

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**INDIVIDUALIAIS PAĖMĖJ AIS SURINKTOS MEDŽIAGOS
TINKAMUMO VERTINIMAS ŽMOGAUS PAPILOMOS VIRUSO (ŽPV)
DNR NUSTATYTI BEI ŽPV INFEKCIJOS SĄSAJA SU KITOMIS LYTINIŲ
TAKŲ INFEKCIJOMIS**

Magistrantė URŠULĖ MIKNEVIČIŪTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovė
Dr. S. Kiverytė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
ir laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr. prof. Z. Kučinskienė _____
leidžiama ginti (parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

2016 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
IVADAS.....	4
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Gimdos kaklelio vėžio paplitimas.....	6
1.2. Gimdos kaklelio vėžio išsivystymo rizikos veiksniai.....	7
1.3. Žmogaus papilomos virusas.....	9
1.3.1. ŽPV tipai ir genomai.....	9
1.3.2. ŽPV infekcija.....	10
1.3.3. ŽPV karcinogenezė.....	11
1.3.4. ŽPV DNR integracija į šeimininko genomą.....	13
1.4. ŽPV imuninio atsako išvengimas.....	13
1.5. ŽPV nustatymas.....	14
1.5.1. ŽPV prevencijos programos ir jose taikomi ŽPV aptikimo metodai.....	15
1.5.2. ŽPV aptikimas individualiais paėmėjais surinktoje medžiagoje.....	16
1.7. ŽPV ir kitos lytinių takų infekcijos.....	17
1.7.1. ŽPV ir Chlamydia trachomatis.....	18
1.7.2. ŽPV ir bakterinė vaginozė.....	18
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	20
2.1. Tyrimo medžiaga.....	20
2.2. ŽPV nustatymas.....	20
2.2.1. Mėginio paruošimas.....	20
2.2.2. DNR išskyrimas.....	20
2.3. Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (TR-PGR).....	22
2.3.1. ŽPV tipų nustatymas Anyplex II HPV28 rinkiniu.....	22
2.3.1. TL-PGR mišinio paruošimas ir reakcijos vykdymas.....	25
2.3.2. TL-PGR duomenų analizė.....	26
2.3. Papildomi tyrime naudoti duomenys.....	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	28
3.1. Bendrosios charakteristikos.....	28
3.2. ŽPV nustatymas ir sąsajos su kitais veiksniais.....	28
3.2.1. ŽPV nustatymas gydytojo ir moters paimtuose mėginiuose.....	28
3.2.2. ŽPV tipo sąsaja su moters amžiumi.....	31
3.2.3. ŽPV tipo sąsaja su moters lytinio gyvenimo pradžia.....	31
3.2.4. ŽPV tipo sąsaja su moters lytinių partnerių skaičiumi.....	32
3.2.5. ŽPV tipo sąsaja su gimdymu.....	33
3.2.6. ŽPV tipo sąsaja su rūkymu.....	34
3.2.7. ŽPV tipo sąsaja su moters naudojama apsaugos nuo nėštumo priemone.....	35
3.2.8. ŽPV infekcijos sąsaja su drėgno tepinėlio rezultatais.....	35
3.2.9. ŽPV infekcijos sąsaja su pasėlio iš gimdos kaklelio rezultatais.....	36
3.3. Rezultatų aptarimas.....	38
3.3.1. Moters ir gydytojo surinktų mėginių rezultatų palyginimas.....	38
3.3.2. Įvairių veiksnių įtakos ŽPV infekcijai rezultatų palyginimas.....	40
IŠVADOS.....	41
REKOMENDACIJOS.....	42
SUMMARY.....	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	45

SANTRUMPOS

APL – antigeną pateikiančios ląstelės;

AR-ŽPV – aukštos onkogeninės rizikos ŽPV;

ASC-US – (angl. *Atypical Squamous Cells – Undetermined Significance*) nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės;

BV – bakterinė vaginozė;

DL – dendritinės ląstelės;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

HSIL – (angl. *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions*) ryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai;

IC – vidinė kontrolė;

IFN – interferonas;

LL – Langerhanso ląstelės;

LPL – lytiškai plintančios ligos;

LSIL – (angl. *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions*) neryškūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai;

LTI – lytinių takų infekcijos;

NILM – (angl. *Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy*) intraepitelinių pokyčių, piktybinio naviko nėra (norma);

Pap – Papanicolaou citologinis tepinėlis;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

RNR – ribonukleorūgštis;

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija;

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas;

ŽPV – žmogaus papilomos virusas;

ŽR-ŽPV – žemos onkogeninės rizikos ŽPV.

IVADAS

Gimdos kaklelio vėžys – antras pagal dažnį (po krūties vėžio), piktybinis moterų navikas pasaulyje, kurio svarbiausias rizikos veiksnys, lemiantis vėžio išsivystymą, yra žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija lytiniuose takuose [1,2]. Pagrindinis kovos su šio tipo vėžiu būdas – tinkamai atliekama patikros programa, kad liga būtų diagnozuojama ankstyvose stadijose ir taikomas gydymas, siekiant užkirsti kelią ligos progresavimui. Šiuo metu yra siekiama padidinti vykdomų patikros programų, skirtų aptikti gimdos kaklelio vėžį, jautrumą, taikant naujus metodus ir pasiūlyti naujus algoritmus diagnostiniams ir terapiniams sprendimams [3]. Kelis pastaruosius dešimtmečius gimdos kaklelio vėžio citologinis tyrimas buvo laikomas patikimiausiu ir ekonomiškiausiu patikros gimdos kaklelio vėžio prevencijos programos metodu. Tačiau gimdos kaklelio citologinio tyrimo jautrumas žemas [4]. Citologinio tyrimo įtaka gimdos kaklelio epidemiologijai pasiekė ribą ir nebegali pagerinti gimdos kaklelio vėžio prevencijos. ŽPV tyrimai leidžia geriau ir greičiau įvertinti gimdos kaklelio vėžio riziką, nei citologinis tyrimas. Pastaraisiais metais įrodyta, kad ŽPV DNR tyrimas yra tinkamas pirminio gimdos kaklelio vėžio patikrai atlikti ir ŽPV DNR nustatymu pagrįsta gimdos kaklelio vėžio patikra nuo gimdos kaklelio vėžio apsaugo 60-70 % geriau, nei citologinis tyrimas [5].

