolesnius organus) ir FIGO (Tarptautinė Ginekologijos ir Akušerijos Federacija) (1 lentelė) [47].

1 lentelė. Gimdos kaklelio vėžio TNM ir FIGO klasifikacija

TNM stadijos	FIGO stadijos	Požymiai

TX		Pirminio naviko neįmanoma vertinti
T0		Pirminio naviko nėra
Tis	0	Karcinoma <i>in situ</i> (ikiinvazinė karcinoma)
T1	I	Invazinė karcinoma, apribota gimdos kaklelio (turi būti įsitikinta, kad nėra išplitimo į gimdos kūną)
T1a	IA	Invazinė karcinoma diagnozuota tik mikrosopiškai. Visi makroskopiškai matomi pažeidimai: net esant paviršinei invazijai yra T1b/IB stadija.
T1a1	IA1	Invazija į stromą, ne gilesnė kaip 3,0 mm, kurios horizontalus išplitimas ne didesnis kaip 7,0 mm
T1a2	IA2	Invazija į stromą, gilesnė kaip 3,0 mm, tačiau ne gilesnė kaip 5,0 mm, kurios horizontalus išplitimas ne didesnis kaip 7,0 mm <i>Pastaba.</i> Ne didesnis kaip 5 mm invazijos gylis turi būti matuojamas arba nuo epitelio pagrindo, arba nuo liaukučių likučių, iš kurių formuojasi navikas, paviršiaus. Invazijos gylis apibrėžiamas kaip naviko matmuo nuo artimiausios arčiausiai paviršiaus esančios papilos stromos – epitelio jungties iki giliausio invazijos taško. Išplitimas į venų ar limfagyslių tarpą neturi įtakos klasifikacijai
T1b	IB	Kliniškai matomas pažeidimas, apribotas gimdos kaklelio, arba mikroskopinis pažeidimas didesnis kaip T1a2/IA2
T1b1	IB1	Kliniškai matomas pažeidimas, kurio dydis iki 4,0 cm
T1b2	IB2	Kliniškai matomas pažeidimas didesnis kaip 4,0 cm
T2	II	Navikas išplitęs už gimdos kaklelio ribų, tačiau nesiekia mažojo dubens sienos ar apatinio makšties trečdaliu
T2a	IIA	Nėra invazijos į parametriumą
T2b	IIB	Yra invazija į parametriumą
T3	III	Navikas išplitęs iki mažojo dubens sienos ir (arba) pažeidęs apatinį makšties trečdalį, ir (arba) sukėlęs hidronefrozę arba inksto funkcijos sutrikimą
T3a	IIIA	Navikas pažeidęs makšties apatinį trečdalį, nesiekia mažojo dubens sienos
T3b	IIIB	Navikas išplitęs iki mažojo dubens sienos ir/arba sukėlęs hidronefrozę arba inksto funkcijos sutrikimą
T4	IVA	Navikas išplitęs į šlapimo pūslės ar tiesiosios žarnos gleivinę ir (arba) išplitęs už dubens ribų

		<i>Pastaba.</i> Buliozinė edema nėra pakankamas požymis, kad naviką būtų galima klasifikuoti kaip T4
M1	IVB	Tolimosios metastazės

T – pirminis navikas.

N – metastazės sritiniuose limfmazgiuose:

NX – metastazių sritiniuose limfmazgiuose neįmanoma įvertinti.

N0 – metastazių sritiniuose limfmazgiuose nėra.

N1 – yra metastazių sritiniuose limfmazgiuose.

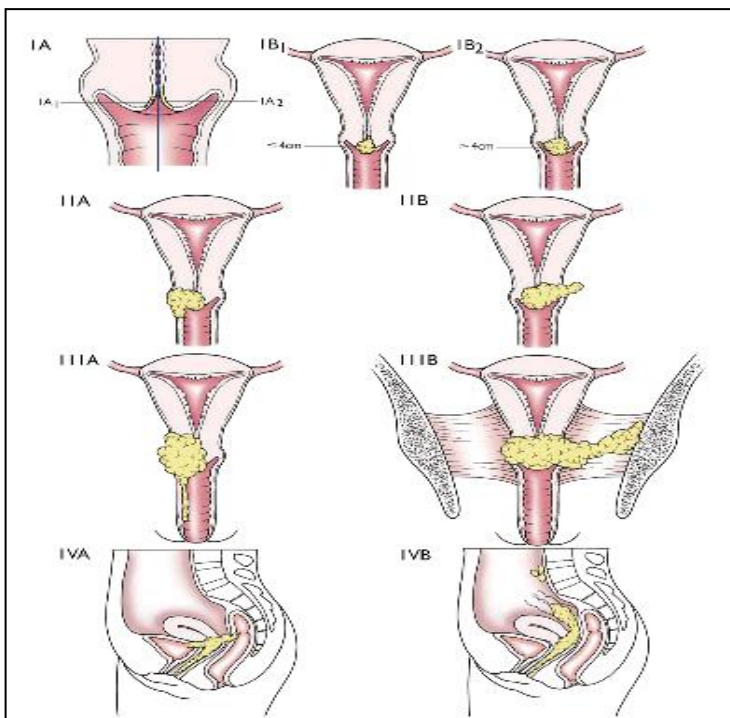
M – tolimosios metastazės

MX – tolimųjų metastazių neįmanoma įvertinti.

M0 – tolimųjų metastazių nėra.

M1 – yra tolimųjų metastazių.

1 pav. Gimdos kaklelio vėžio stadijos pagal FIGO.



Adaptuota iš: (<http://medicalstate.tumblr.com/post/6838197316/staging-cervical-cancer-every-cancer-has-a>)

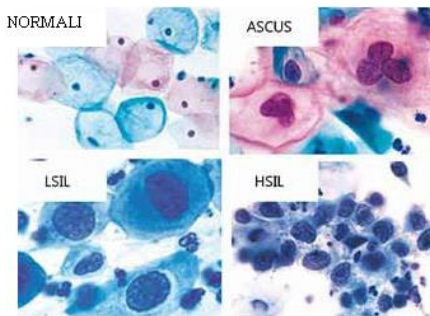
1.2 Gimdos kaklelio ikivėžiniai pokyčiai

Gimdos kaklelio epitelio ląstelės gali pakisti, tapti atipinėmis (nenormaliomis). Tačiau tokios ląstelės dar nėra vėžinės. Vyksta metaplazijos procesas – audiniai vystosi jiems nebūdinga linkme, tačiau jis yra grįžtamas ir pokyčiai gali išnykti savaime [50,70]. Tokie pokyčiai yra vadinami ikivėžiniais, displazijomis. Jeigu prasideda neoplazinis procesas, vystosi navikas ir ląstelių pokyčiai tampa vėžiniais [50,70]. Anksti nustatčius ikivėžinius pakitimus ir tinkamai juos gydant, galima užkirsti kelią vėžio išsivystymui. Vadovaujantis 2001 m. Bethesda sistema, citologiniuose tepinėliuose vertinami ikivėžiniai pokyčiai [11,21,88]:

2 lentelė. Bethesda 2001 m. ikivėžinių pokyčių klasifikacija

Plokščiojo epitelio pokyčiai	
Pokytis	Reikšmė
ASC-US (angl. atypical squamous cell undeterminate significance)	Nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės. Vertinami kaip ryškesni už reaktyvius pokyčius, bet neliudija ikivėžinių pokyčių. Tikslios diagnozės pateikti negalima dėl nepakankamo pakitusių ląstelių kiekio ar dėl ląstelių pakitimų kriterijų trūkumo.
ASC-H (angl. atypical squamous cell suggestion for high grade squamous intraepithelial lesion)	Atipinės plokščiojo epitelio ląstelės. Negalima atmesti žymių plokščialąstelių intraepitelinių pakitimų galimybes.
LSIL (angl. low grade squamous intraepithelial lesion)	Nežymūs intraepiteliniai plokščialąsteliniai pakitimai. (Priskiriama CIN1).
HSIL (angl. high grade squamous intraepithelial lesion)	Žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai. (Priskiriamas CIN2/ CIN3).
Liaukinio epitelio pokyčiai	
AGUS (angl. atypical glandular undeterminate significance)	Nenustatytos reikšmės atipinės liaukinio epitelio ląstelės.

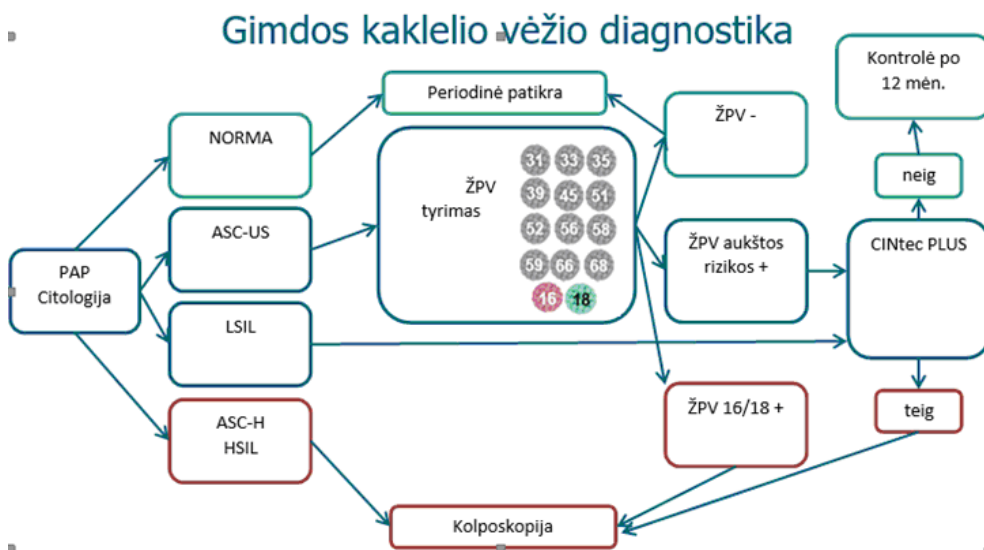
2 pav. Ląstelių pokyčiai sukeltys vėžį.



Adaptuota iš: (http://semmelweis.hu/patologia2/files/2017/11/6_gyak_%C3%81tal%C3%A1nos-daganattan-I.pdf)

Patikimam ikivėžinių gimdos kaklelio būklių nustatymui, ypač neaiškiais atvejais, yra sukurtas ir naudojamas kompleksinis gimdos kaklelio ištyrimo algoritmas [21].

3 pav. Kompleksinis gimdos kaklelio ištyrimo algoritmas.



Adaptuota iš: (<http://patologija.lt/cintec-plus-irankis-gimdos-kaklelio-veziui-diagnozuoti/>)

Atlikus citologinį gimdos kaklelio tyrimą ir nenustačius jokių pakitimų, papildomi tyrimai nėra reikalingi. Pagal periodinės GKV patikros programą kitas citologinis tyrimas yra rekomenduojamas po 3-5 metų [21,30]. Nustačius atipinius plokščiojo epitelio ląstelių pakitimus (ASC-US), yra rekomenduojama atlikti ŽPV aukštos rizikos nustatymo tyrimą, siekiant tiksliai įvertinti šių pakitimų klinikinę reikšmę [21,30]. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad daugelį ASC-US atvejų sukelia būtent ŽPV infekcija. Jeigu yra nustatomas 16 ar 18 ŽPV infekcijos tipas, tai yra indikacija kolposkopinių tyrimų atlikimui, kuriais nustatomi ikivėžiniai pakitimai [21,30].

Nustačius bet kurią kitą ŽPV aukštos rizikos tipą atliekamas Cintec Plus tyrimas. Esant teigiamam tyrimo atsakymui atliekama kolposkopija, o neigiamam, siekiant kontroliuoti pokyčius, citologinis tyrimas kartojamas po 12 mėnesių [21,22].

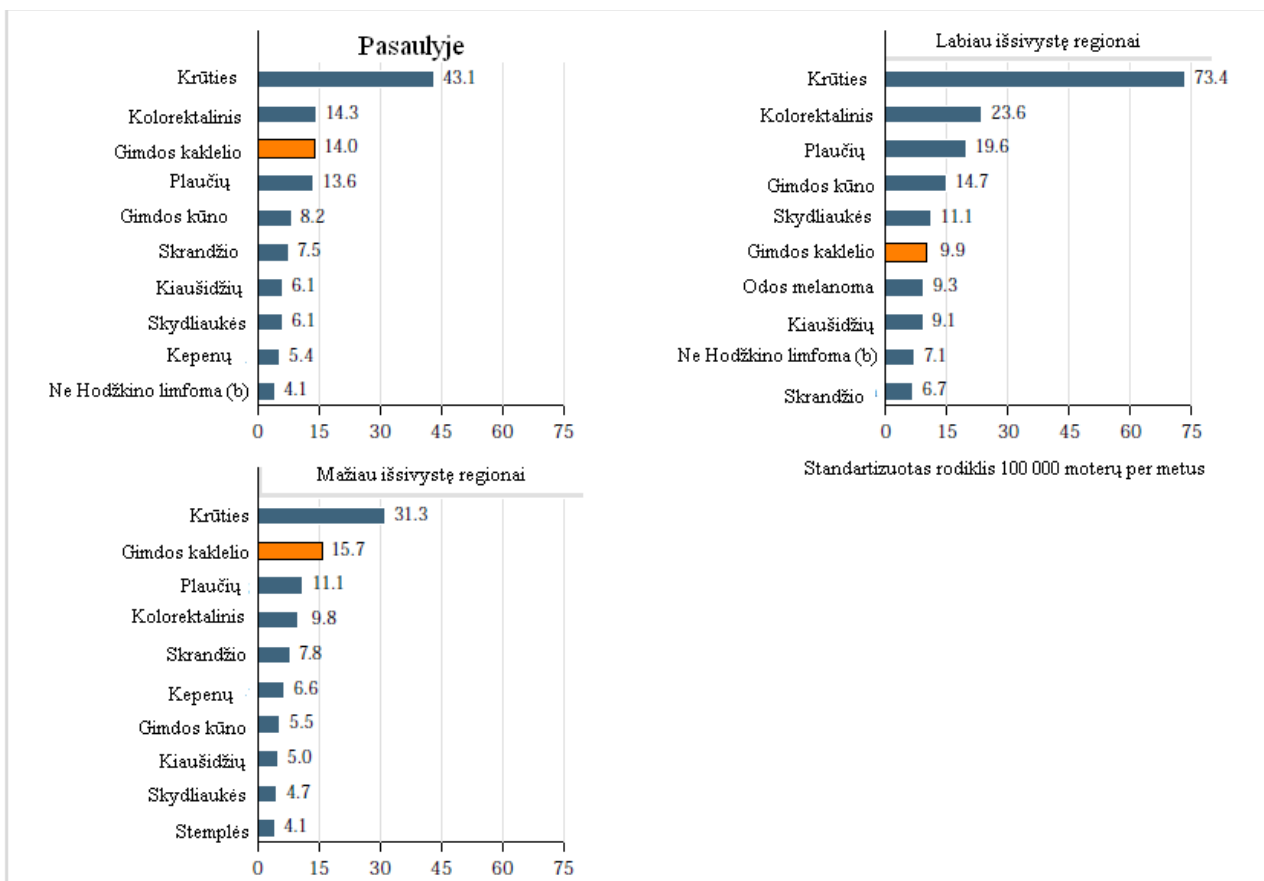
Citologinio tyrimo metu nustačius nežymius intraepitelinius plokščialąstelinis pakitimus (LSIL) iš karto atliekamas Cintec Plus tyrimas. Esant teigiamam ar neigiamam rezultatui, ištyrimo schema tokia pati kaip ASC – US atveju. Citologinio tyrimo metu aptikus atipines plokščiojo epitelio ląsteles (ASC-H) arba žymius plokščialąstelinis intraepitelinius pakitimus (HSIL) – iš karto atliekama kolposkopija [21,22,30].

1.3 Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija

Gimdos kaklelio vėžys yra vyresnio amžiaus moterų liga, tačiau ja serga ir jauno amžiaus, 35 – 50 metų moterys. Ši liga paplitusi visame pasaulyje. Tarp labiausiai paplitusių įvairaus vėžio lokalizacijų, įvairaus amžiaus moterų tarpe, gimdos kaklelio vėžys užima trečiąją vietą (14,0 atv./ 100 000 moterų, per metus), po krūties vėžio (43,1 atv./ 100 000 moterų), kuriuo sergamumas yra didžiausias tarp moterų ir kolorektalinio vėžio (14,3 atv./ 100 000 moterų), užimančio antrąją vietą [15,32]. Palyginus sergamumą gimdos kaklelio vėžiu išsivysčiusiose ir mažiau išsivysčiusiose šalyse, jis atitinkamai užima šestą (9,9 atv./ 100 000 moterų) ir antrą vietą (15,7 atv. 100 000 moterų) [15].

Lyginant atskirų pasaulio žemynų duomenis mažiausias sergamumas yra Okeanijoje, užima septintą vietą pagal dažnumą žemyne (10,2 atv./ 100 000 moterų), o didžiausias sergamumas Afrikos žemyne (27,6 atv./ 100 000 moterų) [15].

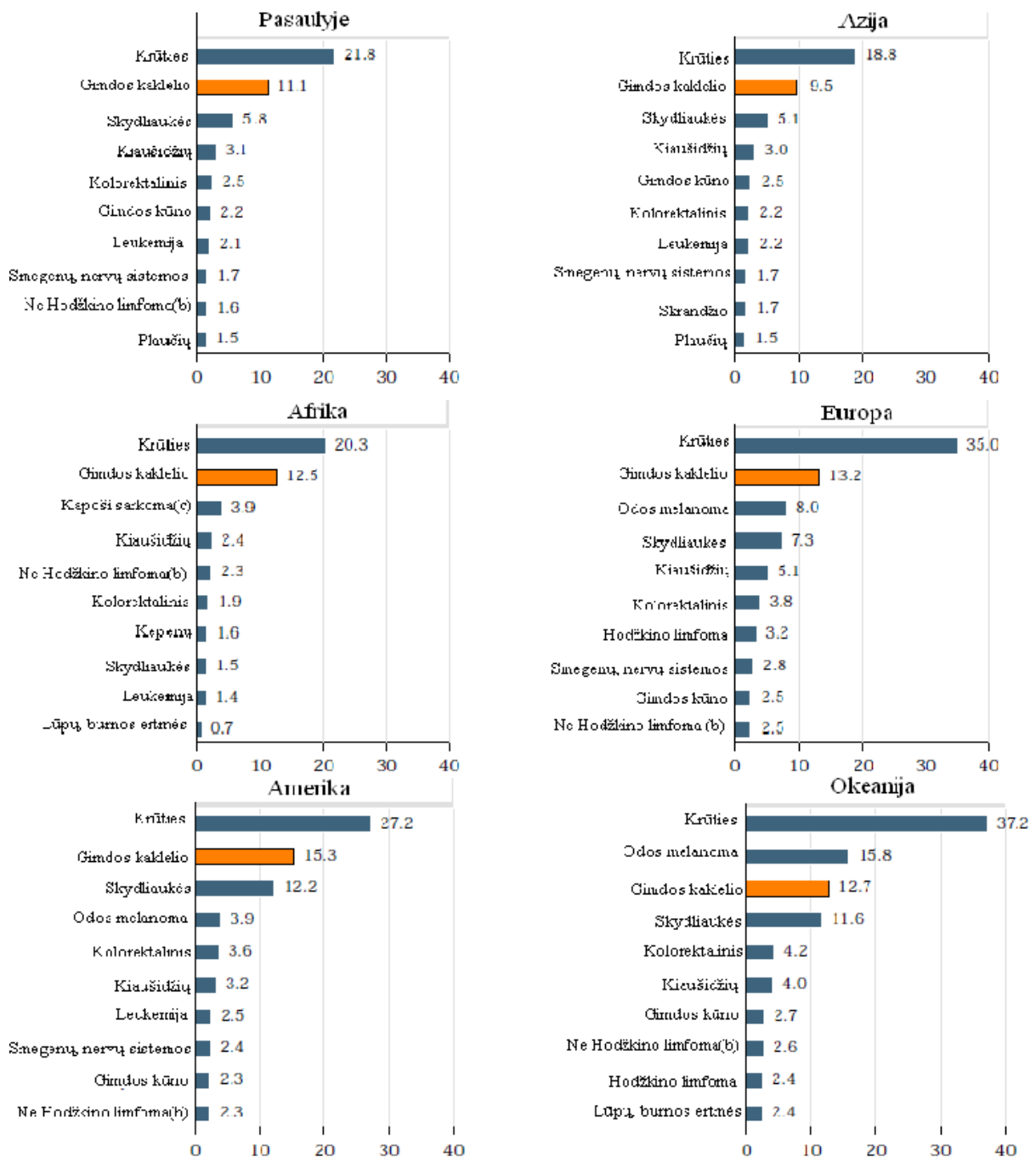
4 pav. Dažniausių vėžio lokalizacijų paplitimo palyginimas tarp moterų pasaulyje, besivystančiose ir išsivysčiusiose šalyse (2012 m).



Adaptuota iš: (Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.).

Vertinant gimdos kaklelio vėžio paplitimą jaunų moterų tarpe, 15 – 44 metų, pasiskirstymas yra šiek tiek kitoks. Pasaulyje, liga užima antrą vietą (11,1 atv./ 100 000 moterų) po krūties vėžio. Lyginant situaciją atskiruose žemynuose, didžiausias sergamumas jaunų moterų tarpe nustatytas Amerikoje (15,3 atv./ 100 000 moterų), o mažiausias Azijoje (9,5 atv./ 100 moterų) [15,33].