Keletą dešimtmečių efektyviai vykdžius patikrą gimdos kaklelio citologiniais tyrimais, ŽPV tyrimas pripažįstamas vis labiau tinkama priemone vykdyti gimdos kaklelio vėžio patikros programą [3,6,7]. Molekulinius ŽPV DNR tyrimus galima atlikti ne tik specialistams surinkus tiriamąją medžiagą, bet ir pačioms moterims paėmus (ang. *self-collected*) ėminius tyrimui. Galimybė pačioms moterims paimti ėminį tikėtina padidintų moterų, dalyvaujančių patikros programoje skaičių, o kartu ir populiacijos ištyrimo procentą [1]. Citologinės atrankos programos barjerai – žmogiškųjų ir finansų išteklių trūkumas, moterų nenoras dalyvauti programoje. Individualiais paėmėjais suriktos medžiagos tyrimas patikros programą padaro prieinamesnę [8]. Individualiais paėmėjais surinktų ėminių naudojimas palengvintų gimdos kaklelio vėžio patikros programą, tačiau literatūra apie pačių moterų surinktų mėginių tyrimo patikimumą yra prieštaringa. Vieni autoriai teigia, kad gydytojų ir moterų surinktų ėminių tyrimo rezultatai skiriasi nežymiai ir individualiais paėmėjais suriktų ėminių naudojimas patikros programose yra skatinamas, kiti autoriai teigia, kad gydytojų surinkti ėminiai yra daug tinkamesni. Šiuo darbu siekiama įvertinti gydytojų ir individualiais paėmėjais pačių moterų suriktų ėminių tinkamumą nustatyti ŽPV DNR bei ŽPV infekcijos ryšį su kitomis lytinių takų infekcijomis, kurios siejamos su dažnesniu užsikrėtimu ŽPV bei gimdos kaklelio vėžio išsivystymu.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

įvertinti pačių moterų individualiais paėmėjais surinktos medžiagos tinkamumą ŽPV DNR nustatyti, ŽPV infekcijos sąsają su kitomis lytinių takų infekcijomis ir pateikti rekomendacijas dėl pačių moterų surinktos tiriamosios medžiagos tinkamumo gimdos kaklelio vėžio patikros programai.

Uždaviniai:

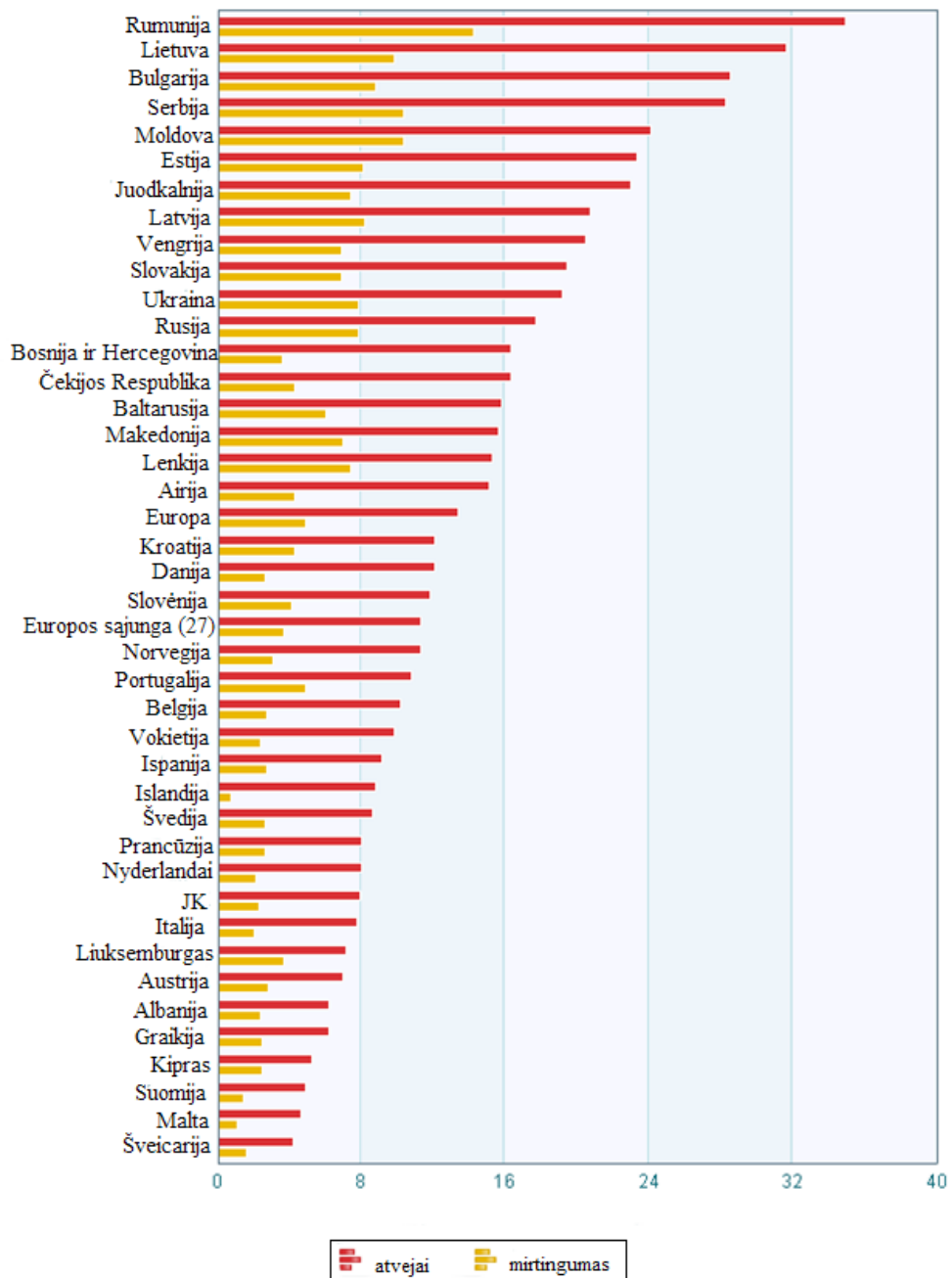
1. TL-PGR metodu ištirti individualiais paėmėjais ir ginekologų surinktą tiriamąją medžiagą, nustatant ŽPV virusą ir jo genotipus.
2. Įvertinti individualiais paėmėjais surinktos medžiagos tinkamumą ŽPV DNR nustatyti, lyginant moterų ir ginekologų surinktoje medžiagoje aptiktus ŽPV tipus.
3. Įvertinti ŽPV infekcijos ryšį su amžiumi, rūkymu, lytinio gyvenimo anamneze bei su makšties infekcija.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Gimdos kaklelio vėžio paplitimas