5 pav. Dešimties labiausiai paplitusių vėžio lokalizacijų palyginimas tarp moterų pasaulyje ir atskiruose žemynuose (2012 m).



Standartizuotas rodiklis 100 000 moterų per metus

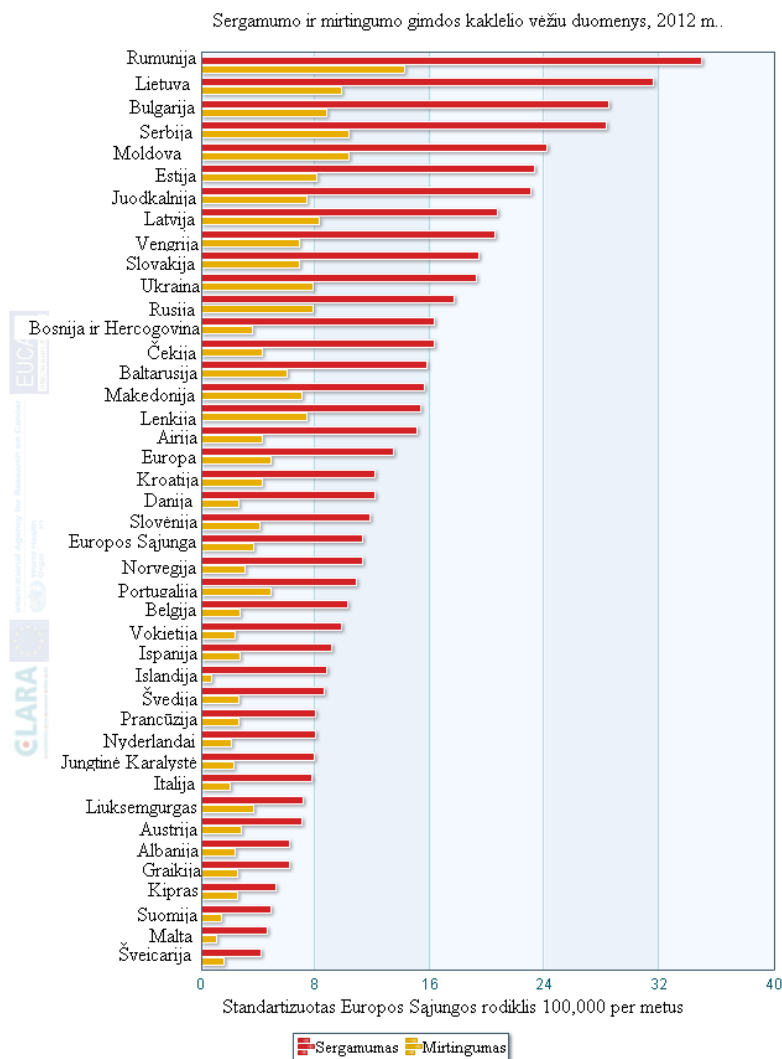
Adaptuota iš: (Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.).

Visoje Europoje gimdos kaklelio vėžys yra opi problema. 2012 m. nuo šios ligos Europos sąjungos šalyse mirė 12,977 moterys. Centrinės ir Rytų Europos šalyse mirtingumas nuo šios ligos yra didesnis lyginant su Vakarų Europos šalimis [9]. 2012 metų duomenimis, vidutiniškai

Europoje užfiksuotas sergamumo gimdos kaklelio vėžiu vidurkis 13,4 atvejų 100 000 moterų. Europos sąjungoje sergamumo vidurkis 11,3 atv./ 100 000 moterų [9,37]. Didžiausias sergamumas ir mirtingumas Rumunijoje, Lietuvoje, Bulgarijoje, Serbijoje, Moldovoje (standartizuotas sergamumo rodiklis nuo 34,9 iki 24,1 atvejų/ 100 000 moterų, mirtingumo rodiklis nuo 14,2 iki 8,8 atv./ 100 000 moterų). Mažiausias sergamumas Šveicarijoje, Maltoje, Suomijoje ir Kipre (standartizuotas sergamumo rodiklis nuo 5,2 iki 4,2 atvejų/ 100 000 moterų). Mažiausias mirtingumas Islandijoje 0,7 atv./ 100 000 moterų [9,33,37].

Lietuvoje sergamumas gimdos kaklelio vėžiu yra vienas didžiausių Europos sąjungoje, antroje vietoje pagal dažnumą, 31,6 atv./ 100 000 moterų, o mirtingumas ketvirtoje vietoje pagal dažnumą 9,8 atv./ 100 000 moterų [37].

6 pav. Europos šalių sergamumo ir mirtingumo nuo gimdos kaklelio vėžio rodikliai (2012 m).



Adaptuota iš: (<https://www.eurocytology.eu/en/course/953>)

1.4 Gimdos kaklelio vėžio rizikos veiksniai

Rizikos veiksniai, arba faktoriai – tai tokie veiksniai, kurie didina riziką susirgti tam tikra liga vieną, kelis ar net keliolika kartų, tačiau jų buvimas nereiškia, kad ši liga tikrai išsivystys [4,9]. Dažniausiai nurodomi gimdos kaklelio rizikos veiksniai yra šie:

Žmogaus papilomos virusas (ŽPV). Vienas svarbiausių rizikos veiksnių, sąlygojančių gimdos kaklelio vėžio išsivystymą – ŽPV infekcija lytiniuose takuose. ~ 99 proc. įvairių gimdos kaklelio vėžio formų atvejų yra susiję su genitaline ŽPV infekcija [4,74]. Su vėžio rizika yra susiję aukštos rizikos ŽPV genotipai, kurių onkogeniškiausi yra ŽPV 16 (sukelia ~ 50 %) esant plokščialąsteliniam gimdos kaklelio vėžiui, ir ŽPV 18 esant gimdos kaklelio adenokarcinomai tipai [25,39]. ŽPV virusas persistuojantis gimdos kaklelio ląstelėse jas infekuoja, viruso DNR replikuoja, patenka į šeimnininko ląsteles ir sutrikdo normalų jų ciklą [25,29].

Rūkymas. Rūkančių moterų tikimybė susirgti gimdos kaklelio vėžiu yra beveik dvigubai didesnė, negu tų, kurios nerūko [4,34,61,84]. Rūkymas didina karcinomos in situ ir plokščialąstelinės karcinomos išsivystymo tikimybę [9,34]. Cigarečių tabake esančios medžiagos, gimdos kaklelio kancerogenezę gali paveikti dviem būdais: pirmasis – cigaretėse esantis tabakas ir jo pagrindinis metabolitas kotoninas, tiesiogiai veikia gimdos kaklelio gleivinių ląstelių DNR [4,34]. Antrasis – organizme rūkant susidaro medžiagų apykaitos produktai: aromatiniai policikliniai angliavandeniai, aromatiniai aminorai, kurie taip pat veikia gimdos kaklelio gleivinę [34]. Kitas svarbus aspektas yra rūkymo ir didžiausią gimdos kaklelio vėžio riziką sukeliančio veiksnio, ŽPV infekcijos, tarpusavio ryšys [1,17,18]. Rūkymas silpnina imuninę sistemą, dėl to organizmui tampa sunkiau kovoti su ŽPV infekcija [4,17]. Rūkančiųjų gimdos kaklelio gleivėse yra matuojami cigarečių sudedamųjų dalių ir jų metabolitų kiekiai [34]. Jie veikia gimdos kaklelio ŽPV infekuotas ląsteles, taip skatindami viruso genomo integraciją į šeimnininko ląsteles ir sukeldami DNR pažeidimus. ŽPV viruso onko baltymai blokuoja ląstelių apoptozę ir sutrikdo jų ciklą [1,17,18,34].

Oraliniai kontraceptikai. Oraliųjų kontraceptikų vartojimas mažiau nei 5 metus, nesukelia rizikos susirgti gimdos kaklelio vėžiu, tačiau vartojant ilgiau nei 5 metus, didėja gimdos kaklelio neoplazijos tikimybė, keturis kartus didėja invazinio vėžio ir tris kartus karcinomos in situ tikimybė [9,17,48]. Tačiau įrodyta, kad nutraukus oraliųjų kontraceptikų vartojimą, per tam tikrą laiką rizika išnyksta [17,24]. Gimdos kaklelio kancerogenezėje kontraceptikai svarbų vaidmenį atlieka esant ŽPV infekcijai [20,84]. Siūlomas mechanizmas paaiškinantis oraliųjų kontraceptikų ir gimdos kaklelio vėžio sąsają. Estrogenai ir progesteronai gali sąveikauti su hormonų receptoriu esančiu gimdos kaklelio audiniuose ir daryti įtaką ŽPV infekcijos eigai [20,82]. Sustiprinama ŽPV E6 ir E7

onkogenų ekspresija, stimuliuojamas navikų slopiklio (p53) genų skilimas ir sustiprinamas viruso DNR gebėjimas transformuoti šeiminingo ląsteles [20,82].

Gretutinės infekcijos ir imunodeficitinės būklės. Gimdos kaklelio vėžio riziką didina ir kai kurios infekcijos, tokios kaip: Chlamydia trachomatis, Herpes Simplex – 2 ar žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV) [9]. Įrodyta, kad Chlamydia trachomatis infekcija, turi įtakos gimdos kaklelio neoplazijai [102]. Infekcija susijusi su uždegimu, kurio metu vykstantys procesai (padidėjusi citokinų, chemokinų gamyba, ląstelių imuniteto susilpnėjimas, laisvųjų radikalų kaupimasis ir kt.) gali sutrikdyti DNR stabilumą [56,102]. Esant Herpes Simplex infekcijai ir ŽIV susilpnėja imunitetas, todėl tai pagerina sąlygas ŽPV persistavimui [9,59,102].

Didelis gimdymų skaičius. Moterys gimdžiusios tris ir daugiau kartų, turi didesnę riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu, nei mažiau kartų gimdžiusios [4]. Manoma, kad priežastis yra imuninės sistemos ir hormoniniai pokyčiai vykstantys moters organizme nėštumo metu [4,6,74].

Socialinė ir ekonominė atskirtis. Mažiau socialiai ir ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse mažiau dėmesio ir lėšų skiriama profilaktinei gimdos kaklelio patikrai [91,92].

Amžius. Didesnę riziką sirgti gimdos kaklelio vėžiu turi vyresnio (apie 40 ir daugiau) amžiaus moterys [92].

Mažas su maistu gaunamų karotinių (vitaminas A), vitaminų C, E ir folatų kiekis. Kai kurių su maistu gaunamų mikroelementų per mažas kiekis didina riziką susirgti gimdos kaklelio vėžiu, o didesnis kiekis riziką sumažina [101].

1.5 Gimdos kaklelio vėžio prevencinė programa

Gimdos kaklelio vėžio patikros programa siekiama sumažinti gimdos kaklelio vėžio ir mirtingumo nuo jo atvejų skaičių, bei kuo anksčiau aptikti ikivėžinius pakitimus ir juos išgydyti [59]. Programos veiksmingumas labai priklauso nuo jos tinkamo organizavimo ir ekonominės padėties šalyje. Siekiant nustatyti svarbiausius organizacinius veiksnius, programos efektyvumą, buvo atlikti tyrimai Europoje. Buvo nustatyta dabartinė būklė organizacijose, programos vykdymo kokybė ir efektyvios patikros programos prognozė ateičiai [94,97,98].

Visame pasaulyje, tame tarpe ir Lietuvoje, vykdoma gimdos kaklelio piktybinių navikų prevencijos programa. Šiuo metu rekomenduojamas standartinis testas gimdos kaklelio vėžio prevencinei programai yra gimdos kaklelio citologija (PAP testas). PAP testą reikėtų pradėti taikyti 20-30 metų moterų amžiaus grupėje. Tačiau rekomenduojama ne anksčiau nei 25 metų ir taikyti iki 60-65 metų amžiaus, priklausomai nuo sergamumo šalyje rodiklių, kitų veiksnių, kas 3-5 metus [6,94,98].

Lietuvoje programa yra vykdoma 25- 60 metų amžiaus moterims, bet ne dažniau kaip kartą per trejus metus [59,60].

Kad prevencinė programa būtų sėkminga, būtina sąlyga yra tinkamas bendravimas su moterimis, jų informavimas apie programą ir kvietimas joje dalyvauti [59,94,95]. Gerai organizuota, kokybiška prevencinė programa turi būti užtikrinta visuose lygmenyse - nuo informacijos suteikimo iki tinkamo gydymo parinkimo [95]. Nors apklausų duomenys rodo, kad vis daugiau moterų yra kviečiamos į vykdomą gimdos kaklelio prevencinę programą ir vis daugiau moterų pasitikrina, tačiau informacijos apie programos tikslus, vykdymą, bei nedalyvavimo joje pasekmes vis dar trūksta [94,95]. Siekiant, kad programa būtų efektyvi, reikėtų patikrinti 80% tikslinės moterų amžiaus grupės (25 – 60 metų), tačiau Nacionalinio vėžio instituto duomenimis Lietuvoje pasitikrina tik ~ 50 % moterų [69,94,95]. Pastaruoju metu daug dėmesio skiriama vakcinacijai nuo žmogaus papilomos viruso, kaip pagrindinei gimdos kaklelio vėžio profilaktikos priemonei [31,97].

Naujos gimdos kaklelio vėžio patikros tendencijos.

Vis dažniau kalbama apie galimybę pradėti taikyti ŽPV DNR tyrimą ir skystų terpių citologiją kaip alternatyvius pirminės patikros metodus [6,7,59,94,97].

Skystų terpių citologija.

- Kokybiškesnis tyrimas, iš kurio galima atlikti tyrimą pakartotinai, todėl skystų terpių citologijos netinkamų vertinti tepinėlių yra mažiau negu paprastų PAP testų;
- Atlikti ląstelių bloką;
- Panaudoti tiriamąją medžiagą molekuliniais tyrimams, pvz: žmogaus papilomos virusui nustatyti [6,31].

ŽPV DNR tyrimas.

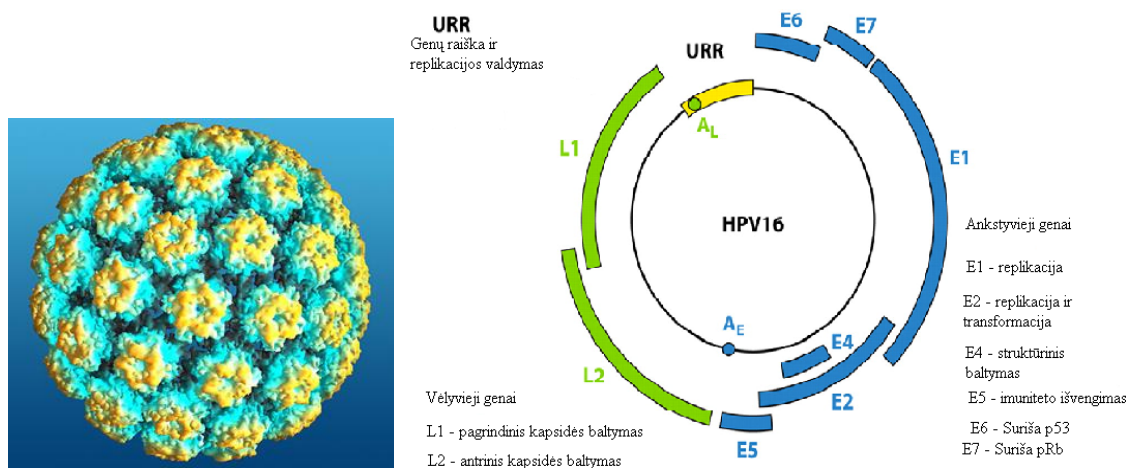
- Dvigubas testas tikslesnei pirminei atrankai: PAP tepinėlis ir ŽPV DNR tyrimas;
- Patikslinamasis, pagalbinis testas, esant neaiškiam ar abejotinam citologiniam tyrimo atsakymui (pvz. ASC-US). Gydymo, po karcinomos in situ rezultatams įvertinti [6,31].

1.6. Žmogaus papilomos virusas

ŽPV - *Papillomaviridae* šeimos virusas, mažas, turintis DNR ir ikosaedrinę kapsidę, neturintis apvalkalėlio [1]. ŽPV DNR yra dvigrandė, žiedo formos, uždara, sudaryta iš apytiksliai

7200-8000 bazių porų, kurių ilgis tarp skirtingų ŽPV genotipų gali nežymiai skirtis. Virusas turi struktūrinius (vėlyvuosius) L1 ir L2 ir funkcinius (ankstyvuosius) E1 – E7 genus. E6 ir E7 genai pasižymi stipriu onkogeniškumu [3,28,43,100].

7 pav. Žmogaus papildomos viruso genomai.



Adaptuota iš: (Margaret A. Stanley. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. Clinical Microbiology Reviews. April 2012).

ŽPV koduoja keletą būtinų baltymų. Struktūriniai L1 ir L2 yra kapsidę, talpinančią dvigrandę DNR, sudarantys baltymai. Pagrindinis kapsidės baltymas L1 [28,100].

E1 – E7 reguliuojamieji baltymai. E1 – būtinas viruso DNR replikacijai ir dalyvaujantis transkripcijoje baltymas. E2 baltymas svarbus viruso transformacijos procese, dalyvauja replikacijoje [38]. E4 – struktūrinis citoplazmos baltymas. Jis svarbus diagnostikai, nes jo aptikimas yra siejamas su ligos pradžia. E5 baltymas svarbus viruso transformacijos ir DNR replikacijos procesuose. Baltymas svarbus ir „imuninės sistemos išvengimo“ procesui, nes leidžia infekuotoms ląstelėms likti neatpažintoms imuninės sistemos [38,43,100].

E6 ir E7 baltymai, vaidina svarbų vaidmenį gimdos kaklelio vėžio kancerogenezėje. Patekę į ląsteles, jie išreguliuoja jų ciklą ir kontrolę [45,66,81]. E6 prisijungia prie p53 baltymo (naviką slopinantis baltymas), vykdo jo proteolizę ir dėl to infekuotos ląstelės gali nekontroliuojamai replikuotis [12,14,100]. E6 ir p53 susijungimas sukelia chromosominį nestabilumą ląstelėje, kuris manoma, yra pagrindinis veiksnys sukeliantis intraepitelinį pokyčių progresavimą ir vėžio išsivystymą [45,66]. E7 paveikia kitą svarbų baltymą pRb (retinoblastomos baltymas, slopinantis ląstelių ciklo progresavimą kol ji nėra pasirengusi dalytis, bei per didelį ląstelių augimą), jį inaktyvuoja, suriša ir dėl to ląstelės praranda ląstelių ciklo reguliavimo kontrolę [45,66,81,100].

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 200 ŽPV tipų iš kurių ~ 40 randami lytinių organų gleivinėje. [12,14]. ŽPV virusų tipai yra skirstomi į atskirus taksonus, kai nukleotidų seka L1 gene skiriasi

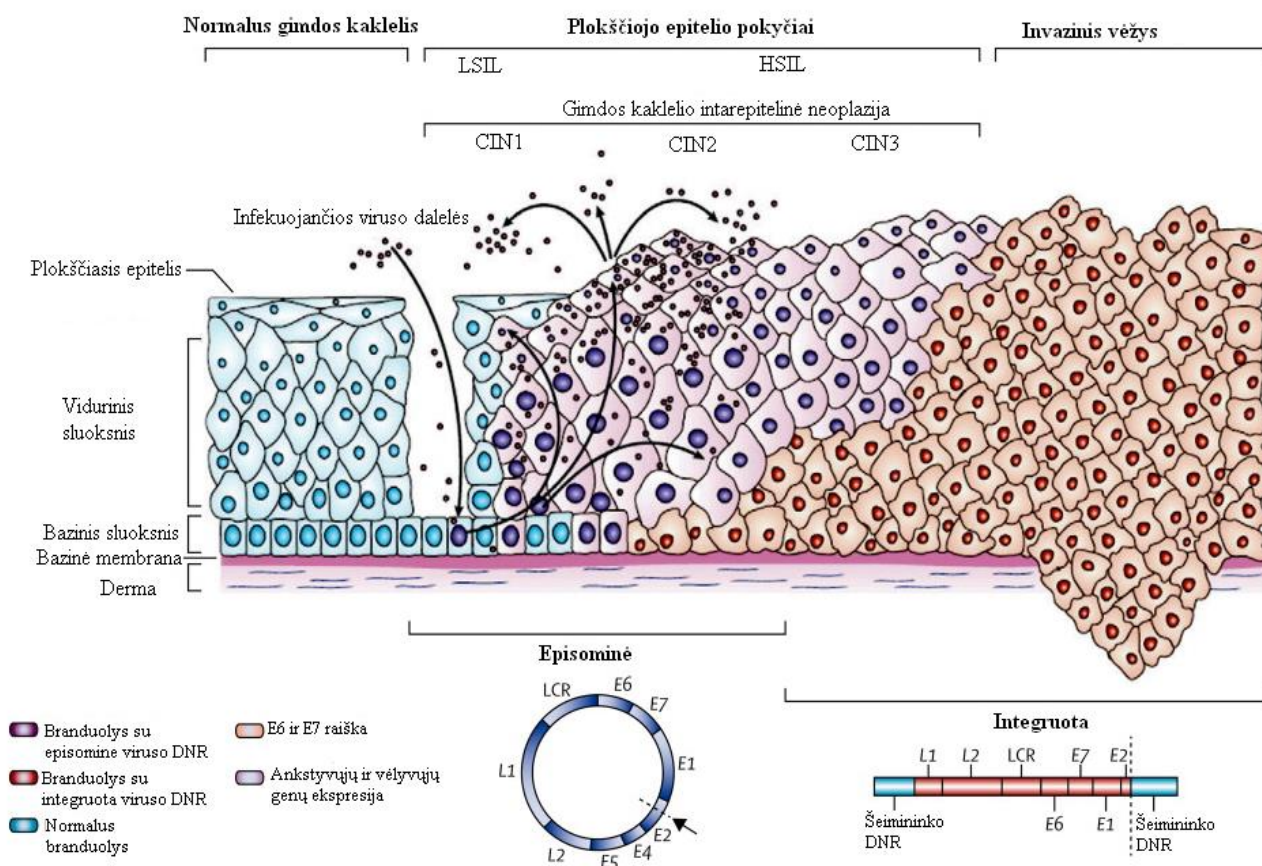
daugiau nei 10% , nuo kito artimiausio tipo. Papildomai ŽPV skirstomi į potipius, kai nukleotidų seka L1 gene skiriasi daugiau nei 2 %, bet mažiau nei 10 %. Tačiau labai nedaug potipių yra aprašyta [16]. Ne visi ŽPV tipai yra onkogeniški ir gali sukelti gimdos kaklelio patologiją. Pagal onkogeniškumą ŽPV tipai yra skirstomi į aukštos vėžio rizikos tipus ir žemos rizikos tipus. Kai kuriuose literatūros šaltiniuose yra išskiriama ir trečia grupė - vidutinės rizikos ŽPV tipai [12,28,100].