Gimdos kaklelio vėžys – antras pagal dažnį (po krūties vėžio), piktybinis 15-44 metų moterų navikas pasaulyje, o besivystančiose šalyse – dažnai pirmas. Kasmet fiksuojama 500 000 naujų gimdos kaklelio atvejų [1, 2], o dėl šios ligos miršta per 270 000 žmonių visame pasaulyje kasmet [3]. Gimdos kaklelio vėžys yra svarbi visuomenės sveikatos problema visur, įskaitant ir Europą. Europoje gimdos kaklelio vėžys taip pat yra antras pagal dažnį moterų navikas. Kasmet ES šalyse nustatoma apie 33 000 gimdos kaklelio vėžio atvejų ir 15 000 mirčių. Bendras gimdos kaklelio vėžio atvejų skaičius Europoje, tenkantis 100 000 gyventojų yra 10,6. Europoje ligos atvejų pasiskirstymas nėra tolygus. Gimdos kaklelio vėžiu rečiau sergama Vakarų Europoje, kur geriau išvystytos ligos prevencijos programos. Tuo tarpu Centrinėje ir Rytų Europoje gimdos kaklelio vėžiu sergama ir mirštama nuo jo dažniau [30].

Gimdos kaklelio atvejų tendencijos atspindi patikros programų kokybę ir apimtį bei rizikos veiksnių kiekį aplinkoje. Ryškus ligos atvejų ir mirtingumo sumažėjimas, stebimas Jungtinėje Karalystėje, Islandijoje ir Suomijoje, koreliuoja su patikros programų vykdymu ir lygiu. Čekijos Respublika, Lenkija, Estija, Lietuva ir Latvija taip pat įdiegė patikros programas, tačiau susiduria su svarbiomis kliūtimis, tokiomis, kaip maža tikslinės populiacijos apimtis (mažiau nei 20 %) [9]. Lietuvoje kiekvienais metais daugiau nei 5 000 moterų nustatoma gimdos kaklelio pokyčių, daugiau nei 500 moterų išsivysto vėžys. Sergamumas gimdos kaklelio vėžiu Lietuvoje yra vienas didžiausių iš ES šalių – 26,7 atvejo 100 000 moterų per metus. 1 pav. pateikta Europoje užfiksuotų gimdos kaklelio atvejų ir mirtingumo nuo jo pasiskirstymas pagal valstybes. Didelis sergamumas gimdos kaklelio vėžiu lemia ir didelį mirtingumą dėl šios ligos – 12,3 atvejo 100 000 moterų per metus [10]. Siekiant sumažinti mirčių nuo gimdos kaklelio vėžio atvejų, būtinas ankstyvas ligos nustatymas. Dėl šios priežasties gimdos kaklelio vėžio atvejų tendencijos atspindi patikros programų apimtį ir kokybę, rizikos veiksnių pokyčius [6].



1. pav. Gimdos kaklelio vėžio atvejų ir mirtingumo dažnis Europoje 2012 m. [11].

1.2. Gimdos kaklelio vėžio išsivystymo rizikos veiksniai

Paprastai sunku išaiškinti vėžį sukėlusį veiksnį ir konkrečią jo įtaką vienos ar kitos srities vėžiui [12]. Tačiau svarbiausias rizikos veiksnys, lemiantis gimdos kaklelio vėžio išsivystymą, yra žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija lytiniuose takuose – beveik visi gimdos kaklelio vėžio atvejai (99 %) yra siejami su ŽPV [2]. Šio vėžio atveju būtina ŽPV infekcijos persistencija, kad gimdos kaklelyje išsivystytų ikivėžinės ląstelės, kurios ilgainiui piktybėja [7].