- Aukštos rizikos ŽPV tipai - 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 59, 64, 68. Šie tipai dažniausiai randami piktybiniuose gimdos kaklelio navikuose (ypač 16,18,31 ir 45). [3,28].
- Vidutinio onkogeniškumo ŽPV tipai: 31, 33, 35, 51, 52, 58. Virusų tipai, kurie vienodai dažnai randami piktybiniais gimdos kaklelio navikais sergančių ir sveikų moterų gimdos kaklelio gleivinėje [28].
- Žemos rizikos ŽPV tipai: 6, 11, 42, 43, 44. Tipai, kurie retai randami piktybiniuose navikuose. Dažniausiai jie sukelia gerybines, makroskopiškai matomas lytinių takų, ar kitų organų (nosies, burnos ir kt.), papilomas ir odos karpas [28].

1.6.1. ŽPV infekcijos eiga

Esant nepažeistam ir gerai funkcionuojančiam moters imunitetui ŽPV infekcija daugeliu atvejų yra laikina, praeinanti savaime per skirtingą laikotarpį, priklausomai nuo ŽPV tipo [10,28]. Ilgiausiai išsilaiko ŽPV 16 tipas iki 2 metų. Taigi užsikrėtimas ŽPV infekcija dar nereiškia, kad moteris susirgs gimdos kaklelio vėžiu [10]. Virusas ląstelėse gali būti dviejų formų: episominės ir integruotos į ląstelės genomą. [28]. Apie 70 % moterų nuo infekcijos išsivalo per 1 metus, o 90 % per 2 metus. Dalis moterų, apie 10 – 20 %, nuo viruso neišsivalo, jis ilgą laiką persistuoja gimdos kaklelyje, sukelia intraepitelinius pokyčius ir negydomas išsivysto į invazinį gimdos kaklelio vėžį [10,28,44]. Intarepitelinių pokyčių progresavimas iki vėžio trunka 12-15 metų [28,44]. ŽPV virusas infekuoja epitelio paviršines ląsteles, tačiau jų taikinyms yra bazinio sluoksnio ir parabazinės ląstelės, todėl viruso patekimui į gilesnį sluoksnį yra reikalingas paviršinio epitelio mikropažeidimas [10,28,44].

8 pav. ŽPV infekcijos eiga.



Adaptuota iš: (Silvia de Sanjose, Maria Brotons and Miguel Angel Pavon. The natural history of human papillomavirus infection. Elsevier. February 2018, vol. 47.).

ŽPV plitimo būdai. Žmogaus papilomos virusas yra dažniausia lytiniu keliu plintanti infekcija, todėl dažniausias ŽPV perdavimo būdas - lytinių santykių metu (vaginalinių, oraliųjų, analinių) [83]. Tačiau tai nėra vienintelis viruso plitimo būdas. Literatūroje išskiriami du ŽPV perdavimo keliai:

Horizontalusis. Galima užsikrėsti ne tik lytinių santykių, bet ir bet kokio kontakto su užsikrėtusio asmens lyties organais metu. Taigi virusas gali būti perduodamas nuo vieno organų kitiems, nuo burnos gleivinės, ar rankų odos, lytiniams organams [78,83].

Vertikalusis. Šiuo būdu ŽPV infekuota motina gali perduoti virusą vaikui gimdymo metu. Tokiu būdu virusą perduoda apie 5 % užsikrėtusių moterų. Infekuojami naujagimio išoriniai lytiniai organai ar burnos gleivinė. Dažniausiai naujagimiams infekcija praeina savaime [6,78,83].

1.6.2. ŽPV genomo integracija į žmogaus ląsteles ir kancerogenezė

ŽPV žmogaus organizme gali būti episominės arba integruotos formos. Nors daugelyje gimdos kaklelio vėžio atvejų randamas integruotos formos virusas, tačiau nedaugeliu atvejų pakitimus gali sukelti ir episominės formos ŽPV [100]. Tokiais atvejais stebimas episominės viruso formos kopijų padaugėjimas ir onkogenų ekspresijos padidėjimas [100]. Nors tai ne toks efektyvus procesas, tačiau poveikis yra toks pats, kaip ŽPV integracijos: onkogenų raiškos padidėjimas sukelia ląstelių transformaciją [99]. Tyrimais nustatyta, kad žemo laipsnio gimdos kaklelio intraepitelinis pakitimas (CIN1 ir CIN2) sukelia episominę formą, o integruota viruso forma sukelia žymius intraepitelinis pakitimus (CIN3) ir invazyvias karcinomas [28,99]. Įrodyta, kad viruso genomas integruojasi į šeimininko ląsteles dar esant ikivėžiniams pakitimams [4]. Jam integruojantis į šeimininko ląsteles, viruso DNR trūkis dažniausiai įvyksta E1 ir E2 atvirame skaitymo rėmelyje, o viruso promotorius, reguliacinė (LCR) sritis ir E6/E7 genai lieka nepakitę [28]. Pro paviršinį epitelį virusas patenka į bazinį epitelio sluoksnį, kur yra palankios sąlygos dauginimuisi: virusas praranda savo apvalkalėlį (kapsidės baltymus), patenka į ląstelės branduolį, tuomet infekuotoje ląstelėje vyksta viruso DNR replikacija, reikalingų virusui baltymų gamybą ir tolygus pasiskirstymas dukterinėse šeimininko ląstelėse [65,100]. Virusas pasidaugina ląstelėje tūkstančius kartų, jo dalelės iš naujo surenkamos ir virusas atpalaiduojamas į aplinką kartu su atsinaujinančiomis gimdos kaklelio epitelio ląstelėmis [65,100].

ŽPV dauginimosi ciklas yra susijęs su šeimininko ląstelių gyvavimo ciklu [28,100].

Normalus ląstelių augimas, susideda iš kelių fazių, kurios sudaro ląstelės ciklą:

G0 – ramybės fazė. Ląstelė formuojasi, bet nesidalina.

G1 fazė – ląstelės augimas ir jos komponentų dvigubėjimas.

S fazė – ląstelių genomo padvigubėjimas.

G2 fazė – pasiruošimas mitozei, ląstelės augimas ir būtinų baltymų sintezė.

M fazė – mitozės fazė, ląstelė pasidalina į dvi dukterines [21].

Normalus ląstelės ciklas yra sutrikdomas ŽPV E6 ir E7 onkogenų, kurių transkripcijos neblokuoja E2 genas, nes dėl trūkio E2 srityje jis yra nebegaminamas. Jie paveikia ląstelės ciklui svarbius baltymus, reguliuojančius ląstelės dalijimąsi, tokius kaip Rb (retinoblastomos) ir p53 (naviko supresorius) [21,99]. Vienas iš baltymų (p53) reguliuoja apoptozę, tačiau ŽPV sutrikdo p53 baltymo sintezę ir neįvyksta apoptozė. Neesant šio baltymo, gaminasi ląstelės su DNR pažaidomis. Kitas baltymas (Rb) reguliuoja proliferaciją, ląstelės ciklo perėjimą iš G1 į S fazę ir genomo replikaciją. Replikacijai reikalingas retinoblastomos (Rb) baltymo hiperfosforilinimas, kuris vyksta

tik esant tam palankioms sąlygoms. Jeigu fosfolilininimas neįvyksta, ląstelei nesukuriamos sąlygos pereiti iš G1 į S fazę ir ciklas sutrinka [21,99].

Taip pat E6 ir E7 nuolatinis persistavimas ląstelėje sukelia struktūrinius ir kiekybinius chromosomų pokyčius: delecijas, translokacijas, aneuploidijas, tetraploidijas ir kt [77].

1.7. Gimdos kaklelio patologijos tyrimo metodai

1.7.1. Citologiniai metodai

PAP testas. Dažniausiai šiuo metu naudojamas citologinis gimdos kaklelio vėžio atrankinis tyrimas yra PAP testas. Jį 1928 m. atrado graikų kilmės dr. George Nikolas Papanicolaou. Jis pirmasis paimtuose iš makšties tepinėliuose aptiko gimdos kaklelio piktybinio naviko ląstelių [49,87]. Toliau tiriant makšties tepinėlius, 1940 m. Dr. George Nikolas Papanicolaou kartu su ginekologu dr. Herbert Traut, padarė dar daugiau svarbių atradimų. Nustatyta, kad tepinėlio pagalba galima aptikti „slaptą“ vėžį, kuris vizualiai nematomas ir kurio galima neaptikti net atlikus biopsiją [87]. Taigi visų šių atradimų vardan tyrimas buvo pavadintas Papanicolaou (PAP) testu.

Tai paprastas, nesudėtingas tyrimas, skirtas nustatyti ikivėžiniams gimdos kaklelio pakitimams. Prieš imant tepinėlį, tamponėliu nuvalomas gleivių ir paviršinio eksudato perteklius nuo gimdos kaklelio. Tepinėlis imamas mentele (ilgesnis mentelės galas įvedamas į gimdos kaklelio žiotis) arba šluotele (ilgieji šluotelės šereliai įvedami į endocervikalinį kanalą taip, kad šluotelės trumpieji šereliai kontaktuotų su išorine gimdos kaklelio dalimi) [89]. Paimta medžiaga užtepama ant objekcinio stiklelio ir nedelsiant fiksuojamas vienu iš šių metodų: aerozoliniu fiksiatoriumi – purškiamu iš 25-30 cm atstumo (2-3 paspaudimai), palaukiama kol nudžius ar 10-15 min. tepinėlis merkiamas į 96° etilo alkoholį. Tepinėliai siunčiami į laboratoriją, kur dažomi Papanicolaou dažymo metodu. Pap testo jautrumas turi gan didelį diapazoną 30 % - 80 % , kuris buvo nustatytas tyrimais aptinkant aukšto laipsnio pažeidimus [89]. Tepinėlis vertinamas pagal 2001 m. Bethesda sistemos kriterijus: Pap tepinėlio tinkamumo tirti įvertinimas, citologinė išvada/rezultatų interpretacija ir patologo komentarai/ rekomendacijos [11,88].

Skystų terpių citologija. 1996 metai buvo svarbūs PAP testo istorijai. JAV maisto ir vaistų kontrolės tarnyba (FDA) patvirtino naują vienasluoksnį citologinį gimdos

kaklelio tepinėlių – ThinPrep (Hologic, Marlborough, MA) [36,54]. Tai skystos terpės tepinėlis, kai visa šluotelė su tiriamąja medžiaga (gimdos kaklelio epitelinėmis ląstelėmis) patalpinama terpėje su fiksuojančiu PreservCyte (fiksatorius metanolio pagrindu) skysčiu [36]. Taip buvo išspręsta viena iš PAP testo problemų, kuomet didžioji tiriamosios medžiagos dalis nebuvo užtepama ant stiklelio, o išmetama su mentele ar šluotele [4]. Vėliau, 1999 m. FDA patvirtino dar vieną skystosios citologijos testą – SurePath (BD Diagnostics, TriPath, Burlington, NC). Tiriamoji medžiaga, kaip ir ThinPrep testo atveju, patalpinama į transportinę terpę su fiksuojančiu, kuris šioje terpėje yra etanolio pagrindu [36,54]. Laboratorijoje skystųjų terpių konteneriuose gauta tiriamoji medžiaga, procesorių pagalba, paskleidžiama ribotame objekcinio stiklelio plote vienu sluoksniu. Abiem atvejais (ThinPrep ir SurePath) gauti tepinėliai atrodo beveik vienodai, yra plonasluoksniai, suskaidomi eritrocitai, gleivės ir kitos artefaktinės medžiagos, galinčios trukdyti tepinėlio vertinimui, tačiau skiriasi jų paruošimo procesas ir metodika [54]. ThinPrep analizatoriaus veikimas pagrįstas membranine filtravimo technologija naudojant neigiamą ir teigiamą slėgį. Ląstelės pro membranos poras išfiltruojamos (išpurškiamos) ant objekcinio stiklelio ribotos zonos [36,54]. SurePath technologija ląstelės paruošiamos centrifuguojant tiriamąją medžiagą tankio gradientu ir paskleidžiant tiesiogiai, nenaudojant membranų, ant objekcinio stiklelio ribotoje zonoje [36,54].

Iš likusios skystųjų terpių tiriamosios medžiagos galima atlikti ir kitus tyrimus: ląstelių bloką, didesniam ląstelių sukongravimui ir tikslesnei diagnozei, pakartotinai padaryti citologinį tepinėlių, bei molekulinis tyrimus (lytiškai plintančių infekcijų: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae ir kt., taip pat Žmogaus papilomos viruso (ŽPV - DNR)) [36,54,89].

Moksliniais tyrimais buvo palyginti skystųjų terpių citologijos ir paprasti PAP tepinėliai. Vienasluoksniuose citologiniuose tepinėliuose buvo aptikta 7 % - 18 % daugiau nežymių ir žymių plokščialąstelių intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų lyginant su paprastu PAP testu [2,41,72,89]. Taigi skystųjų terpių citologijos tyrimai yra ne tik technologiškai pranašesni už paprastą PAP testą, tačiau turi ir didesnę klinikinę vertę. Skystųjų terpių citologijos tyrimų jautrumas 88 % – 93 %, kuris buvo nustatytas tyrimais, aptinkant aukšto laipsnio pažeidimus [36,54].

1.7.2. Histologiniai metodai

Citologiniai gimdos kaklelio metodai yra atrankiniai, todėl jie neleidžia tiksliai nustatyti galutinės diagnozės. Tam atliekami histologiniai tyrimai, histologiškai tiriamas gimdos

kaklelio audinys [63]. Dažniausia indikacija histologiniam gimdos kaklelio tyrimui yra nustatyti pakitimai citologinio tyrimu metu. Radus pakitimus moteris yra siunčiama atlikti kolposkopiją [63]. Kolposkopija – tai instrumentinė gimdos kaklelio apžiūra naudojant optinį vaizdą didinantį prietaisą, kolposkopą [63,86].

Procedūros eiga:

- nuo gimdos kaklelio nuvalomos gleivės;
- gimdos kaklelis apžiūrimas naudojant kolposkopą mažiausiu padidiniu;
- vizualiai gimdos kaklelis yra padalijamas į 4 kvadrantus, kurie numeruojami pagal laikrodžio rodyklę, pradedant nuo I (tarp 12 – 15 val), II (15 – 18 val), III (18 – 21 val) ir IV (21 – 24 val) [86];
- gimdos kaklelio paviršius suvilgomas 3 % – 5 % acto rūgštimi ir gerai apžiūrimas visas gimdos kaklelis (kiekvienas kvadrantas);
- vertinami kaklelio epitelio pokyčių ribos, paviršius, spalva, kraujagyslių ypatumai [86];

Kolposkopijos metu, įvertinus gimdos kaklelio pakitimus, galima atlikti tikslią biopsiją arba konizaciją [86].

Biopsija gali būti tikslinga, kuomet kolposkopu kontroliuojant vaizdą, paimamas gimdos kaklelio audinio gabalėlis iš tam tikros vietos, kurioje buvo vizualiai matomi pakitimai arba pasirinktos, įtartinos vietos.

Konizacija – tai procedūra, kurios metu išpjaunami pakitę gimdos kaklelio audiniai, stengiantis maksimaliai pašalinti pakitimus ir išsaugoti sveikų audinių ribas.

1.7.3. Molekuliniai metodai

Dažniausiai naudojamas molekulinis metodas, gimdos kaklelio patologijai, diagnozuoti yra tikslinės amplifikacijos metodas – polimerazės grandininė reakcija (PGR), kurio tikslas – nukleorūgščių padauginimas tiriamojoje medžiagoje [68]. PGR reakcija galima nustatyti pagrindinio gimdos kaklelio patologijos sukėlėjo, žmogaus papilomos viruso, didelės ir mažos rizikos genotipus [68,85].

PGR reakcija atliekama cikliška kaitaliojant reakcijos mišinio temperatūrą [27]. Vienos PGR reakcijos metu vykdoma 40 ciklų, iš kurių po kiekvieno ciklo iš vienos DNR molekulės susintetinamos dvi kopijos. Taigi po n ciklų susidaro 2^n DNR kopijų [27]. Kiekvienas

ciklas susideda iš trijų, vienas paskui kitą sekančių etapų: denatūracijos, pradmenų prilydymo (hibridizacijos) ir polimerizacijos (pradmenų prailginimo) [52].

Denatūracija. Dvigrandė DNR denatūruojama naudojant 94-96°C temperatūrą (nutraukiamos vandenilinės jungtys tarp dvigrandės DNR grandinių), kad būtų galima prie viengrandės DNR prijungti pradmenis. Pradinė denatūracija vykdoma 3 – 5 min., kad būtų pilnai denatūruota taikinio DNR, kituose cikluose pakanka 30 – 45 sekundžių [27,52,75].

Pradmenų prilydymas (hibridizacija). Mažinant temperatūrą iki 55–60°C vykdomas pradmenų prilydymas. Pradmenys komplementariai prisijungia prie taikinio DNR susidarant vandenilinėms jungtims tarp pradmenų ir taikinio DNR bazių [27,75]. Šis etapas priklauso nuo teisingo pradmenų sekos ir temperatūros parinkimo. Žemesnėje temperatūroje pradmenys gali jungtis ne visiškai komplementariai, todėl sumažėja reakcijos jautrumas ir specifiskumas [27,75]. Reakcijos vienam ampikonui padauginti reikalinga pradmenų pora: „tiesioginis“ pradmuo – apatinės krypties pradmuo ir „grįžtamasis“ pradmuo – viršutinės krypties [52,75].

DNR polimerizacija. Šiame etape, didinant temperatūrą iki 72°C, vykdoma amplifikuojamos DNR sintezė, naudojant fermentą – DNR polimerazę (dažniausiai naudojamos termofilinės Taq polimerazės) [52,75]. Šis fermentas išlieka stabilus visuose reakcijos cikluose keičiantis temperatūrai. Polimerizacija su fermentu vykdoma ~ 1 min., o paskutiniame reakcijos cikle polimerizacijos laikas pailginamas maždaug tris kartus, kad būtų pilnai užbaigtas didelis DNR kopijų skaičius, nes pradmenų lieka mažiau [52,75].

Tyrimas atliekamas analizatoriais vadinamais termocikleriais, kurių yra skirtingų gamintojų ir įvairių rūšių [52].

Tikro laiko PGR.

Tikro (realaus) laiko (TL) PGR metodas yra laikomas kiekybiniu, nes parodo kurio ciklo metu susidarė produktas (tam tikras jo kiekis). Kiekvieno reakcijos ciklo metu matuojama fluorescencija, kuri proporcinga susintetintos DNR kiekiui [68,85]. Tikro laiko – PGR metodu matuojant susidariusio produkto kiekį atitinkančią fluorescenciją, pirmus ~ 15 ciklų fluorescencijos lygis nekinta, nes PGR produktų kiekis dar yra per mažas, kad būtų galima nustatyti [68,85]. Ciklų skaičius, iki kurio fluorescencijos lygis nekinta (slenkstinė riba), gali keistis priklausomai nuo sukėlėjo DNR kopijų skaičiaus (kuo daugiau kopijų, tuo ciklų skaičius mažesnis) [68,85]. Eksponentiškai didėjant PGR produktų kiekiui, fluorescencija pasiekia slenkstinę ribą (*angl.* threshold) ir pradeda eksponentiškai didėti. Vėliau, reakcijos eigoje, PGR efektyvumas mažėja, pasiekia pereinamąją fazę, ir galiausiai „plato“ fazę, kuomet PGR produkto kiekis beveik nekinta [52,68,85].

1.7.4. Imunohistocheminiai metodai

Svarbiausi imunohistocheminiai tyrimai gimdos kaklelio patologijos diagnostikoje: Ki-67 ir p16.

Ki-67 – proliferacinis žymuo, žinomas kaip navikų vystymosi prognostinis veiksnys [5]. Tai branduolio antigenas, kuris ekspresuojamas visose ląstelės ciklo fazėse (G1, S, G2, M) išskyrus G0 [5,73]. Ki-67 leidžia atskirti atrofinį epitelį nuo displazinio, o imunohistocheminės reakcijos intensyvumas tiesiogiai siejamas su displazijos laipsniu [5,73].