Žmogaus papilomos viruso infekcija – viena dažniausių iš lytiškai plintančių infekcijų. Daugiau kaip 40 ŽPV tipų randama tiek vyrų, tiek moterų genitalijų gleivinėse. Tie patys tipai randami ir burnos bei viršutinių kvėpavimo takų gleivinėse. Jau netrukus po pirmųjų lytinių santykių randama ŽPV infekcija lytiniuose takuose. Didelės rizikos ŽPV tipai sukelia pokyčius ląstelėse, dėl to gali išsivystyti gimdos kaklelio vėžys. Žemos rizikos ŽPV tipai sukelia genitalijų karpas tiek vyrams, tiek moterims.

ŽPV plinta:

1. lytinių santykių (vaginalinių, oralinių, analinių) metu;
2. infekuota ŽPV motina virusą gali perduoti kūdikiui gimdymo metu;
3. ŽPV galima užsikrėsti bet kokio kontakto su užsikrėtusio žmogaus lyties organais metu;
4. kontaktiniu būdu per odą bei gleivinių mikrotraumas.

ŽPV užsikrėtusiems asmenims dažnai nepasireiškia jokie simptomai, tačiau jie gali virusą perduoti kitiems. Galima iš karto užsikrėsti keliais ŽPV tipais. ŽPV infekcija gali užsikrėsti tiek vyrai, tiek moterys. Apie 90 % ŽPV infekcijos atvejų praeina savaime per porą metų. Tačiau kartais ŽPV infekcija pasilieka organizme, sukelia lėtinį uždegimą arba kitų sveikatos problemų, kurios neretai priklauso nuo ŽPV tipo. Ilgainiui ŽPV organizme gali sukelti audinių piktybėjimą ir vėžį. Skirtingi ŽPV tipai sukelia skirtingų sveikatos problemų: vieni sukelia onkologines ligas, kiti – karpas, papilomas. Lytinių organų ir anogenitalinės karpas atsiranda praėjus kelioms savaitėms arba mėnesiams po užsikrėtimo. ŽPV sukeltos karpas išauga maždaug po 2-3 mėnesių nuo užsikrėtimo momento. Jos retai progresuoja į onkologines ligas, 20-30 % šių karpų praeina savaime. Karpas dažniausiai plinta per odos pažeidimus: įbrėžimus, įdrėskimus. Karpas neskausmingos. Karpų pašalinimas gali sumažinti ŽPV perdavimo riziką lytiniais partneriais. Apie 20-30 % atvejų liga kartojasi.

Gimdos kaklelio vėžiu dažniausiai serga vyresnės (40-50 metų) moterys. Moterys, kurios užsikrečia ŽPV būdamos 20-30 metų, vėžiu suserga po 10 arba net 20 metų.

ŽPV infekcijos rizikos veiksniai:

1. ankstyvi (iki 16 metų) pirmieji lytiniai santykiai;
2. didelis lytinių partnerių skaičius (daugiau nei 1 per 12 mėn.);
3. dažna lytinių partnerių kaita;
4. kita lytiškai plintanti infekcija (herpes virusinė infekcija, chlamidiozė, ŽIV);
5. ilgalaikis hormoninių kontraceptikų vartojimas;
6. rūkymas;
7. sutrikęs imunitetas [13].

Vėžys po užsikrėtimo ŽPV išsivysto ne iškart, praeina daug metų.

Fiziologinė gimdos kaklelio būklė taip pat gali turėti įtakos tam tikrų tipų ŽPV paplitimui tam tikru amžiaus tarpsniu. Jaunų moterų gimdos kaklelio transformacijos zona yra gimdos kaklelio makštinėje dalyje, čia gaminama mažai apsauginių gleivių, vietinis imuninis atsakas veikia silpniau nei suaugusių moterų, o transformacijos zona yra jautri įvairiems veiksniams, todėl susidaro palankios sąlygos ŽPV įsiskverbti į šią zoną ir ten persistuoti, tuo tarpu vyresnėms nei 30 metų moterims rizika užsikrėsti ŽPV sumažėja. Didelę įtaką tolesniam infekcijos vystymuisi turi kiti rizikos veiksniai: moters hormonų būklė, amžius, organizmo imuninis atsakas, rūkymas, gimdymų skaičius, užsikrėtimas kitais patogenais, pavyzdžiui, kitomis lytinio keliu plintančiomis ligomis (ŽIV, chlamidiozė) [14].

1.3. Žmogaus papilomos virusas

Papilomos virusai yra visiškai specifiški rūšiai, o taip pat ir audiniui – renkasi odos arba plokščialąstelinį gleivinės epitelį bei geba sukelti ląstelės šeiminingą dalijimosi pokyčius, dažnas to pavyzdys yra karpos. Šie virusai priklauso *Papovaviridae* šeimai [8,9] bei, kaip ir kiti virusai, yra obligatiniai viduląsteliniai parazitai, kurie turi savo genetinę medžiagą nugabenti į ląstelę šeiminingą ir pasinaudoti ląstelės biosintetinėmis mechanizmais, kad galėtų replikuotis.

Žmogaus papilomos virusas (ŽPV) yra mažas apvalkalo neturintis DNR virusas, kurio skersmuo 52-55 nm. ŽPV genomą sudaro žiedinė dvigrandė DNR, kurios ilgis – apie 8 000 bazių porų. Apvalkalo neturinčio viruso nukleorūgštį gaubia ir apsaugo baltyminė kapsidė, kuria virusas sąveikauja su ląstele šeimininge [15].