P16 – nuo ciklino priklausančios kinazės inhibitorius. Jis svarbus ląstelės ciklo reguliavime – sulėtina ląstelių ciklo perėjimą iš G1 į S fazę [58]. Imunohistocheminės reakcijos intensyvumas susijęs su displazijos laipsniu, taip pat žymuo naudojamas integruotos žmogaus papilomos viruso formai nuo episominės formos atskirti [58].

1.7.5. Imunocitocheminis metodas

Cintec Plus – tai imunocitocheminis tyrimas, kuris paremtas apoptozės (p16) ir proliferacijos (Ki-67) žymenų nustatymu toje pačioje ląstelėje ir aiškiai parodo persistuojančios ŽPV infekcijos buvimą [22]. Esant normaliam ląstelės gyvavimo ciklui, joje vienu metu vyksta tik vienas iš reiškinų: apoptozė (savaimė užprogramuota ląstelės mirtis) arba proliferacija (augimas, dauginimasis). Sutrikus ląstelės ciklui šie procesai tampa nekontroliuojami, pradeda vykti vienu metu ir ląstelės ciklas sutrinka [22,46]. Cintec Plus tyrimo metu nustatčius abu biologinius žymenis (p16 ir Ki-67) toje pačioje ląstelėje, vertiname reakciją kaip teigiamą, ir tai parodo, kad ląstelėje yra įvykusi onkogeninė transformacija. Žmogaus papilomos virusas integravęsis į gimdo kaklelio ląsteles ir sukėlęs jų supiktybėjimą [22,46].

Šis tyrimas naudojamas kaip pagalbinis tyrimas moterims, kurioms periodinės patikros metu nustatomi aukšto laipsnio intraepiteliniai pakitimai, kurių PAP citologijos rezultatas yra ASC-US (nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės) ir LSIL (nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai), bei moterims, kurioms nustatytas didelės rizikos ŽPV infekcijos bent vienas tipas [22,46]. Tyrimo rezultatai suteikia galimybę pamatyti, ar yra reikalinga kolposkopija, gali būti greičiau patvirtinta diagnozė ir paskirtas gydymas [22].

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

2.1. Tyrimo medžiaga

2.1.1 Tiriamoji medžiaga, metodai ir tiriamieji

Mokslo tiriamasis darbas buvo atliekamas UAB „Patologijos diagnostika“ nuo 2015 m. balandžio mėn. iki 2015 m. lapkričio mėn.

Tiriamoji medžiaga – vaginalinės nuograndos paimtos į skystąją ThinPrep terpę.

Iš surinktų mėginių, buvo atlikti trys tyrimai: ThinPrep PAP skystosios terpės, ŽPV DNR ir Cintec Plus.

Tyrimo metu, buvo ištirtos 192 įvairaus amžiaus, nuo 23 iki 79 metų pacientės, kurios kreipėsi į ginekologus, turėdamos nusiskundimų, su gimdos kaklelio patologija susijusių simptomų, ar pakartotinai besitikrinančios pacientės, kurioms anksčiau buvo nustatyti įvairaus laipsnio intraepiteliniai gimdos kaklelio pakitimai.

2.2. Tyrimo metodika

2.2.1 Tiriamosios medžiagos paėmimas gimdos kaklelio tyrimams į skystąją ThinPrep terpę

Tiriamoji medžiaga imama naudojant šluotelę.

- ilgieji šluotelės šereliai įvedami į endocervikalinį kanalą taip, kad šluotelės trumpieji šereliai liestų išorinę gimdos kaklelio dalį, o ilgieji – transformacijos zoną ir endocervikalinį kanalą.
- šluotelė švelniai prispaudžiama ir sukama 3-5 pilnus apsisukimus laikrodžio rodyklės kryptimi.
- šluotelė su tiriamąja medžiaga plaunama ThinPrep[®] PAP transportinėje terpėje. Apie 10 kartų atremiant į terpės transportinio indelio dugną;
- šluotelė stipriai paspaudžiama, pasukama, kad paimtos ląstelės gerai nusiplautų nuo šluotelės;
- pabaigus plovimą panaudota šluotelė išmetama.

9 pav. Tiriamosios medžiagos paėmimas ThinPrep PAP tyrimui.



Adaptuota iš: (citopatologijos procedūrų vadovas, UAB „Patologijos diagnostika“)

Nuplovus tiriamąją medžiagą į terpę ji sandariai uždaroma, užrašoma pacientės informacija (vardas, pavardė) ir pristatoma į laboratoriją.

2.2.2 Analizatoriai ir jų veikimo principai

ThinPrep skystosios terpės tyrimas atliekamas „ThinPrep 2000“ analizatoriumi. Tai automatizuotas citologinių preparatų iš skystų ThinPrep terpių paruošimo įrenginys. Prieš įdedant mėginį į analizatorių terpė yra švelniai supurtoma purtykle (*angl.* vortex), kad atsiskirtų skirtingi tiriamosios medžiagos elementai (gleivės, kraujas, ląstelės ir kt.). Į analizatorių įdedama terpė su tiriamąja medžiaga, į stiklelių laikiklį įstatomas specialus, tyrimui skirtas objektinis stiklelis [54,93].

Analizatoriaus filtro pagalba atlieka tris pagrindinius etapus: 1. Pirmiausia filtro rotacija, transportinėje terpėje su tiriamąja medžiaga, sukuria srovę, kuri suskaido kraują, atskiria gleives ir įvairias nuosėdas, po to mėginį švelniai sumaišo išsaugodama ląstelių morfologiją [54,93]. 2. ThinPrep analizatoriaus programinės įrangos pagalba, sukuriama neigiamo slėgio impulsai, kuriais filtras įsiurbia iš terpės skystį, su jame esančia tiriamąja medžiaga, ir paskirsto ląsteles ant filtro membranos išorinio paviršiaus. Įsiurbimo metu analizatorius fiksuoja ar filtras įsiurbia reikiamą medžiagos kiekį, kad būtų paruoštas tinkamas preparatas [54,93]. 3. Surinkus ląsteles ant filtro membranos paviršiaus, filtras apverčiamas į stiklelio pusę ir švelniai prie jo prispaudžiamas. (10 pav.).

Sukuriama teigiamo slėgio impulsai ir iš filtro tiriamoji medžiaga plonu, vienu sluoksniu yra išpurškama ant objektyvio stiklelio. Ant stiklelio yra pažymėta zona, kurios diametras atitinka filtro skersmenį ir ląstelės tolygiai pasiskirsto toje zonoje [54,93].

10 pav. ThinPrep PAP analizatorius ir jo veikimo principas.



Adaptuota iš: (Randall K. Gibb, Mark G. Martens. The Impact of Liquid-Based Cytology in Decreasing the Incidence of Cervical Cancer. Reviews in obstetrics & gynecology, vol. 4 suppl. 1 2011.).

Stiklelis įmerkiamas į 25 ° etilo alkoholi (fiksuotis). Po to preparatas dažomas Papanicolaou būdu [93].

ThinPrep PAP - PAPANICOLAOU DAŽYMO METODAS

Naudojami reagentai:

Ksilenas	CAS Nr. 1330-20-7
Izopropilo alkoholis	CAS Nr.67-63--096%
Etilo alkoholis	CAS.Nr.64-67--5
ThinPrep Nuklear Stain	Netaikomas
ThinPrep Rinse Solution	Netaikomas
ThinPrep Bluing Solution	Netaikomas
ThinPrep Orange G Solution	Netaikomas
ThinPrep EA Solution	Netaikomas

Dažymas atliekamas automatinio stiklelių dažymo aparatu Sakura Tissue Tek Prisma, pagal Papanicolaou dažymo metodą:

3 lentelė. ThinPrep PAP dažymo protokolas (Papanicolau metodas).

Žingsniai	Pozicijos aparate	Reagentai	Laikas	-----	-----
1	S	70% Etilo alkoholis		-----	-----
2	23	50% Etilo alkoholis	01:00	**	on
3	22	Distiliuotas vanduo	01:00	**	on
4	21	ThinPrep Nuklear Stain (Hematoksilinas)	02:00	==	on

5	29	Distiliuotas vanduo	00:10	==	on
6	20	ThinPrep Rinse Solution	00:30	==	on
7	12	Distiliuotas vanduo	00:30	==	on
8	13	ThinPrep Bluing Solution	00:30	==	on
9	14	Distiliuotas vanduo	00:30	**	on
10	15	50% Etilo alkoholis	00:30	**	on
11	7	95% Etilo alkoholis	00:30	**	on
12	6	ThinPrep Orange G Solution	02:00	==	on
13	5	95% Etilo alkoholis	00:15	==	on
14	4	95% Etilo alkoholis	00:15	==	on
15	3	ThinPrep EA Solution	04:00	==	on
16	2	95% Etilo alkoholis	01:00	==	on
17	1	95% Etilo alkoholis	01:00	==	on
18	9	Izopropilo alkoholis	00:30	**	on
19	10	Izopropilo alkoholis	00:30	**	on
20	11	Izopropilo alkoholis	00:30	**	on
21	19	Ksilenas	01:00	**	on
22	18	Ksilenas	03:00	**	on
23	F	Ksilenas		-----	-----

Nudažyti tepinėliai dengiami automatiniu dengimo aparatu Sakura Tissue-Tek Film, kaip dengiamoji medžiaga naudojamas ksilolas ir Tissue-Tek Coverslipping Film dengiamoji juosta.

Žmogaus papilomos viruso DNR nustatymas (ŽPV) atliekamas **Cobas 4800** sistema. Tai pilnai automatizuotas kokybinis in vitro tyrimas skirtas aptikti žmogaus papilomos virusą klinikiniuose pacientų mėginiuose. Tyrimas atliekamas naudojant polimerazės grandinės reakciją ir nukleorūgščių hibridizaciją 14 ŽPV genotipų nustatyti. Cobas 4800 ŽPV testo pagrindinio mišinio reagentė yra pradmenų porų ir zondų, būdingų 14 didelės rizikos ŽPV tipų ir β globino DNR. Naudojami pradmenų (maždaug 200 nukleotidų), esančių ŽPV genomo polimorfiniame L1 regione, seka [23,79]. Amplifikuota DNR (amplifikacijos produktas) aptinkama šiluminio ciklo metu naudojant oligonukleotido zondus, kurie prijungia polimorfinius regionus, esančius šių pradmenų apibrėžiamoje sekoje, pažymėtus keturiais skirtingais fluorescenciniais dažais, kurių kiekvienas fiksuojamas skirtingo bangos ilgio. Amplifikuotas dvylikos didelės rizikos ŽPV tipų (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ir 68) signalas aptinkamas naudojant tuos pačius fluorescencinius dažus, o

ŽPV16, ŽPV18 ir β globino signalai aptinkami naudojant skirtingus kiekvienam tipui ir kontrolei (β globinui) skirtus fluorescencinius dažus [23,79]. Dėl to galima atskirai išmatuoti ŽPV 16, ŽPV 18 ir kitus aukštos rizikos amplifikacijos produktus (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), taip pat β globino kontrolę. Tiriami tik gimdos kaklelio ląstelių mėginiai, surinkti cobas® PGR ląstelių rinkimo terpėje („Roche Molecular Systems, Inc.“), PreservCyt® tirpale („Hologic Corp.“) ir SurePath® konservantiniame skystyje („BD Diagnostics-TriPath“) [23,79,80].

11 pav. Cobas 4800 sistema ir Cobas Z 480 termocikleris.



Adaptuota iš: (<https://www.rochemicrobiologytests.com/cobas-4800-system/system-workflow.html>)

ŽPV tyrimą Cobas 4800 sistema sudaro du etapai:

1. Pilnai automatizuotas ŽPV ir ląstelių DNR išskyrimas iš klinikinių mėginių naudojant magnetines stiklo daleles atliekamas Cobas x 480 analizatoriumi [79,80].
2. Tiriamų DNR sekų PGR amplifikacija naudojant ŽPV ir β – globinui būdingas papildomas pradmenų poras ir realiojo laiko suskaidytų, fluorescenciškai žymėtų ŽPV ir β - globinui būdingų oligonukleotidų, zondų aptikimą [79,80].

Naudojami reagentai:

1. Wash Buffer (WB);
2. Elution Buffer (EB);
3. Magnetical Glass Particles (MGP);
4. Lysis (LYS);
5. SDS;

6. ŽPV kontrolių rinkinys (POS/NEG);

7. ŽPV gausinimo/aptikimo reagentai (AMP/MMX) [23];

1. I tyrimo etapas: Mėginių paruošimas.

Mėginių paruošimas Cobas 4800 ŽPV tyrimui atliekamas pilnai automatizuotu Cobas x 480 analizatoriumi. Mėginiai iš ThinPrep terpės asimiliuojami sudarant denatūravimo sąlygas ir aukštą temperatūrą. Po to lizuojami chaotropiniu reagentu [23,79,80]. Išskirtos ŽPV nukleorūgštys (kartu su β – globino DNR) išgryninamos absorbuojant jas magnetinio stiklo dalelėmis. Toliau jos išplaunamos, atskiriamos nuo magnetinių dalelių ir tokios nukleorūgštys yra tinkamos atlikti PGR amplifikacijai ir aptikimui [23,79,80].

2. II tyrimo etapas: PGR amplifikacija ir aptikimas.

Amplifikacija ir aptikimas atliekamas Cozas z 480 termocikleriu.

Amplifikacija.

EagleZ05 DNR polimerazė, chemiškai modifikuota *Thermus species* Z05 DNR polimerazė, naudojama „greitajai“ ŽPV tiriamų objektų amplifikacijai ir β – globino kontrolei [23,79,80]. Pirma, norint suaktyvinti polimerazę, denatūruoti virusinę ir genomine DNR, bei pamatyti jų pradmenų sekas, PGR tirpalas yra kaitinamas. Mažėjant tirpalo temperatūrai viršutinės ir apatinės krypties pradmenys prisijungia prie atitinkamų DNR sekų. EagleZ05 DNR polimerazė, dalyvaujant divalenciam metalo jonui ir esant pertekliniam dNTP, išplečia pradmenis, ir sintezuojama antra DNR grandinė [23,79,80]. Šis procesas baigia pirmą PGR ciklą, sukuriama atitinkamo ŽPV geno regiono dvigrandė DNR kopija ir β - globino genas. Polimerazė išplečia prisijungusius pradmenis pagal atitinkamą šabloną. Pagaminamos apie 200 pagrindinių porų dvigrandė ŽPV DNR ir 330 pagrindinių porų β – globino molekulės – tai amplifikacijos produktai [23,79,80]. Procesas kartojamas keletą ciklų o kiekviename cikle padvigubinamas amplifikacijos produkto DNR kiekis. Amplifikacija vyksta tik ŽPV geno ir (arba) β globino geno regione tarp tinkamos pradmenų poros. Amplifikuojamas ne visas genomus [23,79,80].

Automatinis aptikimas realiuoju laiku.

Cobas® 4800 ŽPV teste naudojama realiojo laiko PGR technologija. Kiekvienas reakcijos oligonukleotido zondas yra pažymėtas fluorescenciniais dažais, kurie yra kaip signalas, ir slopikliu, slopinančiu fluorescencinę nepažeisto zondo dažų emisiją [23,79,80]. Vykstant

amplifikacijai, amplifikacijos produktą papildantys zondai prisijungia konkrečias vienos grandinės DNR sekas ir yra suskaidomi dėl EagleZ05 DNR polimerazės 5'–3' nukleazės veiklos. Kai dėl šios nukleazės veiklos signaliniai dažai atsiskiria nuo slopiklio, sužadinti atitinkamo spektro šviesos jie išspinduliuoja būdingo bangos ilgio fluorescencinį signalą, kuris fiksuojamas realiuoju laiku [23,79,80]. Dėl skirtingiems dažams būdingo skirtingo bangos ilgio, atskirai išmatuojami 12 ŽPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ir 68) aukštos rizikos genotipų, ŽPV 16, ŽPV 18 ir β globino kontrolės amplifikacijos produktai [23,79,80].

Cintec Plus imunocitocheminis tyrimas atliekamas **Ventana BenchMark GX** analizatoriumi.

12 pav. Ventana BenchMarl GX analizatorius.



Adaptuota iš: (<http://www.ventana.com/product/page?view=benchmarkgx>)

Tyrimas skirtas kartu vienu metu imunocitochemiškai aptikti p16^{INK4a} ir Ki – 67 baltymus citologiniuose gimdos kaklelio mėginiuose. Baltymai aptinkami su paruoštu naudoti pirminių monokloninių antikūnų mišiniu [22]:

- monokloninis pelės antikūnas prieš žmogaus p16^{INK4a} baltymą (E6H4 klonas);
- pirminis rekombinantinis triušio antikūnas prieš žmogaus Ki – 67 baltymą (274 – 11AC3 klonas).

Po ląstelių kondicionavimo, endogeninės peroksidazės aktyvumo slopinimo ir inkubavimo su pirminių antikūnų mišiniu, naudojamos dvi, jau paruoštos, skirtos gimdos kaklelio mėginiams, detektavimo sistemos [22,96]:

- Ožkos anti – pelės antrinis antikūnas, kovalentiškai sujungtas su HQ haptenuis (patentuotas haptenas, kovalentiškai prijungtas prie ožkos antikūno) ir tretinis anti – HQ hapteno antikūnas, sujungtas su krienų peroksidaze (HRP), kurie skirti monokloniniams E6H4 klonu pelės antikūnams aptikti;
- Ožkos anti – triušio antrinis antikūnas, kovalentiškai sujungtas su NP haptenuis (patentuotas haptenas, kovalentiškai prijungtas prie ožkos antikūno) ir tretinis anti – NP hapteno antikūnas, sujungtas su šarmine fosfataze (AP), kurie skirti rekombinantiniams 274 – 11 AC3 klonu antikūnams aptikti [96].

Chromogeninės (spalvinės) reakcijos vyksta krienų peroksidazei sužadinus (aktyvavus) 3,3 – diaminobenzidino tetrahydrochlorido (rudos spalvos chromogenas, DAB) ir šarminės fosfatazės atliekamai Fast Red (raudonos spalvos chromogenas) konversijai su naftolio fosfatu. Šių reakcijų metu, atitinkamai susidaro rudos nuosėdos p16^{INK4a} antigeno srityje ir raudonos spalvos nuosėdos Ki – 67 antigeno srityje [22,96]. Toliau vykdomas kontrastinis dažymas (hematoksilino dažų), melsvinimas (melsvinimo „Bluing“ reagentu) ir dvigubas pjūvio įtvirtinimas vandenine terpe bei polistioliu ir dengiamuoju stikleliu.

Naudojami reagentai:

Reakcijai naudojami gamintojo paruošti Cintec Plus citologinis rinkinys ir papildomi reagentai. Rinkinį sudaro dešimt, 10 ml dozatoriuose, pilnai paruoštų naudoti reagentų.

Rinkinys (100 testų):

1. Cintec Plus primary Antibody Cocktail (p16/Ki67). Pirminių antikūnų kokteilis iš monokloninių E6H4 klonu pelės antikūnų ir 274 – 11 AC3 klonu triušio antikūnų.
2. Cintec Plus Red anti – Rabbit NP Linker. NP žymėti ožkos anti – triušio IgG.
3. Cintec Plus Red AR Multimer. Reagentas, kuriame yra šarminės fosfatazės multimeras – pelės monokloninių anti – NP tretinių antikūnų, žymėtų šarmine fosfataze.
4. Cintec Plus Red Naphthol Phosphate. Reagentas, kuriame yra naftolio fosfato (< 1 %).
5. Cintec Plus Fast Red. Reagentas, kuriame yra Fast Red chromogenas (< 1 %).
6. Cintec Plus DAB. Peroksidazės slopiklio vandenilio peroksido tirpalas (< 5 %).
7. Cintec Plus DAB anti – Mouse HQ Linker. HQ žymėtų ožkos anti – pelės IgG.
8. Cintec Plus DAB HRP Multimer. Reagentas, kuriame yra krienų peroksidazės multimeras – pelės monokloninių anti – HQ tretinių antikūnų, žymėtų krienų peroksidaze.
9. Cintec Plus DAB. 3,3 – diaminobenzidino tetrahydrochloridas (< 1 %) stabilizuojančiame tirpale su konservantu.
10. Cintec Plus DAB H₂O₂. Vandenilio peroksidas (< 1 %) fosfatiniame buferiniame tirpale.

Papildomi reagentai:

Reakcijos buferio koncentratas (10X)

Ląstelių kondicionavimo tirpalas (CC1)

Dengiamasis skystis (LCS)

CC/Mount vandeninė įtvirtinimo terpė

2.2.3. Rezultatų interpretacija

Papanicolaou dažymo rezultatų vertinimo parametrai.

1. Ląstelių citoplazma (EA):

- a) Plokščiojo epitelio paviršinių ir tarpinių sluoksnių ląstelių citoplazma-skaisčios rožinės arba žalios spalvos.
- b) Liaukinio epitelio ląstelių citoplazma blyškios žalios ar mėlynai-žalios spalvos.
- c) Branduolėlių spalva rožinė ir raudona.
- d) Ląstelių citoplazma permatoma (tame tarpe ir parabazinio sluoksnio bei metaplazavusių plokščiojo epitelio ląstelių [11,88]).

Oranžinis-G tirpalas:

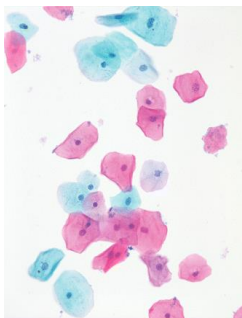
- e) Normaliame tepinėlyje nėra oranžinės spalvos. Tokia spalva nusidažo paviršinės suragėjusios plokščiojo epitelio ląstelės.
- f) Pilnai ragėjančio plokščiojo epitelio ląstelės nusidažo skaisčia oranžine spalva.

2. Ląstelių branduolys

Hematoksilino dažai:

- a) Branduoliai nusidažo nuo mėlynos iki tamsiai purpurinės spalvos.
- b) Branduolio kontūras ryškus ir aiškus, jis kontrastuoja su citoplazma.
- c) X-chromatino kūneliai aiškiai matomi, jie su ryškiu kontūru.
- d) Normalių vezikulinių branduolių parachromatinas-švelnus.
- e) Neutrofilinių leukocitų branduolių sąsmaukos-aiškiai matosi [11,88].

13 pav. Papanicolaou dažytų ThinPrep PAP tepinėlių mikroskopinis vaizdas.



ŽPV tyrimo rezultatų interpretacija.

Tyrimo rezultatuose pateikiami sujungtų aukštos rizikos genotipų ir atskirai aukščiausios rizikos ŽPV 16 ir ŽPV 18 genotipų rezultatų duomenys kliniškai reikšmingu infekcijos lygiu. T. y. vykdoma aukštos rizikos genotipų atranka, parodanti ar yra bent vienas iš 12 į rinkinį įeinančių ŽPV aukštos rizikos genotipų: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, taip pat atskirai pateikiami 16 ir 18 genotipų nustatymo rezultatai [23,79,80].

Rezultatų patikimumo užtikrinimas.

Tyrimo rezultatų užtikrinimui yra įdiegtos kelios kokybės ir saugumo funkcijos.

- Vidinė kontrolė. Ląstelių β – globino vidinė kontrolė užtikrina, kad mėginyje yra pakankamai tiriamosios medžiagos ir kad gautas neigiamas rezultatas nėra klaidingai neigiamas dėl nepakankamo tiriamosios medžiagos kiekio. Jeigu reakcijos metu gaunamas neigiamas β – globino vidinės kontrolės rezultatas tai mėginys yra vertinamas kaip netinkamas tyrimui [23,79,80].
- Fermentas AmpErase (uracil-N-glikozilazė). ŽPV amplifikacijos/aptikimo reagento MMX sudėtyje yra fermentas AmpErase (0,10%), kuris atskiria amplifikacijos produktus nuo pašalinių molekulių, taip sumažindamas klaidingai teigiamų rezultatų riziką.
- Nėra kryžminių reakcijų. Nesudaro kryžminių reakcijų su žemos rizikos ŽPV genotipais, kad gauti teigiami rezultatai būtų patikimi ir kliniškai reikšmingi [23,79,80].

Cintec Plus tyrimo rezultatų interpretacija.

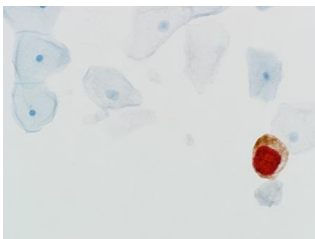
Citologinius gimdos kaklelio bandinius, nudažytus CIntec *PLUS* citologiniu rinkiniu, vertina gydytojas patologas šviesiniu mikroskopu [22]. Preparatai vertinami tiriant atskiras gimdos kaklelio epitelio ląsteles, turinčias ir rudą citoplazminį, ir raudoną branduolinį dažymą, rodanti kartu vykstančią p16^{INK4a} ir Ki-67 raišką. Be to, panašiai kaip aprašant Pap citologijos rezultatus, aprašant Cintec Plus citologinio tyrimo rezultatus turėtų būti vertinamas bandinių tinkamumas pagal Bethesda 2001 gaires [22].

Dažant Cintec Plus citologiniu rinkiniu, gaunami du skirtingų spalvų reakcijos produktai: rudos nuosėdos p16^{INKa} antigeno srityje ir raudonos nuosėdos Ki-67 antigeno srityje. Rudas ląstelių dažymas (citoplazmos ir/arba branduolių) rodo padidėjusią p16^{INKa} raišką. Raudonas ląstelių dažymas (branduolių) rodo Ki-67 raišką. Ląstelėse, kuriose nudažyti abu antigenai, matomas rudas citoplazminis dažymas su paprastai ryškiais raudonais branduoliais [22].

Teigiamas tyrimo rezultatas.

Nustačius vieną ar daugiau gimdos kaklelio epitelinių ląstelių, kuriose toje pačioje ląstelėje matomas ir specifinis rudas citoplazminis imunodažymas, ir specifinis raudonas branduolinis imunodažymas, laikoma, kad Cintec Plus citologinio tyrimo rezultatas yra vertinamas kaip teigiamas [22].

14 pav. Teigiamo Cintec Plus tepinėlio mikroskopinis vaizdas.

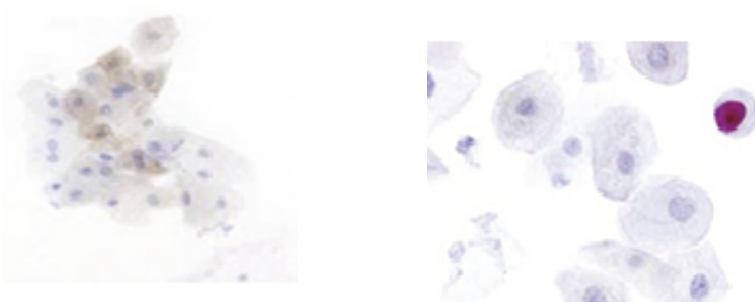


Adaptuota iš: (Cintec Plus cytology interpretation guide, Roche).

Tyrimo rezultatas neigiamas.

Jeigu nenustatoma jokių gimdos kaklelio epitelinių ląstelių, kuriose matomas dvigubas rudas citoplazminis imunodažymas ir raudonas branduolinis imunodažymas arba gimdos kaklelio epitelinėse ląstelėse matomas tik vieno iš žymenų imunoreaktyvumas (pavyzdžiui, tik rudas p16^{INKa} dažymas arba tik raudonas Ki-67 dažymas) Cintec Plus citologinio tyrimo rezultatas yra vertinamas kaip neigiamas [22].

15 pav. Neigiamo Cintec Plus tepinėlio mikroskopinis vaizdas.



Adaptuota iš: (Cintec Plus cytology interpretation guide, Roche).

2.3. STATISTINĖ ANALIZĖ

Tyrimo statistinė analizė buvo atlikta naudojant IBM SPSS-23.0 ir Microsoft Office Excel 2010 programas. Rezultatuose pateikiamos dažnių ir procentinių dažnių lentelės nominalių požymių vertinimui. Duomenų (amžiaus) normalumo tikrinimui taikytas Kolmogorov – Smirnov kriterijus. Nustačius, kad duomenų normalumo prielaida nėra tenkinama, amžiaus vidurkių palyginimui naudoti neparametriniai statistiniai kriterijai. Žmogaus papildomos viruso DNR tyrimo ir amžiaus statistinio reikšmingumo nustatymui naudotas χ^2 (Chi – kvadratų) kriterijus. Taip pat statistiniam reikšmingumui, tarp ŽPV DNR ir citologijos tyrimų, naudoti χ^2 (Chi – kvadratų), bei tikslusis Fišerio kriterijus. Skirtumai tarp, ŽPV DNR tyrimo ir diagnozuotų įvairaus laipsnio gimdos kaklelio intraepitelinių pakitimų, bei Cintec Plus imunocitocheminio tyrimo ir diagnozuotų įvairaus laipsnio gimdos kaklelio intraepitelinių pakitimų, skirtingose tiriamųjų grupėse vertinti taikant χ^2 (Chi – kvadratų) kriterijų. Koreliacinių ryšių analizei atlikti naudotas Spirmeno koreliacijos ir Pirsono asociacijos koeficientai, taip pat kappa koeficientas. Tyrimo metu įvertintas ryšis tarp ŽPV ir Cintec Plus testo rezultatų. Apskaičiuotos teigiamos ir neigiamos prognostinės vertės, rezultatai pateikiami ROC kreivių pavidalu. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

Atliktame tyrime dalyvavo 200 moterų. 8 moterų tiriama medžiaga buvo netinkama tyrimui, dėl ląstelių trūkumo ar netinkamo medžiagos paėmimo, taigi bendra tyrimo imtis 192 moterys. 190 buvo nurodžiusios savo amžių. Visos tiriamosios buvo sugrupuotos į 8 amžiaus grupes 5 metų intervalu.

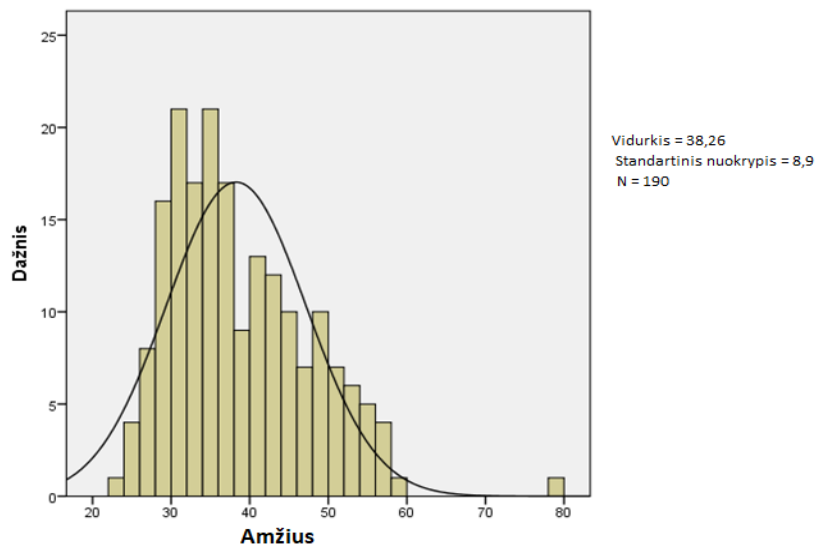
I grupė – iki 25 metų, II grupė – 25-29 metai, III grupė – 30-34 metai, IV grupė – 35-39 metai, V grupė – 40-44 metai, VI grupė – 45-49 metai, VII grupė – 50-54 metai ir VIII grupė – daugiau nei 55 metai (4 lentelė). Visų moterų amžiaus vidurkis 38,26. Jauniausia tyrimo dalyvė – 23, vyriausia – 79 metų (SD±8,9).

4 lentelė. Moterų skaičius kiekvienoje tyrimo amžiaus grupėje.

Amžiaus grupė	Amžius	Dažnis	Dažnis, %
I	Iki 25	5	2.6
II	25-29	33	17.4
III	30-34	50	26.3
IV	35-39	37	19.5
V	40-44	24	12.6
VI	45-49	19	10.0
VII	50-54	16	8.4
VIII	Daugiau nei 55	6	3.2
	Viso	190	100.0

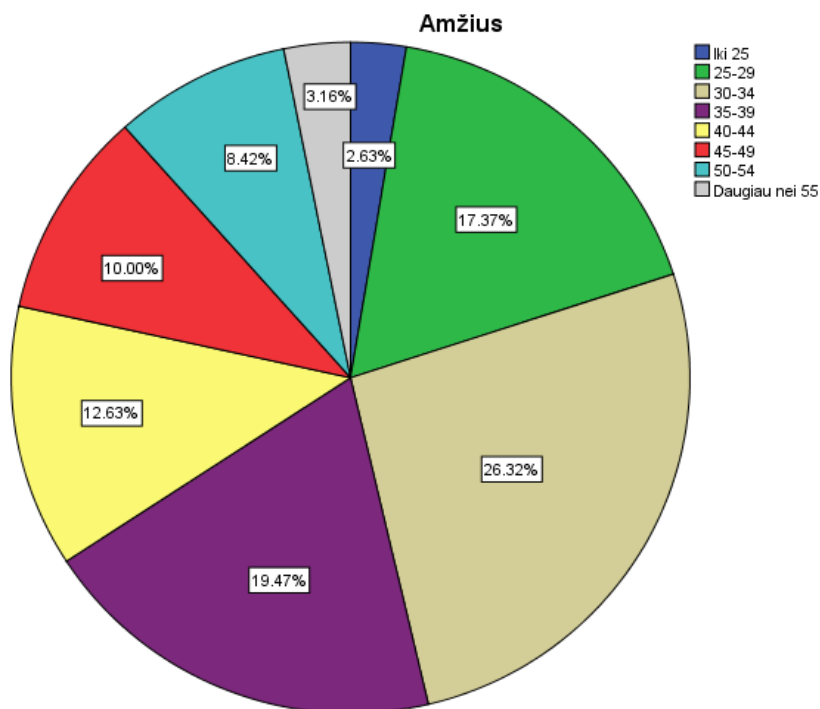
Amžiaus skirstinys neatitinka normaliojo pasiskirstymo (16 pav.) ($p < 0,05$).

16 pav. Amžiaus grupių pasiskirstymas.



Kaip matyti iš 17 pav., didžiausia tyrime dalyvavusių moterų grupė buvo 30-34 metų amžiaus, po to seka 35-39 metų amžiaus grupių atstovės, kurios sudaro 45,8% visų tiriamųjų. Mažiausios tyrime dalyvavusių moterų grupės iki 25 ir daugiau nei 55 metų, jos bendrai sudaro 5,79 % (N= 11).

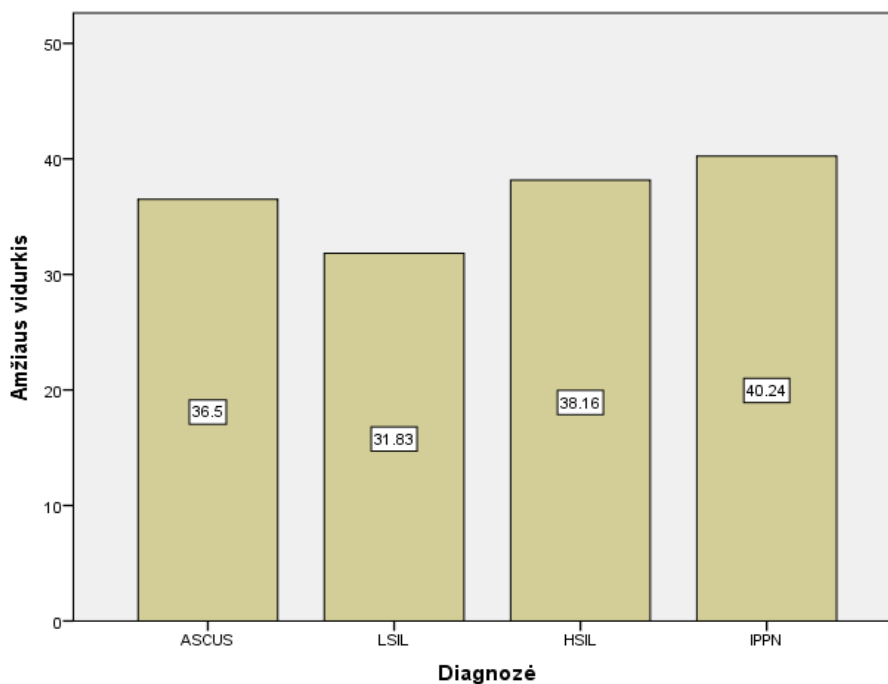
17 pav. Tyrime dalyvavusių moterų amžiaus grupių procentinis pasiskirstymas.



3.1. Moterų, kurioms nustatytos displazijos, amžius

Tyrimo metu siekta nustatyti, ar yra reikšmingas ryšys tarp pacientės amžiaus ir nustatytos displazijos. Diagramoje pateikti tyrimo rezultatai parodė, kad HSIL nustatomas vidutiniškai 38,16 metų amžiaus moterims, LSIL – 31,38 ir ASC-US – 36,5 metų (18 pav.). IPPN diagnozė (nėra pakitimų citologiniame tepinėlyje) nustatyta vyresnio amžiaus moterims - 40,24 metų. Naudojant Kruskal – Wallis testą, hipotezių tikrinimui, statistiškai reikšmingų amžiaus skirtumų, tarp displaziją turinčių pacienčių, nenustatyta ($p=0.170>0.05$).

18 pav. Moterų amžiaus vidurkiai pagal citologinio tyrimo metu nustatytas diagnozes.



Dažnių lentelėje (5 lentelė) pateikiamas pacienčių amžiaus grupių pasiskirstymas pagal IPPN ir displazijas. ASC-US pacientės pasiskirstė po lygiai tarp 30-34 ir 40-44 metų amžiaus grupių, tuo tarpu net 50% visų LSIL pacienčių buvo jaunesnės nei 25 metų amžiaus. Daugiausia moterų, kurioms nustatyta HSIL priklauso 30-34 metų amžiaus grupei, mažiausiai HSIL nustatyta iki 25 metų amžiaus grupėje. IPPN tolygiai pasiskirstė trijose amžiaus grupėse 30-34, 35-39 ir 45-49 (po 20,7%). Šie duomenys parodo, jog jaunesnio nei 25 metų amžiaus moterims žymūs gimdos kaklelio pakitimai nustatomi rečiau, kadangi jų išsivystymui reikalingas ilgesnis laikas. Atlikus tyrimą buvo pastebėta, kad 20-30 metų amžiaus moterims buvo nustatyta net 18,4 % patologijos atvejų bendroje tiriamųjų imtyje. 50 % visų LSIL, 1,3 % HSIL atvejų grupėje iki 25 metų ir 19,6 % HSIL 25-29 metų grupėje. Literatūros duomenimis LSIL iki HSIL progresuoja ~21 % atvejų per 2 – 4 metus, taigi jeigu GKV programa būtų skiriama moterims nuo 21 m. amžiaus galime daryti prielaidą, jog pagal mūsų atlikto tyrimo duomenis, buvo galima išvengti 20,9 % (N=32) HSIL atvejų moterims iki 30 metų.

Vyresnio nei 55 metų amžiaus pacientėms buvo nustatyta tik 3,9 % patologinių atvejų bendroje imtyje. Tai taip pat patvirtina, kad atliktame tyrime, kaip ir anksčiau atliktose studijose, jaunesnėms moterims (iki 35 – 40 metų) dažniau diagnozuojamos displazijos, negu vyresnio amžiaus moterims (virš 50 metų).

5 lentelė. Amžiaus grupių pasiskirstymas pagal citologines diagnozes.

		Diagnozė							
		IPPN		ASC-US		LSIL		HSIL	
		Dažnis	N %	Dažnis	N %	Dažnis	N %	Dažnis	N %
Amžius	Iki 25	0	0,0%	0	0,0%	3	50,0%	2	1,3%
	25-29	3	10,3%	0	0,0%	0	0,0%	30	19,6%
	30-34	6	20,7%	1	50,0%	0	0,0%	43	28,1%
	35-39	6	20,7%	0	0,0%	2	33,3%	29	19,0%
	40-44	5	17,2%	1	50,0%	1	16,7%	17	11,1%
	45-49	6	20,7%	0	0,0%	0	0,0%	13	8,5%
	50-54	3	10,3%	0	0,0%	0	0,0%	13	8,5%
	Daugiau nei 55	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	6	3,9%

Matome, jog procentaliai didžiausia amžiaus grupių įvairovė yra tarp HSIL pacienčių. Didžiausios HSIL rizikos grupė yra nuo 25 iki 39 metų amžiaus moterys, jos sudaro 66,7 % visos HSIL grupės.

Iš viso tyrimo metu, įvairiose amžiaus grupėse buvo nustatytas 161 gimdos kaklelio patologijos atvejis. ASC-US - 2, LSIL – 6, HSIL – 153 atvejai.

3.2. ŽPV infekuotų moterų amžius

Atlikus tyrimą, siekta įvertinti ar yra ryšys tarp ŽPV DNR tyrimo teigiamų rezultatų, bei pacientės amžiaus ir tarp moterų amžiaus bei nustatyto ŽPV tipo.

6 lentelė. ŽPV DNR tyrimo rezultatų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes.

Amžius	ŽPV DNR rezultatas				
	NEIGIAMI		TEIGIAMI		VISO
	N	%	N	%	
Iki 25	0	0	5	100	5
25-29	4	12,1	29	87,9	33
30-34	6	12	44	88	50
35-39	8	21,6	29	78,4	37
40-44	8	33,3	16	66,7	24
45-49	5	26,3	14	73,7	19
50-54	3	18,8	13	81,3	16
Daugiau nei 55	1	16,7	5	83,3	6

Kaip matyti iš pateiktų 6 lentelėje duomenų, amžiaus grupėse ryškaus skirtumo tarp teigiamų ir neigiamų ŽPV DNR tyrimo rezultatų nėra. Iš atlikto tyrimo duomenų galime matyti, kad iki 25 metų amžiaus grupėje visoms tirtoms pacientėms nustatytas teigiamas ŽPV, tai patvirtina įvairių literatūrinių šaltinių duomenis, jog didžiausias moterų infekuotumas ŽPV yra iki 30 metų amžiaus. Procentaliai, daugiausia teigiamų ŽPV DNR rezultatų (neskaičiuojant amžiaus grupės iki 25 metų, nes tiriamųjų imtis maža) gauta 30-34 metų moterų amžiaus grupėje – 88 %. Mažiausiai ŽPV DNR teigiamų tyrimo rezultatų nustatyta 40-44 metų moterų amžiaus grupėje.

Naudojant χ^2 (Chi – kvadratų) kriterijų nustatyta, jog yra statistiškai reikšmingas skirtumas tarp amžiaus grupės su mažiausiu procentiniu teigiamų ŽPV DNR rezultatų dažniu (40-44 metų amžiaus grupė) ir didžiausiu procentiniu teigiamų ŽPV DNR rezultatų dažniu (30-34 metų amžiaus grpė) ($p=0,028$ $p<0,05$).