1.3.1. ŽPV tipai ir genomas

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 200 žmogaus papilomos virusų tipų. Kai kurie ŽPV tipai geba sukelti vėžį – yra onkogeniški. Pagal onkogeniškumą ŽPV tipai skirstomi į žemos onkogeninės rizikos (6, 11, 42, 43, 44) ir aukštos onkogeninės rizikos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 59, 64, 68) tipus [10]. Vien ŽPV 16 tipas sukelia apie 50 % visų gimdos kaklelio vėžio atvejų [2]. 16 ir 18 tipai kartu sukelia apie 70 % visų gimdos kaklelio vėžio atvejų visame pasaulyje, be to, jų sukeliamas vėžys dažnai yra piktybiškesnis, nes greičiau progresuoja ir anksčiau atsiranda metastazių. ŽPV 6 ir ŽPV 11 tipai sukelia daugumą (apie 90 %) lytinių organų karpų tiek vyrams, tiek moterims [16].

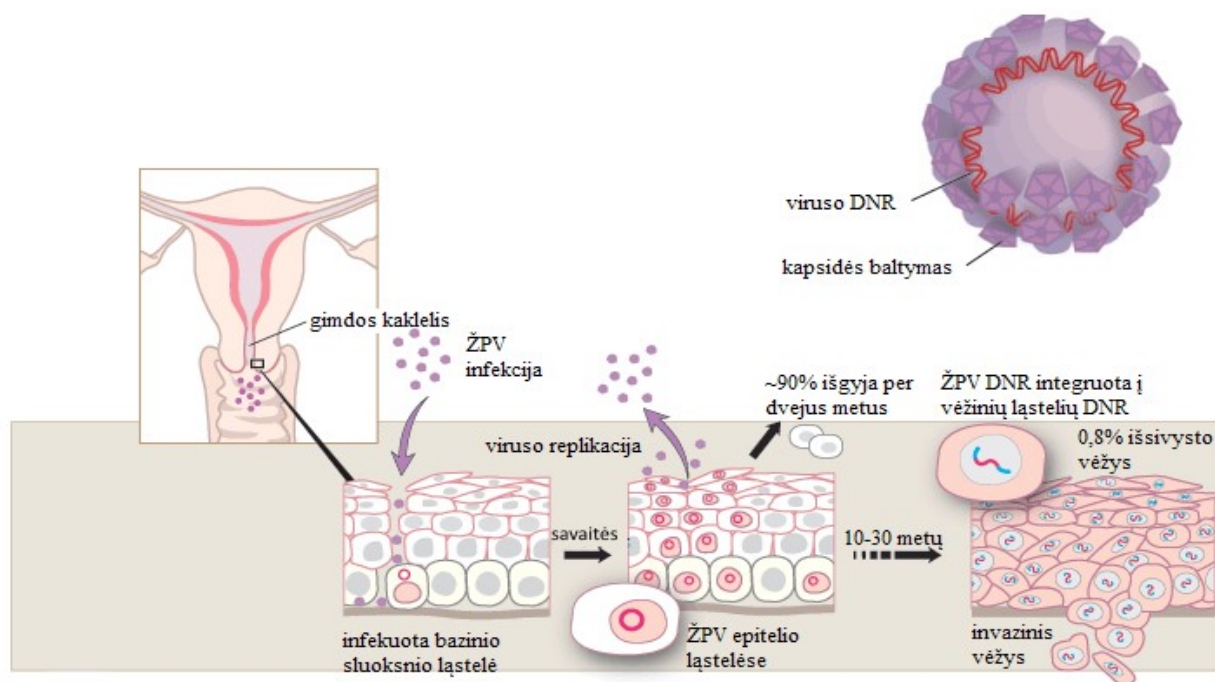
Didelės onkologinės rizikos ŽPV tipų onkogeniškumą lemia jų genome esantys E6 ir E7 ankstyvųjų baltymų genai. ŽPV genomas skirstomas į kelias dalis: koduojanti sritis yra išskirta į dvi dalis – ankstyvąją (žymima E, ang. Early) ir vėlyvąją (žymima L, ang. Late). Tarp šių sričių

yra nekoduojanti LCR (long control region) ilgoji reguliacinė sritis [3]. E1, E2, E4, E5, E6 ir E7 koduoja baltymus, reguliuojančius virusinės DNR replikaciją ir viruso genų raišką, tuo tarpu L1 ir L2 koduoja viruso kapsidės baltymus:

- E1 – helikazė, ATPazė, ATP surišantis baltymas, yra būtinas viruso DNR replikacijai;
- E2 – viruso transkripcijos veiksnys. Su E1 baltymu atsako už viruso DNR replikacijos aktyvinimą (E1 kompleksas su E2 užtikrina stabilią helikazės E1 sąveiką su LCR ori sritimi) ir transkripcinį E6 ir E7 slopinimą. Svarbus genomo inkapsuliacijos procese;
- E3 – funkcija nežinoma;
- E4 – sąveikauja su citoskeleto baltymais, dalyvauja viruso genomo inkapsuliacijoje (reikalingas virusui susiformuoti);
- E5 – silpnai transformuojantis veiksnys, suaktyvina augimo veiksnių receptorių raišką – skatina ląstelę dalytis;
- E6 – onkogenas, skatinantis p53 ubikvitilinimą ir degradaciją;
- E7 – onkogenas, surišantis pRb ir išreguliuojantis G1/S patikros tašką; sąveikaudamas su E6 imortalizuoja ląsteles.
- E8 – funkcija nežinoma;
- L1 – didysis kapsidės baltymas;
- L2 – mažasis kapsidės baltymas [3].