Tyrimo metu taip pat siekta įvertinti nustatyto ŽPV tipo ir amžiaus sąsajas. Įvertinta, ar yra statistiškai reikšmingas amžiaus skirtumas tarp konkrečių, tyrimo metu nustatytų ŽPV tipų.

7 lentelė. Tyrimo metu nustatytų ŽPV tipų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes.

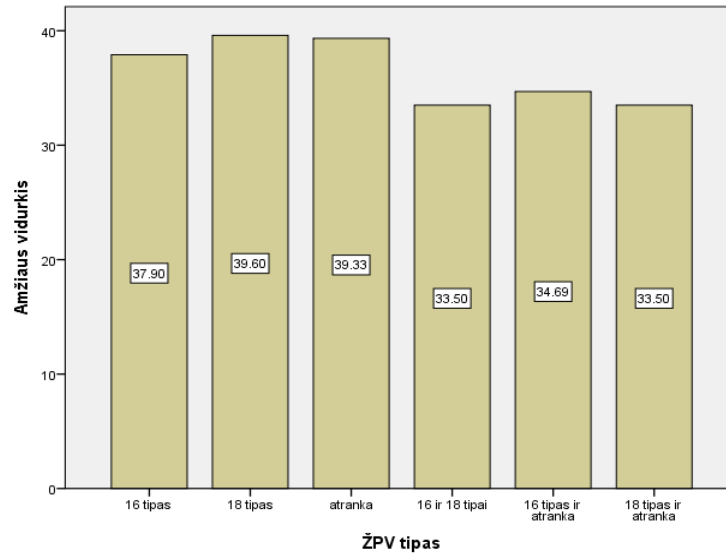
Amžius	ŽPV tipas												Viso
	16 tipas		18 tipas		atranka		16 ir 18 tipai		16 tipas ir atranka		18 tipas ir atranka		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Iki 25	0	0,0%	1	20,0%	2	3,7%	1	50,0%	1	3,4%	0	0,0%	5
25-29	15	24,6%	0	0,0%	6	11,1%	0	0,0%	7	24,1%	1	25,0%	29
30-34	16	26,2%	0	0,0%	14	25,9%	0	0,0%	12	41,4%	2	50,0%	44
35-39	11	18,0%	2	40,0%	12	22,2%	0	0,0%	3	10,3%	1	25,0%	29
40-44	6	9,8%	1	20,0%	5	9,3%	1	50,0%	3	10,3%	0	0,0%	16
45-49	5	8,2%	0	0,0%	7	13,0%	0	0,0%	2	6,9%	0	0,0%	14
50-54	5	8,2%	0	0,0%	7	13,0%	0	0,0%	1	3,4%	0	0,0%	13
Daugiau nei 55	3	4,9%	1	20,0%	1	1,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	5

Kaip matyti iš duomenų, pateiktų 7 lentelėje, daugiausia 16 tipo ir bent vieno iš aukštos rizikos ŽPV tipų nustatyta 30-34 metų amžiaus grupėje, o 18 tipas – 35-39 metų amžiaus grupėje. Tarp daugiau nei vieno ŽPV DNR tyrimo metu aptikto ŽPV tipo – dviguba infekcija, taip pat daugiausia nustatyta 30-34 metų amžiaus grupėje.

Galime daryti išvadą, kad didžiausia ŽPV tipų įvairovė: 16 tipas, ir bent vienas iš aukštos rizikos tipų, bei daugiau nei vienas tipas (16 ir AR, bei 18 ir AR) nustatytas 30-34 metų amžiaus grupėje.

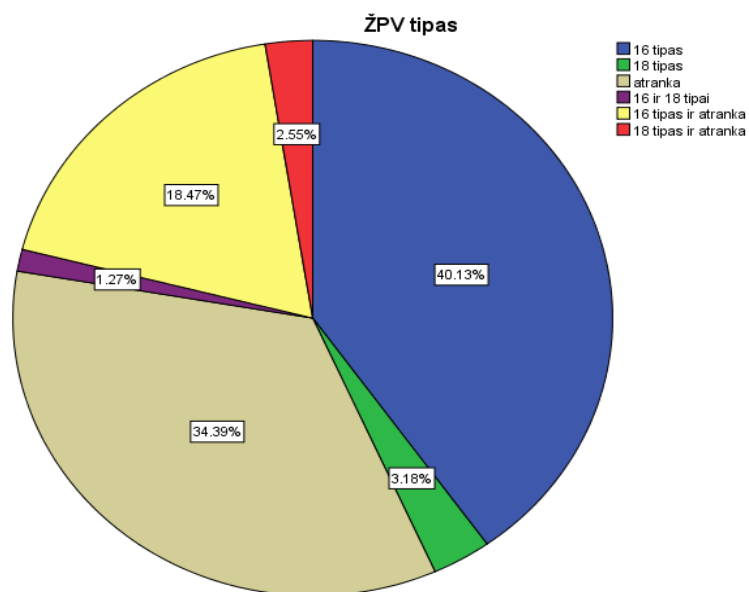
Siekiant nustatyti ar tai statistiškai reikšminga, apskaičiuotas moterų amžiaus vidurkis, kurioms tyrimo metu nustatytas bent vienas ŽPV tipų variantas.

19 pav. Moterų amžiaus vidurkiai pagal nustatytą ŽPV tipą.



Diagramoje pateikti duomenys (19 pav.) parodo, kad amžiaus vidurkiai yra panašūs. Taikant Kruskal – Wallis kriterijų statistiškai reikšmingų amžiaus skirtumų tarp įvairių ŽPV tipų nenustatyta ($p=0,142$ $p>0,05$).

20 pav. Procentinis tyrimo metu nustatytų ŽPV tipų pasiskirstymas.



Skritulinėje diagramoje (20 pav.) matome, koks procentas, kokio ŽPV tipo, nustatyta bendroje tyrimo imtyje. Dažniausias yra 16 ŽPV tipas (40,13 %), o mažiausiai nustatyta: pavienių – 18 tipo (3,18%), kelių ŽPV tipų – 16 ir 18 tipai kartu (1,27%).

Šiais rezultatais, galime patvirtinti literatūroje pateikiamus duomenis, kad dažniausiai gimdos kaklelio intraepitelinius (ypač žymius) pokyčius sukelia būtent 16 žmogaus papildomos viruso tipas.

3.3. Citologija ir ŽPV DNR

Vertinant tyrimo metu gautus rezultatus, buvo siekta nustatyti ryšį tarp citologiniu tyrimu nustatytų gimdos kaklelio pokyčių ir ŽPV DNR tyrimo rezultatų.

8 lentelė. ŽPV DNR tyrimo rezultatų pasiskirstymas pagal citologinio tyrimo diagnozes.

			ŽPV rezultatas		Viso
			Neigiamas	Teigiamas	
Diagnozė	ASC-US	Dažnis	1	1	2
		%	50.0%	50.0%	100.0%
	LSIL	Dažnis	1	5	6
		%	16.7%	83.3%	100.0%
	HSIL	Dažnis	9	146	155
		%	5.8%	94.2%	100.0%
	IPPN	Dažnis	24	5	29
		%	82.8%	17.2%	100.0%
Viso		Dažnis	35	157	192
		%	18.2%	81.8%	100.0%

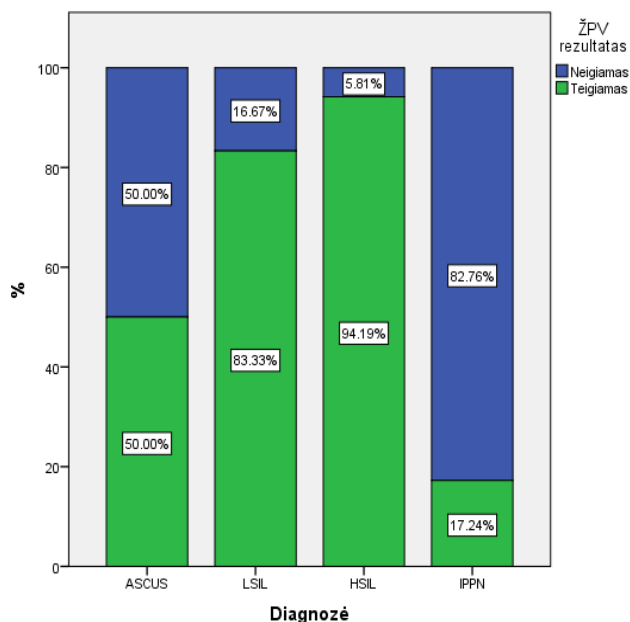
8 lentelėje pateikiami teigiamų ir neigiamų ŽPV DNR rezultatų duomenys, esant tam tikrai citologinei diagnozei. Taip pat pateikiama diagrama (21 pav.), kurioje vizualiai aiškiai matyti, kad beveik visi HSIL ir LSIL atvejai turi teigiamus ŽPV DNR rezultatus. Nenustačius pakitimų citologijoje, IPPN atvejais, ŽPV DNR testo teigiami rezultatai tik – 17,2 % (N=5).

ASC-US atvejai, tyrimo metu nustatyti tik 2, todėl nėra tikslinga skaičiuoti, šios diagnozės ir ŽPV DNR rezultatų statistinio reikšmingumo, tačiau siekiant nustatyti ar yra ryšys tarp ASC-US ir ŽPV DNR rezultatų, statistinis reikšmingumas apskaičiuotas.

Kadangi ASC-US imtis yra maža (N>5), naudotas tikslusis Fišerio kriterijus. Statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatyta (p=0,35, p<0,05).

Naudojant χ^2 (Chi – kvadratų) kriterijų nustatyta, kad yra statistiškai reikšmingi ŽPV DNR rezultatai esant LSIL, HSIL diagnozėms ir IPPN atvejais ($p < 0,001$).

21 pav. ŽPV DNR tyrimo rezultatų pasiskirstymas pagal citologinę diagnozę.



Gauti tyrimo duomenys, leidžia patvirtinti literatūroje pateikiamą informaciją, jog daugiau nei 90 % displazijų sukelia žmogaus papilomos virusas. Tyrimo metu gauti duomenys parodė, kad ŽPV virusas buvo nustatytas 93,3 % tyrime dalyvavusių moterų, kurioms citologinio tyrimo metu diagnozuota bent viena iš displazijos rūšių.

Įvertintos ir citologinių tyrimų bei nustatyto ŽPV tipo sąsajos.

9 lentelė. Nustatytų ŽPV tipų pasiskirstymas pagal citologinę diagnozę.

Diagnozė		ŽPV tipas						Viso
		16 tipas	18 tipas	atranka	16 ir 18 tipai	16 tipas ir atranka	18 tipas ir atranka	
ASC-US	Dažnis	1	0	0	0	0	0	1
	%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
LSIL	Dažnis	0	1	3	1	0	0	5
	%	0.0%	20.0%	60.0%	20.0%	0.0%	0.0%	100.0%
HSIL	Dažnis	60	4	48	1	29	4	146
	%	41.1%	2.7%	32.9%	0.7%	19.9%	2.7%	100.0%

IPPN	Dažnis	2	0	3	0	0	0	5
	%	40.0%	0.0%	60.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Total	Dažnis	63	5	54	2	29	4	157
	%	40.1%	3.2%	34.4%	1.3%	18.5%	2.5%	100.0%

9 lentelėje pateikti duomenys rodo, jog žymių intraepitelinių gimdos kaklelio pakitimų (HSIL) atvejais daugiausia nustatytas 16 žmogaus papilomos viruso tipas. Taigi tokie rezultatai, leidžia dar kartą daryti išvadą, jog literatūros šaltiniuose pateikiama informacija, kad 16 ŽPV tipas yra onkogeniškiausias ir dažniausiai sukeliantis ikivėžinius, bei žymesnius pakitimus, yra teisinga.

3.4. Citologija ir Cintec Plus

10 lentelėje pateikti rezultatai rodo ryšį, tarp citologinio tyrimo diagnozės ir Cintec Plus imunocitocheminio tyrimo rezultatų.

10 lentelė. Cintec Plus tyrimo rezultatų pasiskirstymas pagal citologinę diagnozę.

Diagnozė	Cintec Plus rezultatas			
	Neigiamas		Teigiamas	
	N	%	N	%
IPPN	28	96,6%	1	3,4%
ASC-US	1	50%	1	50%
LSIL	4	66,7%	2	33,3%
HSIL	5	3,2%	150	96,7%

ASC-US ir LSIL atvejais, Cintec Plus teigiamas rezultatas nustatytas atitinkamai 50% (N=1) ir 33,3% (N=2). HSIL atveju Cintec Plus teigiamas rezultatas nustatytas 96,7 % pacienčių. Neesant pakitimų PAP citologiniame tepinėlyje, nustatyta 96,6 % neigiamų ir 3,4 % teigiamų (N=1) Cintec Plus imunocitocheminio tyrimo rezultatų.

ASC-US ir LSIL, atvejai bendroje tiriamųjų imtyje sudaro tik 4,17 %, pagal šias diagnozes nėra tikslinga vertinti tyrimo tikslumo. HSIL ir IPPN atvejais nustatytas aukštas tyrimo tikslumas t.y. ~ 96 %. Galime daryti prielaidą, jog tikrai teigiami Cintec Plus tyrimo rezultatai gauti citologinio tyrimo metu nustatčius žymius intraepitelinius pakitimus ir teigiamus Cintec Plus, o

tikrai neigiami imunocitocheminio Cintec Plus tyrimo rezultatai gauti - nenustačius citologinių pakitimų ir gavus neigiamus Cintec Plus tyrimo rezultatus.

Kadangi ASC-US imtis yra maža ($N > 5$), naudotas tikslusis Fišerio kriterijus. Statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatyta ($p = 0,13$, $p < 0,05$).

Naudojant χ^2 (Chi – kvadratų) kriterijų nustatyta, kad yra statistiškai reikšmingi Cintec Plus tyrimo rezultatai esant LSIL, HSIL diagnozėms ir IPPN atvejais ($p < 0,001$).

3.5. Citologija/ Cintec Plus/ ŽPV DNR

Pagal 8 ir 10 lentelėse pateiktus duomenis palyginami Cintec Plus ir ŽPV DNR tyrimų rezultatai atsižvelgiant į citologinio tyrimo diagnozes.

ASC-US atveju, rezultatai pasiskirstė tolygiai, po 50 %.

LSIL – daugiau teigiamų atvejų nustatyta ŽPV DNR, nei Cintec Plus tyrimo metu, atitinkamai 83,3 % ir 33,3 %. Nors LSIL atvejų imtyje yra nedaug, tačiau galime daryti išvadą, kad LSIL atveju ŽPV DNR tyrimas yra patikimesnis.

HSIL atveju Cintec Plus teigiamų tyrimo rezultatų gauta daugiau, nei ŽPV DNR, atitinkamai 96,7 % ir 94,1 % ($N = 150$, $N = 146$). Taigi Cintec Plus tyrimą HSIL atvejais, lyginant su ŽPV DNR, galima laikyti patikimesniu.

Nagrinėjant ryšį tarp šių trijų tyrimų yra gauta keletas klaidingai neigiamų tyrimų rezultatų. Nustačius 155 HSIL atvejus, 8 ŽPV DNR atvejai yra neigiami, o Cintec Plus teigiami. Taip pat 1 ASC-US atvejis, esant neigiamiems ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimams ir vienas LSIL atvejis esant neigiamam ŽPV DNR tyrimo rezultatui ir teigiamam Cintec Plus imunocitocheminio tyrimo rezultatui. Pakartotinai peržiūrėjus preparatus įvertinta, kad neigiamiems ŽPV tyrimo rezultatams įtaką galėjo daryti kraujingi mėginiai, ląstelingumas (ląstelių kiekis esantis mėginyje), ląstelių rūšis (plokščiojo epitelio ar liaukinio), taip pat laikas per kurį atliktas tyrimas, kadangi vienam tyrimui atlikti buvo renkami 22 mėginiai.

Gautas ir vienas HSIL atvejis, kai abu, ŽPV DNR ir Cintec Plus, tyrimai nustatyti neigiami. Esant neigiamiems ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimams, tačiau radus pakitimų citologiniame PAP tepinėlyje, galime daryti prielaidą, kad pakitimus galėjo sukelti kiti, su ŽPV infekcija nesusiję veiksniai: makšties infekcija, kitos lytiškai plintančios ligos (Chlamydia, gonorrhoea, Candida Albicans ir kt.), kurios sukelia gimdos kaklelio uždegimą ir pakitimus gimdos kaklelio gleivinėje. Kadangi tyrimo metu toks atvejis nustatytas 79 metų moteriai, tai galėjo sukelti ir estrogeno kiekio pokytis dėl menopauzės.

IPPN atveju nustatytas tik vienas Cintec Plus teigiamas rezultatas, bet ŽPV DNR šiai pacientei yra neigiamas. Taigi galime daryti prielaidą, jog galimas klaidingai teigiamas Cintec Plus tyrimo rezultatas. ŽPV DNR, esant IPPN, teigiami 5 atvejai. Šiuo atveju, galime daryti prielaidą, kad ŽPV yra episominės formos, išsivalanti infekcija, o ne persistuojanti, ir nesukelia ląstelių onkogeninės transformacijos, bei intraepitelinių pakitimų.

3.6. Cintec Plus ir ŽPV DNR

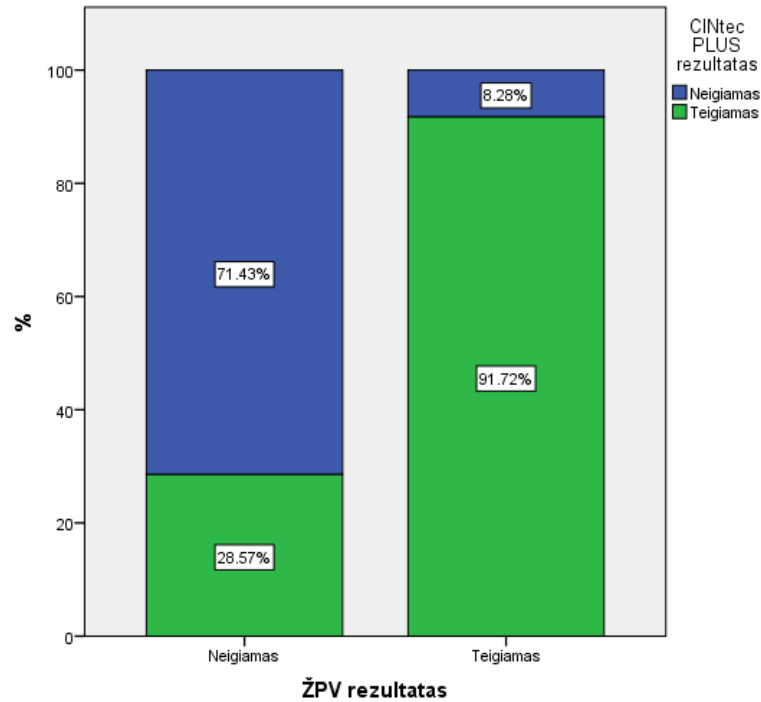
Pateikiami duomenys, tarp ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų rezultatų, tarpusavio ryšio nustatymui. 11 lentelėje pateikti duomenys rodo, kiek teigiamų Cintec Plus atvejų gauta tiriamojo darbo metu esant teigiamiems ir neigiamiems ŽPV DNR rezultatams ir kiek Cintec Plus tyrimo atvejų gauta teigiamų esant teigiamiems ir neigiamiems ŽPV DNR rezultatams.

11 lentelė. ŽPV DNR ir Cintec Plus teigiamų ir neigiamų tyrimų rezultatų tarpusavio pasiskirstymas.

			CINtec PLUS rezultatas		Viso
			Neigiamas	Teigiamas	
ŽPV rezultatas	Neigiamas	N	25	10	35
		%	71.4%	28.6%	100.0%
	Teigiamas	N	13	144	157
		%	8.3%	91.7%	100.0%
Total		N	38	154	192
		%	19.8%	80.2%	100.0%

Kaip matyti iš diagramoje pateiktų rezultatų (22 pav.), Cintec Plus tyrimas buvo neigiamas 71,43 % atvejų, tarp visų neigiamų ŽPV DNR rezultatų ir 91,72 % teigiamas, tarp visų teigiamų ŽPV DNR.

22. pav. Procentinis ŽPV DNR ir Cintec Plus teigiamų ir neigiamų tyrimų rezultatų tarpusavio pasiskirstymas.



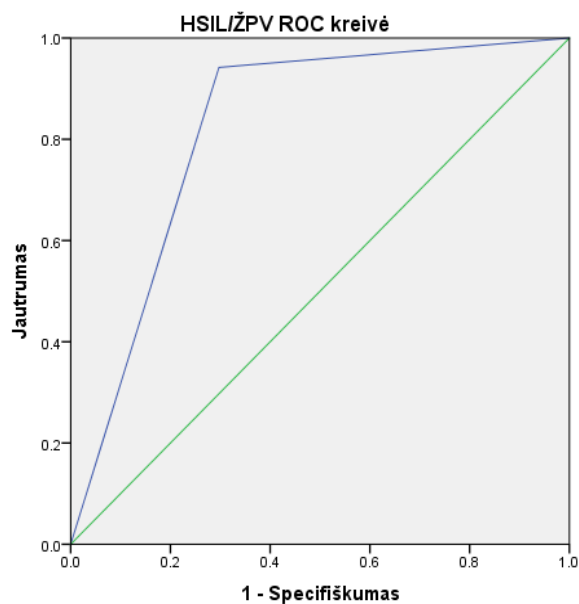
Naudojant Spirmano koreliaciją, nustatyta, kad egzistuoja vidutinio stiprumo ryšys, tarp šių tyrimų rezultatų (0,612; $p < 0,05$). Taip pat patikslinimui, buvo panaudotas ir Pirsono asociacijos koeficientas, kuris davė analogišką rezultatą apie ryšio stiprumą tarp tyrimo rezultatų (koeficientas $r = 0,59$).

ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų rezultatų palyginimui, apskaičiuotas ir kappa koeficientas. Gautas koeficientas lygus 0,61, tai rodo didelį abiejų tyrimų rezultatų patikimumą, nustatant gimdos kaklelio patologiją.

3.7. Prognostinės vertės

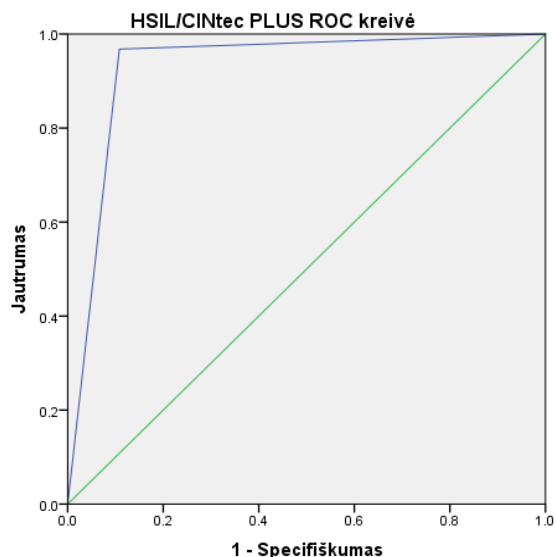
ASC-US ir LSIL atvejų ($N = 8$), bendroje tyrimo imtyje ($N = 192$) yra labai mažas skaičius, todėl prognostines vertes, esant šioms diagnozėms, nustatyti nėra tikslinga. Dėl žemo šių diagnozių paplitimo imtyje, ROC kreivės indukuotų prastas tyrimų prognostines savybes. Taigi buvo paskaičiuotos ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų prognostinės vertės HSIL atvejais.

23 pav. ŽPV DNR tyrimo, HSIL atvejais, efektyvumo (ROC) kreivė.



Teigiama ŽPV testo prognostinė vertė nustatant HSIL diagnozę lygi 92,99%, o 0,822 plotas po ROC kreive rodo gera tyrimo tikslumą. Neigiama ŽPV testo prognostinė vertė nustatant HSIL diagnozę yra 74,29%.

24 pav. Cintec Plus tyrimo, HSIL atvejais, efektyvumo (ROC) kreivė.



Teigiama CINtec PLUS testo prognostinė vertė nustatant HSIL diagnozę lygi 97,40%, 0,930 plotas po ROC kreive rodo labai gerą tyrimo tikslumą. Neigiama ŽPV testo prognostinė vertė nustatant HSIL diagnozę yra 86,84%.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Mokslo tiriamojo darbo tikslas buvo įvertinti Cintec Plus tyrimo vertę nustatant gimdos kaklelio patologiją. Šiam tikslui įgyvendinti lyginome Cintec Plus tyrimo rezultatus su ThinPrep skystosios terpės ir ŽPV DNR tyrimų rezultatais, suskirstant juos įvairiais aspektais: pagal moterų, kurioms nustatytos displazijos amžių, moterų, kurioms nustatytas ŽPV amžių ir konkretų infekcijos tipą, citologinius gimdos kaklelio pakitimus ir jų sąsajas su ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų rezultatais, bei Cintec Plus ir ŽPV DNR tyrimų tarpusavio ryšį. Atlikto tyrimo rezultatus palyginome su kitų mokslininkų atliktų tyrimų rezultatais. Taip pat įvertinome ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų prognostines vertes žymių intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių (HSIL) atvejais.

Gimdos kaklelio vėžys išsivysto palaipsniui, progresuojant ikivėžiniams pakitimams, todėl ankstyva ikivėžinių pokyčių – displazijų diagnostika yra labai svarbi. Gimdos kaklelio vėžys yra, palyginti, jaunų moterų liga, nes displazijos gali būti nustatomos ir labai ankstyvame amžiuje [8]. Mūsų atlikto tyrimo jauniausia pacientė yra 23 metų moteris, kuriai nustatytas LSIL atvejis, o kitai, 24 metų moteriai nustatyti žymūs intaepiteliniai gimdos kaklelio pokyčiai – HSIL. Taigi kaip galime matyti iš gautų duomenų, gimdos kaklelio patologija gali būti nustatoma ir itin jaunoms moterims. Pasauliniais tyrimų duomenimis, rutininės patikros metu, nustatomų ikivėžinių pokyčių amžiaus vidurkiai: ASC-US – 35,7, LSIL – 32,4 [13]. Mūsų atlikto tyrimo metu, tiriant tikslingą motrų grupę, (moters su ginekologiniais nusiskundimais, kontaktiniais kraujavimais ir kt., bei anksčiau turėjusios įvairaus laipsnio gimdos kaklelio pakitimus ir atėjusios pakartotinai patikrai), gauti duomenys parodo panašų, tam tikro laipsnio, ikivėžinių pakitimų išsivystymo amžių. Tyrimo duomenimis, moterų, kurioms nustatyta ASC-US displazija amžiaus vidurkis 36,5, LSIL 31,38, o HSIL 38,16 metai. Taigi kaip galime matyti išanalizavę duomenis, displazijų išsivystymo amžius yra 30-40 metų [13].

Žinomas ir ŽPV, kaip pagrindinio rizikos veiksnio, išsivystyti gimdos kaklelio vėžiui vaidmuo, todėl įvertintas ŽPV infekcijos ir atskirų jos tipų paplitimas [4]. Pasauliniais duomenimis, ŽPV paplitimas, esant citologinės patologijos atvejams, yra nuo 50 % ASC-US iki 80 % HSIL atvejais [40]. Atlikto Lietuvoje tyrimo metu nustatyta, kad tarp moterų, su įvairaus laipsnio intraepiteliniais gimdos kaklelio pakitimais, ŽPV infekuotumas yra 45,5 %. ASC-US atvejais infekcija nustatyta 34,6 %, o esant HSIL 62,1 % moterų [40]. Mūsų atlikto tyrimo metu, moterims su citologinės patologijos diagnoze, infekuotumas žmogaus papilomos virusu nustatytas 81,7 % moterų.

- ASC-US atvejais – 50 %;
- LSIL atvejais – 83,3 %;

- HSIL atvejais – 94,2 %.

Atlikto tyrimo metu, gauti ŽPV infekuotumo duomenys lyginti įvairiose moterų amžiaus grupėse. ŽPV infekcija dažniausiai nustatyta amžiaus grupėse iki 35 metų (34 ir jaunesnėms). Grupėje iki 25 metų nustatytas 100 % moterų infekuotumas, 25-29 metų ir 30-34 metų grupėse šiek tiek mažiau, atitinkamai 87,9 % ir 88 %, tačiau infekuotumas vis tiek išlieka labai aukštas. Taip pat 83,3 % ŽPV teigiamų atvejų buvo nustatyta grupėje, virš 55 metų - tačiau šiuos duomenis nėra tikslinga priskirti prie dažniausiai nustatomų infekcijos atvejų, nes tai tik 5 atvejai bendroje imtyje. Mažiausiai teigiamų ŽPV rezultatų gauta 40-44 metų amžiaus grupėje, kuomet pagal kitų autorių tyrimus, teigiamų ŽPV atvejų mažėja [19,57]. Paul K.S. Chan ir kt. tyrimas taip pat parodė, kad dažniausiai nustatoma ŽPV infekcija moterims iki 30 metų (aukščiausias pikas) [19]. Vėlesniame amžiuje ŽPV infekcijos atvejų skaičius tendencingai mažėja. Įdomu tai, jog Paul K.S. Chan ir kt. savo atliktame tyrime parodė, kad apie 50 - uosius metus (tyrimo duomenimis 46-50 metų amžiaus grupėje) ŽPV atvejų skaičius išauga [19]. Savo atliktame darbe tirdami moteris, kurioms nustatyti citologinės patologijos atvejai, taip pat gavome tą pačią tendenciją, moterų ~50 – uosius metus grupėje (50-54 metų amžiaus grupėje 81,3 % (N=13)), teigiamų ŽPV atvejų skaičiaus padidėjimą. Padidėjęs infekuotumas ŽPV buvo nustatytas ir Ž. Gudlevičienės ir kt. (2010 m.) tyrimo metu [40]. Tai premenopauzinis laikotarpis, todėl galime daryti prielaidą, kad moterys tampa imlesnės infekcijai dėl estrogeno kiekio sumažėjimo, ar menstruacinio ciklo pasikeitimų [20].

Lyginant atskirų ŽPV tipų rezultatus matyti, kad iš moterų, kurioms tyrimo metu nustatytas tik vienas ŽPV tipas, 41,1 % (N=60), žymių intraepitelinių pakitimų HSIL atvejais nustatytas ŽPV 16 tipas, o nežymių intraepitelinių pakitimų (LSIL) atvejais dažniau nustatyti kiti aukštos rizikos, ne 16 ar 18 ŽPV tipai. 60 % (N=3) LSIL atvejų nustatyta ŽPV aukšta rizika. Moterys, kurioms nustatyta, bent viena iš displazijų grupėje ir kurioms buvo nustatytas vienas ar daugiau ŽPV tipų – dviguba infekcija, ŽPV DNR testo metu, 16 ŽPV tipas iš viso sudarė 56,44 %, o 18 ŽPV tipas 6,75 %. Ž. Gudlevičienės ir kt. (2010 m.) [40]. Tyrimo duomenimis moterims, su nustatyta citologine patologija, kurioms nustatytas pavienis ŽPV tipas ar dviguba infekcija, 16 tipo ŽPV nustatyta 64,3 % moterų, o 18 ŽPV tipas 5,4 %. Roche, validuojant Cobas 4800 ŽPV testą, atlikti tyrimai parodė, kad žymių intraepitelinių pakitimų 44 % (N=26) atvejų randamas 16 ŽPV tipas, o 39 % (N=63) nežymių intraepitelinių pakitimų atvejais, kiti ŽPV aukštos rizikos tipai [26,76]. Taip pat tyrimo metu nustatyta, kad testo specifiškumas didžiausias moterų tarpe nuo 21 iki 39 metų [42]. Tai svarbi tyrimo savybė, nes žinoma, kad tokio amžiaus moterys yra daugiausiai infekuotos ŽPV, dėl šiai amžiaus grupei būdingų rizikos veiksnių (aktyvus seksualinis gyvenimas, partnerių kaita, hormoninė terapija ir kt.). Tyrimo metu taip pat analizuotas ir ŽPV tipų

pasiskirstymas pagal moterų amžių. Daugiausia ŽPV 16 tipo atvejų nustatyta 25-29 ir 30-34 metų amžiaus grupėse, atitinkamai 14,8 % ir 18,1 %. Iki 25 metų amžiaus ir daugiau nei 55 metų amžiaus grupėse 16 ŽPV tipo atvejų nustatyta vienodai po 3,2 %. 35-39 metų ir 40-44 metų amžiaus grupėse 16 ŽPV tipas sudaro tik atitinkamai, 6,5 % ir 4,5 % atvejų. ŽPV 18 tipo daugiausia atvejų nustatyta 35-39 metų amžiaus grupėje 1,9 %, tačiau tai tik 3 moterys bendroje imtyje. Aukštos rizikos, kiti ne 16 ar 18 ŽPV tipai, įvairiose amžiaus grupėse pasiskirstė panašiai, galima būtų išskirti tik 30-34 metų ir 35-39 metų amžiaus grupes. Jose kiti, ne 16 ar 18, aukštos rizikos tipai nustatyti dažniausiai, atitinkamai 18,1 % ir 10,3 %. Išanalizavus tyrimo duomenis, matome, kad didžiausia ŽPV tipų įvairovė, moterų su gimdos kaklelio patologija, nustatyta grupėse nuo 25-29 metų iki 40-44 metų. S. Brismar – Wendel ir kt. [13] Stokholme atlikto tyrimo, su prevencinėje gimdos kaklelio patikros programoje dalyvavusių moterų, įvairiose amžiaus grupėse, duomenimis 16 ŽPV tipas nustatomas dažniausiai jauno amžiaus, grupėse 20 – 24 ir 25 – 29 metų moterims, atitinkamai 25 % ir 27 %. 30 – 34 ir 35 – 39 metų amžiaus grupėse ŽPV 16 tipas nustatomas rečiau, atitinkamai 17 % ir 15 %. Nuo 40 metų 16 ŽPV tipo nustatymo dažnis mažėja, iki 50 metų, po to vėl padidėja keliais procentais. 18 ŽPV tipo atvejų daugiausia nustatyta 20 – 24 metų grupėje 14 % [13].

Remiantis citologine diagnoze, mūsų tyrimo metu gauti rezultatai parodo, kad HSIL atvejais 16 ŽPV tipas, esant pavieniams tipams ar dvigubai infekcijai – 16/18 ir 16/ aukšta rizika, nustatomas 58,1 %, o ASC – US 50 % moterų. Ž. Gudlevičienės ir kt. (2010 m.) atlikto tyrimo duomenimis HSIL atvejais 16 ŽPV tipas nustatytas 77,8 %, o ASC – US atvejais 50 % moterų [40.]

Išanalizavome ir ŽPV nustatytų tipų kiekį, pavienis tipas ar dviguba ŽPV infekcija. Mūsų tyrimo metu gautus duomenis lyginome su Julia W. Gargano ir kt. atlikto tyrimu. Rezultatai parodė, kad kelis ŽPV tipus turinčių moterų, daugiausia yra iki 35 metų amžiaus grupėse. Julia W. Gargano ir kt. tyrimo metu nustatyta, jog daugiau nei vieną ŽPV tipą turinčių moterų daugiausia, < 30 metų amžiaus grupėje. Taip pat gauti panašūs rezultatai lyginant 18 ŽPV tipo paplitimą amžiaus grupėse. Julia W. Gargano ir kt. tyrime nustatyta, jog 18 ŽPV tipas dažniau nustatomas vyresnėms moterims. Atliktame tyrime taip pat parodėme, kad 18 ŽPV tipas dažniau nustatytas amžiaus grupėse virš 35 metų.

Tyrimo metu išanalizuota kiek procentų atvejų nustatytas ŽPV virusas esant gimdos kaklelio patologijai – ikivėžiniams pakitimams. Buvo nustatyta, kad moterims, su gimdos kaklelio pakitimams, ŽPV infekcija aptikta 93,3 % (N=152). Taigi tik 6,7 % (N=11) tyrime dalyvavusių moterų turinčių gimdos kaklelio patologiją, nebuvo aptikta ŽPV infekcija. Ž. Gudlevičienės ir kt. (2005 m.) [39] tyrimo duomenys esant gimdos kaklelio vėžiui, parodė panašų, moterų ŽPV infekuotumo procentą Lietuvoje 92,7 %, kaip ir mūsų atliktas tyrimas [39]. Taip pat kitų autorių analizuoti įvairių šalių infekuotumo duomenys, esant gimdos kaklelio vėžiui, skyrėsi

nežymiai: Marokas 94,6 % (N. Chaouki ir kt. 199m.) , Filipinai 93,8 % (C. Ngelangel ir kt. 1998 m.) ir kt [39].

Atliktame tyrime turime mažą ASC-US ir LSIL atvejų kiekį (N=8), taigi sunku vertinti ar esant šiems atvejams ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų rezultatai labai tikslūs. Tačiau iš gautų duomenų matome, jog ASC-US atvejais ŽPV DNR ir Cintec Plus teigiamų ir neigiamų rezultatų kiekis pasiskirstė tolygiai po 50 % (bendras skaičius ASC-US atvejų visoje imtyje N=2), lyginant su Hans Ikenberg ir kt. (angl. PALMS – Primary ASC-US, LSIL Marker Study) [46] tyrimo duomenimis patikimesnis yra ŽPV DNR tyrimas, tačiau Cintec Plus tyrimo didesnis specifiškumas [46]. Atlikto tyrimo duomenimis LSIL atvejais ŽPV DNR tyrimas patikimesnis nei Cintec Plus, atitinkamai (teigiamų ŽPV DNR nustatyta 83,3 %, o Cintec Plus atvejų tik 33,3 %, esant patologinei citologijai), lyginant su Ikenberg ir kt. (angl. PALMS) tyrimo duomenimis, įvairaus amžiaus grupėse, ŽPV tyrimo metu taip pat gauti patikimesni duomenys[46].

Nagrinėjant atlikto tyrimo duomenis iš naujo buvo įvertinti tyrimo metu gauti išimtiniai atvejai. Pakartotinai peržiūrėti 11 ThinPrep PAP preparatų. 8 ThinPrep PAP preparatai, kuriuose nustatyti HSIL atvejai ir Cintec Plus preparatai, kurie buvo teigiami ir kurių atvejais buvo gauti neigiami ŽPV DNR tyrimo rezultatai. Taip pat 1 ASC-US atvejis, kai ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimai yra neigiami ir 1 LSIL atvejis, kai ŽPV DNR yra neigiamas, Cintec Plus tyrimas teigiamas. Pakartotinai peržiūrėjus preparatus, buvo pastebėta keletas faktorių, kurie galėjo turėti įtakos ŽPV DNR tyrimui ir jo rezultatams. Trijuose preparatuose, vertinant mikroskopiškai aptiktas didelis kraujo kiekis, kuris buvo matomas ir terpėje įvertinus mėginį vizualiai (makroskopiškai). Taigi kraujas galėjo būti vienas iš faktorių nulėmęs klaidingus, netikslius ŽPV DNR tyrimo rezultatus. Roche, klinikiniais tyrimais, kuriais buvo siekta validuoti cobas 4800 ŽPV testą, įrodyta kraujo įtaka, esant tam tikrai jo koncentracijai, ŽPV DNR testui. Buvo atlikti tyrimai, kurių metu kraujingi mėginiai buvo praskiedžiami ir esant įvairiai kraujo procentiniam koncentracijai vertinti ŽPV DNR testo rezultatai. Įrodyta, kad esant didesniai, nei 2 % kraujo kiekiui bendrame Preservcyt (konservantas naudojamas ThinPrep terpėje) tirpalo tūryje, jis turi įtakos ŽPV DNR tyrimo rezultatams [80].

Kitas faktorius yra ThinPrep terpės stabilumas – kiek laiko mėginys paimtas į terpę yra tinkamas atlikti ŽPV DNR tyrimui. Tyrimo metu ŽPV DNR tyrimas buvo atliekamas tik surinkus 22 mėginius, kurie buvo renkami nuo kelių dienų iki kelių savaičių. Tai galėjo padaryti įtaką ŽPV DNR tyrimo rezultatams. Terpės stabilumas, pažeidus jos sandarumą ir paėmus į ją mėginį, nurodomas skirtingai įvairiuose literatūros šaltiniuose [67]. Gamintojo (Hologic) rekomendacijose nurodoma, kad terpės tinkamumas ŽPV DNR tyrimui yra 14 dienų kambario temperatūroje, nuo mėginio paėmimo. Atlikti klinikiniai tyrimai parodė, kad darant PAP tepinėlį ir ŽPV DNR tyrimą iš

tos pačios terpės, jos stabilumas yra nuo 6 savaičių iki trijų mėnesių [64]. Kiti tyrimai nustatė, kad apdorojant kraujingus mėginius ledine acto rūgštimi (siekiant lizuoti eritrocitus), net 45 % mėginių tampa netinkami ŽPV DNR tyrimui, ypač kai juos reikia atlikti vėliau, o ne iš karto, tik paėmus mėginį [67].

Laštelingumas ir laštelių tipas. Pagal gamintojo metodikas nenurodoma, kad tyrimo rezultatui įtakos turi laštelių kiekis, nes PGR reakcijai pakanka ir labai mažo tiriamosios medžiagos kiekio. Cobas 4800 ŽPV testas esant per mažam laštelių kiekiui, turi apsaugą nuo nepatikimo tyrimo rezultato – tai integruota laštelinė kontrolė, betaglobino DNR, kuri randama visose žmogaus laštelėse [80]. Jeigu atliekant tyrimą reakcijos metu neišsiskiria betaglobino kontrolė, analizatorius tyrimo atsakymą pateikia kaip negaliojantį (angl. „invalid“). Tai reiškia, kad tiriamosios medžiagos tyrimui buvo per mažai ir toks tyrimo rezultatas nevertinamas. Kadangi beta globino genas yra visose žmogaus laštelėse, galime teigti, kad laštelių tipas (plokščiojo epitelio ar liaukinio epitelio laštelės) tyrimo rezultatams reikšmės neturi, svarbu kad tiriamoji medžiaga būtų paimta iš tinkamos gimdos kaklelio zonos (transformacijos zonos), kurioje dažniausiai aptinkama ŽPV infekcija.

Vertinant Cintec Plus ir ŽPV DNR tyrimų tarpusavio priklausomybę, statistiškai reikšmingai patvirtintas vidutinio stiprumo ryšys tarp šių tyrimų rezultatų (Spirmano koreliacija 0,612, $p < 0,05$ ir Pirsono asociacijos koeficientas $r = 0,59$), ypač HSIL atvejais. Tai rodo, kad abu tyrimai yra patikimi nustatant gimdos kaklelio patologiją.

Apskaičiavus prognostines tyrimų vertes, nustatyta, kad HSIL atvejais, Cintec Plus tyrimo teigiama neigiama prognostinės vertės yra didesnės lyginant su ŽPV DNR prognostinėmis vertėmis, atitinkamai: Cintec Plus TPV - 97,40%, NPV - 86,84%, ŽPV DNR TPV - 92,99%, NPV - 86,84, o Cintec Plus tyrimo tikslumas atsižvelgiant į plotą po ROC kreive (Cintec Plus – 0,930, ŽPV DNR – 0,822) geresnis.

5. IŠVADOS

1. Įvertinus gimdos kaklelio pakitimus įvairaus amžiaus moterų grupėse, daugiausia pakitimų nustatyta 30-34 metų amžiaus grupėje, tačiau statistiškai reikšmingų amžiaus skirtumų tarp pacienčių, kurioms diagnozuota displazija nenustatyta.
2. Įvertinus ŽPV DNR tyrimo rezultatus pagal moterų amžių, nustatytas statistiškai reikšmingas amžiaus ir ŽPV teigiamo rezultato ryšys - tarp mažiausią teigiamų ŽPV DNR tyrimo rezultatų dažnį turinčios amžiaus grupės (40-44) ir didžiausią teigiamų ŽPV DNR tyrimo rezultatų dažnį turinčios amžiaus grupės (30-34). Įvertinus skirtingų aukštos rizikos ŽPV tipų pasiskirstymą pagal moterų amžiaus grupes, statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatyta.
3. Atsižvelgiant į citologinio ThinPrep PAP tyrimo rezultatus ir ŽPV infekcijos paplitimą ASC-US diagnozės atveju, dėl mažos tiriamųjų imties, statistiškai reikšmingų rezultatų, tarp ŽPV DNR ir citologinio ThinPrep PAP tyrimų rezultatų - nenustatyta ($p=0,35$, $p<0,05$). LSIL, HSIL ir IPPN citologinio tyrimo diagnozių atvejais, nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp citologinio ir ŽPV DNR tyrimų rezultatų ($p<0,001$).
4. Atsižvelgiant į citologinio ThinPrep PAP ir Cintec Plus tyrimų rezultatus ASC-US diagnozės atvejais, dėl mažos tiriamųjų imties, statistiškai reikšmingų rezultatų, tarp citologinio ir Cintec Plus tyrimų rezultatų nenustatyta ($p=0,13$, $p<0,05$), o LSIL, HSIL ir IPPN atvejais, nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp citologinio ir imunocitocheminio Cintec Plus tyrimo rezultatų ($p<0,001$).
5. Įvertinus sąsajas tarp ŽPV DNR ir Cintec Plus tyrimų rezultatų, nustatytas vidutinio ryšio stiprumas tarp šių tyrimų ($0,612$; $p<0,05$; $r=0,59$). Tai rodo, kad abu tyrimai yra patikimi, diagnozuojant gimdos kaklelio pakitimus.

SUMMARY

Clinical value of the Cintec Plus immunocytochemistry test for the diagnosis of cervical pathology, comparing with the results of Thinprep PAP and human papiloma virus DNA tests

Infection by the human papillomavirus (HPV) is the most important risk factor for cervical cancer. HPV is a group of more than 150 related viruses. Cervical cancer screening is usually part of a woman's health checkup. There are several types of tests: ThinPrep PAP test, the HPV test and Cintec Plus test.

The aim of this study was to evaluate the diagnostic performance of the Cintec Plus immunocytochemistry test in detecting precancerous cervical disease compared to HPV testing and more traditional screening methods like Pap cytology.

The objectives:

1. Assess the relationship between cervical lesions and woman's age.
2. To assess the relationship between the HPV DNA test results and the specific type of HPV and the age of women.
3. Determine the relationship between the cytology PAP test outcome and the prevalence of HPV infection.
4. Determine the relationship between the cytology PAP test results and the Cintec Plus test results.
5. To evaluate the relationship between HPV DNA and Cintec Plus test results for cervical pathology.

Methods. A total of 192 samples were collected from women who attending routine cervical cancer screening between April 2015 and November 2015. ThinPrep PAP cytology, p16/Ki-67 immunostaining, and cobas HPV DNA testing were performed on all women. HPV-DNA detection was performed by cobas HPVtest for 14 high oncogenic risk HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 DNA in the clinical material (cervical swabs).

Results There were no statistically significant differences in age between patients diagnosed with dysplasia. The association between the age range and the HPV positive result of the HPV DNA test

in women's age was found among the age group (40-44) and the highest age group with a positive HPV DNA test (30 -34). A statistically significant relationship was found between cytological diagnosis (LSIL, HSIL and IPPN) and HPV DNA test results ($p < 0,001$). A statistically significant relationship was found between the cytological diagnosis and immunocytochemical results of Cintec Plus ($p < 0.001$).

Keyword. ThinPrep PAP smear, HPV, Cintec Plus test; cervical cancer.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Alam S, Conway MJ, Chen HS and Meyers C. The Cigarette Smoke Carcinogen Benzo[*a*]pyrene Enhances Human Papillomavirus Synthesis. DOI:10.1128/JVI.01813-07, 2008. P. 1053-1058.
2. Alves VA, Bibbo M, Schmitt FC, et al. A comparison of manual and automated methods of liquid-based cytology. A morphologic study. *Acta Cytol.* DOI: 10.1159/000326314, 2004.
3. Ambrozaitis. A. Infekcinių ligų vadovas. Vilnius: Vaistų žinios I-kla; 2010. p. 467-475.
4. Amerikos vėžio organizacija. Interneto prieiga: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html#references>;
5. Ancuța E, Ancuța C, Cozma LG, Iordache C, Anghelache-Lupașcu I, Anton E et al. Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression. *Journal of Morphology and Embryology* 2009, 50(3): p. 413–418.
6. Arbyn M, Anttila A, Jordan J. etc. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document, 2010.
7. Arbyn M, Snijders P. J. F, Meijer C. J. L. M, Berkhof J, Cuschieri K, B. Kocjan J et al. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clinical Microbiology and Infection.* DOI: 10.1016/j.cmi.2015.04.015, 2015. p. 817-826.
8. Bagušytė L, Barilienė S, Basevičius A, Buinauskienė J, Celiešiūtė J, Česnavičienė D, ir kt. *Akušerijos, ginekologijos ir neonatologijos praktikos darbų vadovas.* 2012.
9. Baker A. The availability of data on risk factors associated with cervical cancer. *Alban Med J* 2:83-91, 2014.
10. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology.* DOI: 10.1016/j.jcv.2004.12.008, 2005.
11. Bethesda gairės. Interneto prieiga: <http://screening.iarc.fr/atlasclassifbethesda.php>.
12. Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. 1(1): 2–10, 2008.
13. Brismar-Wendel S, Froberg M, Hjerpe A, Andersson S and Johansson B. Age-specific prevalence of HPV genotypes in cervical cytology samples with equivocal or low-grade lesions. *British Journal of Cancer.* DOI: 10.1038/sj.bjc.6605165, 2009. p. 511-517.
14. Britt K. Erickson, Ronald D. Alvarez, and Warner K. Huh. Human Papillomavirus: What Every Provider Should Know. *Am J Obstet Gynecol.* DOI:10.1016/j.ajog.2012.09.007, 2013.

15. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World, 2017. [Date Accessed].
16. Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL et al. Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31, 35, 52, and 58, Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16. *Journal of virology*. DOI: 10.1128/JVI.79.21.13630-13640.2005, 2005. p. 13630–13640.
17. Castellsague X, Muñoz N. Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis—Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking, *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. (31):20-8, 2003.
18. Castle. P. E. How Does Tobacco Smoke Contribute to Cervical Carcinogenesis? *Journal of virology*. DOI:10.1128, 2008, p. 6084–6086.
19. Chan PKS, Chang AR, Yu MY, Li WH, Chan MYM Yeung ACM et al. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. *International Journal of Cancer*. DOI: 10.1002/ijc.24731, 2010. p. 297–301.
20. Chung SH, Franceschi S and Lambert PF. Estrogen and ER α : Culprits in Cervical Cancer? *Am J Obstet Gynecol*. DOI:10.1016/j.tem.2010.03.005, 2010.
21. Cibas ES.; Ducatman BS. *Cytology. Diagnostic principles and clinical correlates* (Third edition). Philadelphia, 2009. p. 5-53.
22. Cintec Plus cytology. Interpretation guide, Roche, 2016.
23. Cobas[®] 4800 HPV Test [package insert, CE]. Branchburg, NJ: Roche Molecular Systems, Inc; 2012.
24. Coffey K, Beral V, Green J, Reeves G and Barnes I on behalf of the Million Women Study Collaborators. Lifestyle and reproductive risk factors associated with anal cancer in women aged over 50 years. *British Journal of Cancer*. DOI: 10.1038/bjc.2015.89, 2015.
25. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*. DOI: 10.1016/j.virol.2013.06.007, 2013.
26. Cui M, Chan N, Liu M, Thai K, Malaczynska J, Singh Ila et al. Clinical Performance of Roche Cobas 4800 HPV Test. *Journal of Clinical Microbiology*. DOI: 10.1128/JCM.00883-14, 2014. p. 2210 –2211.
27. DeMello, A.J., DNA amplification moves on, *Nature*, 2003. p. 28-29.
28. 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, ISSN 1392-1312.

29. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083, 2012. p. F55–F70.
30. Drašutienė G. Akušerija ir ginekologija šeimos gydytojo praktikoje. Vilnius: Vaistų žinios I-kla; 2005. p. 697-825.
31. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening Second edition – Supplements.
32. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. DOI: 10.1002/ijc.29210, 2015.
33. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 49:1374-403, 2013.
34. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. DOI: 10.5402/2011/847684, 2011.
35. Gargano JW, Nisenbaum R, Lee DR, Ruffin MT, Steinau M, Horowitz IR et al. Age-group Differences in Human Papillomavirus Types and Cofactors for Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 Among Women Referred to Colposcopy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. DOI: 10.1158/1055-9965, 2012.
36. Gibb RK, Marten MG. The Impact of Liquid-Based Cytology in Decreasing the Incidence of Cervical Cancer. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2011.
37. 14.Gimdos kaklelio vėžio epidemiologija. Interneto prieiga: <https://www.eurocytology.eu/en/course/953>;
38. Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future microbiol*. DOI:10.2217/fmb.10.107, 2010. p. 1493-1506.
39. Gudlevičienė Ž, Didžiapetrienė J, Sužiedėlis K, Lapkauskaitė L. Žmogaus papilomos viruso, jo tipų ir variantų tyrimai. *Medicina (Kaunas)* 2005; 41(11). p. 910-915.
40. Gudlevičienė Ž, Šepetienė A, Didžpetrienė J, Valuckas KP, Smailytė G, Drašutienė G ir kt. Infekuotumas atskirų žmogaus papilomos tipų virusais esant intraepitelinių gimdos kaklelio pokyčių. *Medicina (Kaunas)* 46(9):616-23, 2010. p. 616-623.
41. Guenat D, Launay S, Riethmuller D, Mouglin C and Prétet JL. Validation of Novaprep® HQ+ liquid-based cytology medium for high-risk human papillomavirus detection by hc2. . *Infectious Agents and Cancer*. DOI 10.1186/s13027-016-0092-7, 2016.

42. Heideman DAM, Hesselink AT, Berkhof J, Van Kemenade F, Melchers WJG, Fransen Daalmeijer N et al. Clinical Validation of the cobas 4800 HPV Test for Cervical Screening Purposes. *Journal of Clinical Microbiology*. DOI:10.1128/JCM.05552-11, 2011. p. 3983–3985.
43. Horvath CAJ, Boulet GAV, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. Horvath et al. *Virology Journal*. DOI: 10.1186/1743-422X-7-11, 2010.
44. Howell-Jones R, Bailey A, Beddows A, Sargent A, De Silva N, Wilson G, et al. Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England. US National Library of Medicine. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605747, 2010. p. 209-216.
45. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. DOI:10.1016/j.virol.2008.11.017, 2009. p. 324-334.
46. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C et al. Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst*. DOI: 10.1093/jnci/djt235, 2013. p. 1550-1557.
47. Inčiūra A, Juozaitytė E. Gimdos kaklelio vėžio diagnostikos bei gydymo gairės. 2003.
48. Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee JA, Fielding S, Hannaford PC. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *American journal of obstetrics and gynecology*. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.02.002, 2017. p. 580.e1–580.e9.
49. Yong Tan S, Tatsumura Y. George Papanicolaou (1883–1962): Discoverer of the Pap smear. *Singapore Med J*. DOI: 10.11622/smedj.2015155, 2015. p. 586-587.
50. Jarienė K, Čigriejienė V. Gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos kai kurie diagnostikos bei gydymo aspektai (literatūros apžvalga). *MEDICINA* (2002) 38. P. 876-887.
51. Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology*. DOI: 10.1016/j.virol.2008, 2009. p. 360-368.
52. Kasnauskienė J. Viso žmogaus genomo analizės metodai. ISBN 978-609-417-082-9, 2014, p. 71-93.
53. Kastys. J. Gimdos kaklelio vėžys: išsigelbėjimo pamatai klojami vaikystėje. *Lietuvos gydytojo žurnalas*. 2010 Nr.3 (27). p. 16-23.
54. Kenyon S, Sweeney BJ, Happel J, Marchilli GE, Weinstein B and Schneider D. Comparison of BD Surepath and ThinPrep Pap Systems in the Processing of Mucus-Rich Specimens. *Cancer Cytopathology*, DOI: 10.1002/ency.20096, 2010, p. 244-249.

55. Kinde I, Bettgowda C, Wang Y, Wu J, Agrawal N, Shih I et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou Test to Detect Ovarian and Endometrial Cancers. *Sci Transl Med*. DOI:10.1126, 2013.
56. Kim HS, Kim TJ, Lee IH, Hong SR. Associations between sexually transmitted infections, high-risk human papillomavirus infection, and abnormal cervical Pap smear results in OB/GYN outpatients. *Journal of gynecologic oncology*. DOI: 10.3802/jgo.2016.27.e49, 2016.
57. Kitchener HC, Almonte M, Wheeler P, Desai M, Gilham C, Bailey A et al. HPV testing in routine cervical screening: cross sectional data from the ARTISTIC trial. *British Journal of Cancer*. DOI:10.1038/sj.bjc.6603210, 2006. p. 56–61.
58. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S and Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathology*. DOI: 10.1186/1746-1596-4-22, 2009.
59. Lietuvos respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas dėl atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programos atlikimo metodikos patvirtinimo.
60. Lietuvos respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas dėl gimdos kaklelio piktybinių navikų prevencinių priemonių, apmokamų iš privalomojo sveikatos draudimo fondo biudžeto lėšų, finansavimo programos patvirtinimo.
61. Majid ES, Henley J, Lopez AD and Thun MJ. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. DOI: 10.1002/ijc.21100, 2005. p. 963-971.
62. Maniar, K, Glob W, J. Pathology of Cervical carcinoma. *Libr. women's med.*, 2017; DOI 10.3843(ISSN: 1756-2228).
63. Manley KM, Simms RA, Platt S, Patel A and Bahl R. Unsatisfactory colposcopy: clinical decisionmaking in conditions of uncertainty. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. DOI 10.1186/s12911-017-0516-3, 2017.
64. Maucort – Boulch D, Franceschi S, Plummer M and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. International correlation between human papillomavirus prevalence and cervical cancer incidence. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2691, 2008.
65. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathogens*, DOI: 10.1371/journal.ppat.1006211, 2017.
66. McLaughlin-Drubin ME, Münger Karl. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. DOI:10.1016/j.virol.2008.10.006, 2009. p. 335-344.

67. McMenamin M and McKenna M. Stability of Human Papillomavirus (HPV) in Cervical ThinPrep Specimens Previously Lysed With Glacial Acetic Acid. DOI: 10.1002/cncy.21377, 2013. Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
68. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. DOI: 10.1016/j.jcv.2004.12.004, 2005. p. 43-51.
69. Nacionalinis vėžio institutas. Interneto prieiga: http://www.nvi.lt/?page_id=3261&lang=lt;
70. Nacionalinis vėžio institutas. Interneto prieiga: <http://www.nvi.lt/wpcontent/uploads/2016/01/Apiegimdosvezi.pdf>;
71. Niccolai ML, Julian PJ, Meek JI, McBride V, Hadler JL and Sosa LE. . Declining Rates of High-Grade Cervical Lesions in Young Women in Connecticut, DOI: 10.1158, 2013.
72. Obwegeser JH, Brack S. Does liquid-based technology really improve detection of cervical neoplasia? A prospective, randomized trial comparing the ThinPrep Pap Test with conventional pap test, including follow-up of HSIL cases. *Acta Cytol*. DOI: 10.1159/000328292, 2001.
73. Pan D, Wei K, Ling Y, Su S, Zhu M and Chen G. The Prognostic Role of Ki-67/MIB-1 in Cervical Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Medical Science* 2015; 21: p. 882-889.
74. Pasaulinė sveikatos organizacija. Interneto prieiga: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>;
75. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *AKMMC J*. DOI: 10.3329/akmmcj.v4i1.13682, 2013. p. 30-36.
76. Rao A, Young S, Erlich H, Boyle S, Krevolin M, Sun R et al. Development and Characterization of the cobas Human Papillomavirus Test. *Journal of Clinical Microbiology*. DOI: 10.1128/JCM.03386-12, 2013. p. 1478 –1484.
77. Reinson T, Henno L, Toots M, Ustav M. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. *PLoS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0131675, 2015.
78. Ryndock E and Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? Expert review of Anti – infective therapy. DOI: 10.1586/14787210.2014.959497 2014, p. 1165-1170.
79. Roche Molecular Diagnostics. 2009. cobas 4800 system manual 1.0. Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA.
80. Roche Molecular Systems, Inc. cobas HPV Test Labeling Draft Package Insert Pleasanton, CA 94588-2722.

81. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.013, 2013. p. 138-168.
82. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohor. *PLOS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0147029 2016, 2016.
83. Sabeena S, Bhat P, Kamath V and Arunkumar G. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *The journal of Obstetrics and Gynaecology research*. DOI: 10.1111/jog.13248, 2017. p. 429-435.
84. Schu J, Espina C, Villain P, Herrero R, Leon ME, Minozzi S et al. European Code against Cancer 4th Edition: 12 ways to reduce your cancer risk. *Cancer Epidemiology. The International Journal of Cancer Epidemiology, Detection, and Prevention*. DOI: 10.1016/j.canep.2015.05.009, 2015.
85. Seaman WT, Andrews E, Couch M, Kojic EM, Cu-Uvin S, Palefsky J et al. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virology Journal*. DOI: 10.1186/1743-422X-7-194, 2010.
86. Sellors JW, Sankaranarayanan R.. *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual*. ISBN- 13, 978-92-832-0412-1, 2003, p. 29-36.
87. Shaw PA. The History of Cervical Screening I: The Pap. Test. *J Soc Obstet Gynaecol Can*. 22(2): 110-14. 2000.
88. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-2119 DOI:10.1001.
89. Suresh Pawar P, Uday Gadkari R, Swami SY and Joshi AR. Comparative study of manual liquid-based cytology (MLBC) technique and direct smear technique (conventional) on fine-needle cytology/fine-needle aspiration cytology samples. *Journal of cytology*. 31:83-6, 2014. p. 83 – 86.
90. Švedas E., Barsiūnienė B, Vaitkienė D, Bartusevičius A, Inčiūra A, Jonaitienė E, ir kt. *Onkoginekologija*. 2007. 69-77p.
91. Tadesse Kebede S. Socio-economic and cultural vulnerabilities to cervical cancer and challenges faced by patients attending care at Tikur Anbessa Hospital: a cross sectional and qualitative study. *BMC Women's Health*. DOI 10.1186/s12905-015-0231-0, 2015.
92. Teame H, Addissie A, Ayele W, Hirpa S, Gebremariam A, Gebreheat G. Factors associated with cervical precancerous lesions among women screened for cervical cancer in Addis Ababa, Ethiopia: A case control study. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0191506, 2018.

93. ThinPrep 2000 procesor operator's manual (Hologic), 2011.
94. Vaccarella S, Franceschi S, Zaridze D, Poljak M, Veerus P, Plummer M. Preventable fractions of cervical cancer via effective screening in six Baltic, central, and eastern European countries 2017–40: a population-based study. *Lancet Oncol.* DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30275-3, 2016. p. 1445-1452.
95. Vaitkevičiūtė J, Petkevičius V, Klumbienė J. Lietuvos moterų dalyvavimas gimdos kaklelio ir krūties vėžio prevencinėse patikrose 2004–2014 m. *Žurnalas „Visuomenės sveikata“*, 2015, 33-39 p.
96. Ventana BenchMark GX Operator Manual (Ventana medical systems, Inc.), Cintek Plus staining kit package, 2010.
97. Von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Research.* DOI: org/10.1016/j.pvr.2015.06.006, 2015.
98. Williams JH, Carter SM, Rychetnik L. ‘Organised’ cervical screening 45 years on: How consistent are organised screening practices? *European Journal of Cancer.* DOI: 10.1016/j.ejca.2014.09.005, 2014. p. 3029-3038.
99. Williams VM, Filippova M, Soto U and Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* DOI: 10.2217/fvl.10.73, 2011. p. 45-57.
100. Zekan J and etc. Oncogenic aspect of HPV infections of the female genital tract. DOI: 10.5772/19165, 2011.
101. Zhao W, Hao M, Wang Y, Feng N, Wang Z, Wang W et al. Association between folate status and cervical intraepithelial neoplasia. *European Journal of Clinical Nutrition.* DOI: 10.1038/ejcn.2016.35, 2016. p. 837-842.
102. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W and Zhu X. Chlamydia Trachomatis Infection Associated Risk of Cervical Cancer. *Medicina (Baltimore).* DOI: 10.1097/MD.0000000000003077, 2016.