1.3.2. ŽPV infekcija

ŽPV infekcija vyksta gleivinės keratinocituose, po viruso prisijungimo prie pažeisto epitelio bazinės membranos. Virusą pradiniam prisitvirtinimui prie ląstelės paviršiaus svarbiausias yra baltymas L1. Buvo nustatyta, kad virusui prisitvirtinti prie ląstelės yra būtini heparino sulfato proteoglikanai (HSPG), kurie būdingi bazinio sluoksnio ląstelėms. Kapsidė su ląstelės paviršiumi sąveikauja per kapsidės baltymo L1 ir HSPG sąveiką. Šiuos proteglikanus bazinio sluoksnio ląstelės iškelia jas pažeidus, todėl prie nepažeisto epitelio paviršiaus ŽPV neprisijungia. Taip pat jungimasis prie bazinės membranos žaizdos vietoje gali užtikrinti, kad vyktų pageidaujama sąveika su bazinio sluoksnio keratinocitais, kurie migruoja, kad žaizda užsitrauktų (2 pav.). Po receptorių sąveikos virusas patenka į ląstelės vidų endocitozės būdu, o jo kapsidė suardoma, kad genetinė medžiaga galėtų dalyvauti ląstelės transkripcijos ir replikacijos procesuose [15].

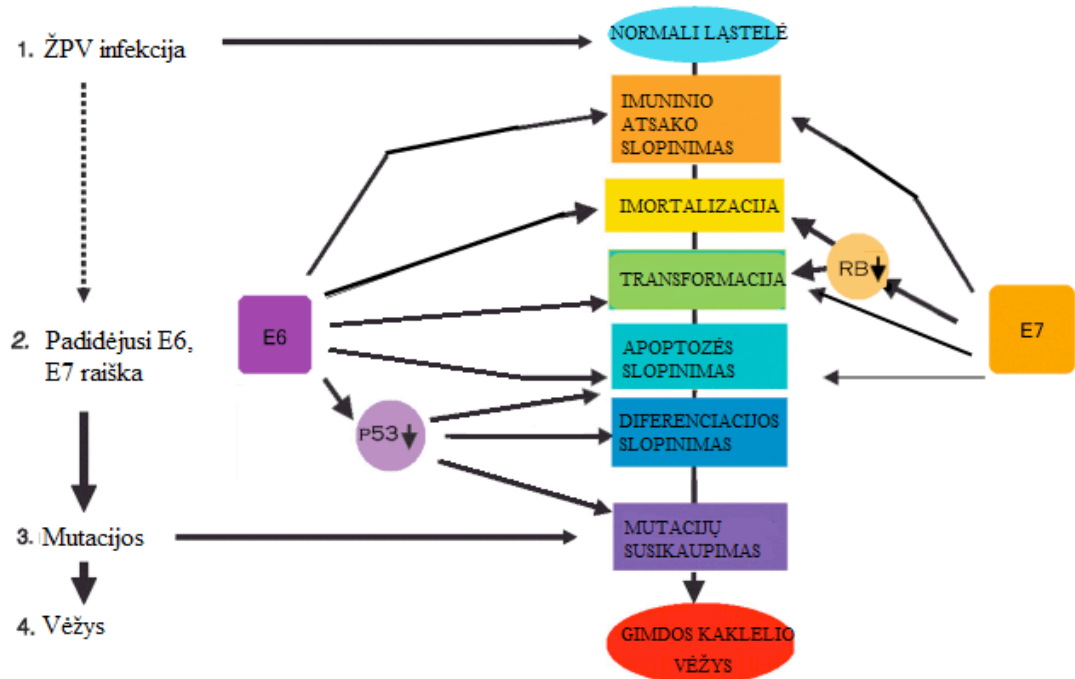


2. pav. ŽPV infekcija ir vėžio išsivystymas [17].

Genetinės medžiagos išėjimas iš kapsidės vyksta vėlyvosiose endosomose. Išėjimui iš endosomos labai reikšmingas yra L2 baltymas, kurio C-galas pasižymi stipriomis prasiskverbimo per membraną savybėmis. L2 taip pat sąveikauja su mikrovamzdelių tinklu per motorinį baltymą dineiną ir lemia citoplazminį virusinės dalelės transportą. Manoma, kad viruso genomas į branduolį patenka po branduolio membranos suirimo mitozės metu, o ne aktyvaus transporto būdu [18]. Ląstelės branduolyje pradedama viruso genomo transkripcija. Infekcijos procesas labai lėtas ir trunka 12-24 val. iki transkripcijos pradžios.

1.3.3. ŽPV karcinogenezė

Infekuotose ląstelėse vyksta viruso baltymų raiška. E7 stimuliuoja ląstelės dalijimąsi, o E6 – neleidžia vykti apoptozei – ubiquitilina p53 (užblokavus E6, ŽPV teigiamose ląstelėse indukuojama apoptozė [2]. Virusų baltymai sutrikdo normalų ląstelės ciklą ir skatina proliferaciją bei inaktyvina vėžio slopinklius – p53 ir pRb. ŽPV užkrėstos ląstelės diferencijuojasi, bet, priešingai nei normalių ląstelių atveju, ląstelės ciklas nesustabdomas. Galiausiai nuolatos aktyviai besidalijančios ląstelės lemia ikivėžinių ląstelių vystymąsi, kurios vėliau gali virsti vėžinėmis [19]. Procesą schema pavaizduota 3 pav.



3 pav. ŽPV E6 E7 genų vaidmuo karcinogenezėje [17].

Viruso DNR replikacija vyksta nepriklausomai nuo ląstelės ciklo, o viruso kopijų skaičius ląstelėje siekia maždaug 50-100. Tuomet užkrėsta ląstelė pereina į proliferuojančio epitelio dalį (virusinio genomo raiška minimali). Kontroliuojama E6 ir E7 onkogenų raiška, taigi E6/E7 transkriptai vos aptinkami. Infekuotam keratinocitui perėjus į diferenciacijos stadiją ir išeinant iš ląstelės ciklo, smarkiai suintensyvėja viruso genų raiška. Virus DNR replikuoja iki bent 1000 viruso kopijų ląstelei. Kaip minėta, ŽPV koduoja tik vieną DNR replikacijos baltymą – E1. Be šio ir E2 baltymo, viruso rereplikacija visiškai priklauso nuo ląstelės DNR sintezės aparato. Virusui nenaudinga, kad ląstelės DNR polimerazės ir replikacijos veiksniai gaminami tik mitotiškai aktyviose ląstelėse [11]. Kad išspręstų šią problemą, virusai koduoja baltymus, kurie iš naujo aktyvina ląstelės DNR sintezę ląstelėse, kurios yra išėję iš ląstelės ciklo, taip pat inhibuoja apoptozę ir uždelsia diferenciacijos programą, taip sukurdami aplinką, kurioje gali vykti viruso DNR replikacija. Virus replikacijos laikas yra ilgas. Net ir geriausiu atveju, nuo infekcijos pradžios iki virusų išėjimo iš ląstelės praeina apie 3 savaites, nes tiek laiko užtrunka keratinocito ciklas, pasibaigiantis pleiskanojimu. Tokia šio viruso replikacijos strategija – virusinės DNR replikacija ir viruso susirinkimas vyksta ląstelėje, kuriai lemta žūti dėl natūralių priežasčių – virusas nesukelia citolizės ar nekrozės, kad patektų į aplinką, todėl neprasideda uždegimas ir virusas imuninei sistemai yra beveik nematomas. Taigi ŽPV sukelia ląstelių pažeidimus, pasireiškiančius ne destrukcija, bet suintensyvėjusia ląstelių proliferacija [36, 37].

1.3.4. ŽPV DNR integracija į šeiminko genomą

ŽPV DNR integracija į šeiminko genomą yra svarbus neoplazminio progreso etapas gimdos kaklelyje. Virusų integracija paprastai sukelia E2 geno deliaciją ar pažeidimą, nepažeidžiant likusio segmento su E6 ir E7 onkogenais. Pernelyg aktyvi E2 raiška gali slopinti ankstyvąjį viruso promotorių, taip labai sumažindama E6 ir E7 raišką. Didelės rizikos ŽPV tipų integracija į šeiminko genomą ir dėl to įvykusi E2 delecija ar pažeidimas lemia padidėjusią virusinių onkogenų ekspresiją, nes E2 prisijungus prie keturių E2 surišančių sričių, esančių LCR. Tada kontroliuojamas viruso E6 ir E7 onkogenų transkripcijos intensyvumas. ŽPV DNR integruojantis į šeiminko DNR, ŽPV DNR dažnai nutrūksta E1-E2 srityje. Netekus E2, E6 ir E7 raiška tampa labai aktyvi ir skatina gimdos kaklelio ląstelių transformaciją. Ląstelės, kuriose integruosis didelės rizikos ŽPV, yra pranašesnės augimo atžvilgiu už ląsteles su episominiu ŽPV, todėl vyksta pirmųjų kloninė ekspansija. Tokių ląstelių genominis nestabilumas yra padidėjęs, dėl onkogenų veiklos ir jos labiau linkę įgyti antrinių genetinių pokyčių, galinčių sukelti piktybinius procesus. Integruotas ŽPV gali egzistuoti mažoje polikloninių ląstelių populiacijoje ilgą laiką ir neturėti pranašumo iki prarandamos episomos ir išsekvojamas E2 bei nebeslopinami E6 ir E7 [20].

1.4. ŽPV imuninio atsako išvengimas

Apie 50 % moterų susidūrusių su ŽPV išsivysto imuninis atsakas virusui taigi, kai kurie ŽPV infekcijos atvejai pašalinami šeiminko imuninės sistemos. Tačiau dalis ŽPV infekcijų tampa lėtiniais susirgimais [19]. Infekcija gali vykti tik tose vietose, kur pažeistas epitelis, o šeiminko imuninės sistemos mechanizmai greičiausiai yra susitelkę į šias vietas. Epitelis pataisomas per 1-2 dienas. Todėl 1-2 dienų delsimas iki viruso genomo raiškos gali leisti išvengti imuninio atsako [18].

Efektyvus įgimtos imuninės sistemos atpažinimo vengimas yra skiriamasis ŽPV bruožas, nes šio viruso infekcija (viruso replikacija ir išėjimas iš ląstelės) nesukelia uždegimo. Nėgana to, ŽPV infekcija sutrikdo citokinų ekspresiją. ŽPV turėtų pastebėti profesionalios plokščialąstelinės antigeną pateikiančios ląstelės (APL) – Langerhanso ląstelės (LL) bei dendritinės ląstelės (DL) [18]. Esant ŽPV infekcijai, uždegimą sukeliančių citokinų, kurie svarbūs DL aktyvavimui ir migracijai, išskyrimas yra silpnas arba jie išvis neišskiriami. Todėl nesiunčiamas pagrindinis signalas aktyvinti imuninį atsaką plokščialąstelinėje epitelyje. Tačiau net ir nevykstant viruso sukeltai citolizei, ŽPV užkrėsti keratinocitai turėtų aktyvuoti galingą antivirusinę apsaugos sistemą – 1 tipo interferonus (IFN), pasižyminčius priešvirusinėmis, priešproliferacinėmis,

priešangiogeninėmis ir imuninę sistemą stimuliuojančiomis sąvybėmis. ŽPV sukeltų pokyčių regresija gali būti susijusi su IFN poveikiu. Tačiau dauguma DNR virusų, kaip ir ŽPV, geba slopinti IFN sintezę. Aukštos rizikos ŽPV tipai slopina IFN α aktyvinamų genų raišką, o ŽPV16 E6 ir E7 onkobaltymai tiesiogiai sąveikauja su INF signalinio kelio komponentais. Pavyzdžiui, E7 trukdo IFN signalinį kelią slopindamas IFN β promotorių (promotoriaus sričiai panaudoja histonų deacetilazę ir slopina transkripciją) [52].

Su ŽPV infekcija kovoja jau minėtos DL, LL, taip pat natūralūs kileriai (NK) ir keratinocitai. NK ląstelės geba tiesiogiai pašalinti ŽPV infekuotas ląsteles. Tačiau ŽPV geba išvengti imuninio atsako, daugiausiai dėl E6 ir E7 baltymų veiklos. Imuninės sistemos išvengimo mechanizmai veikia nuo citokinų ir chemoatraktantų raiškos iki antigeno pakeitimo bei IFN ir adhezijos molekulių slopinimo. ŽPV pagrindinis taikinytis yra keratinocitas – įgimtos imuninės sistemos dalis, kuri gali veikti kaip neprofesionali APL. Jie gali paskatinti T_{H1} ir T_{H2} citokinų raišką bei atitinkamą citotoksinį CD4⁺ ir CD8⁺ atsaką. Endosominiai TLR receptoriai vaidina svarbų vaidmenį kovoje su virusinėmis infekcijomis ir virusinių nukleorūgščių atpažinime. Šių receptorių aktyvacija skatina citokinų sintezę, ir taip sukeliamas uždegimas. ŽPV geba keisti citokinų koncentracijas, kad išvengtų imuninio atsako. Virusą naudojama strategija – uždegiminio atsako gimdos kaklelio keratinocituose slopinimas. Keratinocituose, kuriuose yra episominės aukštos rizikos ŽPV kopijos, aptinkama daug slopinamų chemotaksio ir uždegimą sukeliančių genų. Slopinami genai dalyvauja įgimto ir įgyto imuniteto reakcijose, o taip pat ir keratinocitų diferenciacijoje. Šie rezultatai pabrėžia keratinocitų, kaip imuninio atsako prieš ŽPV iniciatorių svarbą. APL migracijos ir adhezijos mechanizmai yra esminiai imuninio atsako prieš ŽPV iniciacijai. Tačiau ŽPV geba reguliuoti APL adheziją ir migraciją. E6 ir E7 slopina E-kadheriną ir sutrikdo keratinocitų adheziją prie LL. ŽPV16 infekuotuose keratinocituose nutildžius E7 onkogeną, atsistato E-kadherino raiška [12]. Taigi didelės rizikos ŽPV išvystė mechanizmus, kaip efektyviai išvengti šeimininko imuninės sistemos. Aukštos rizikos ŽPV yra siejamas su sumažėjusia I tipo IFN ir uždegiminių citokinų indukcija bei keratinocitų stimuliacija [21].

1.5. ŽPV nustatymas

ŽPV plinta lytiniu keliu, o jo infekcija (ypač onkogeninių tipų) yra siejama su padidėjusia gimdos kaklelio vėžio rizika, todėl ŽPV tyrimas yra labai svarbus gimdos kaklelio vėžio prevencijoje [13]. Beveik 100 % gimdos kaklelio vėžio atvejų yra stebima AR-ŽPV infekcija. ŽPV aptikti naudojami įvairūs metodai, kurie taikomi gimdos kaklelio mėginiams: hibridizacijos, citologijos, ŽPV tipo nustatymo metodai naudojant PGR, genotipavimo metodai. Taip pat gali

būti nustatoma informacinė, viruso onkogenų E6 ir E7, RNR (iRNR). ŽPV detekcija naudinga tik tais atvejais kai yra rizika susidaryti piktybinėms transformacijoms [4].

1.5.1. ŽPV prevencijos programos ir jose taikomi ŽPV aptikimo metodai

Gimdos kaklelio vėžio atvejų siekiama sumažinti atliekant profilaktinės patikros programas, kai moterys nuo 25 iki 60 metų yra tikrinamos dėl gimdos kaklelio vėžio. Lietuvoje pirmiausia atliekamas citologinio tepinėlio tyrimas, o gavus rezultatus apie pokyčius gimdos kaklelyje, gali būti atliekama biopsija, leidžianti objektyviai patvirtinti arba paneigti ligos diagnozę. Šiuo metu yra siekiama padidinti vykdomų patikros programų, skirtų aptikti gimdos kaklelio vėžį, jautrumą, taikant naujus metodus ir pasiūlyti naujus algoritmus diagnostiniams ir terapiniams sprendimams. ŽPV aptikimo ir genotipavimo taikomi metodai leidžia kiekybiškai įvertinti konkretaus ŽPV tipo DNR ir stebėti viruso kiekio pokyčius. Sukūrus profilaktines vakcinas, kurios nukreiptos prieš 16 ir 18 tipus, labai tikėtina, kad infekcijų kiekis kils. Pastaruoju metu pagrindinis prioritetas yra pagerinti patikros programas. Aukštos rizikos ŽPV testavimas yra rekomenduojamas kaip papildomas tyrimas po citologinio tyrimo. Kai kuriose šalyse visų pirma nustatomas ŽPV, o citologinis tyrimas skiriamas tik ŽPV teigiamoms moterims [29].

Gimdos kaklelio vėžio citologijos tyrimo (Pap tepinėlio) specifiškumas 60-95 %, tačiau jautrumas žemas (40-50 %). Pap tepinėlio jautrumas pagerėja jį derinant su ŽPV DNR tyrimu. Kelis pastaruosius dešimtmečius gimdos kaklelio vėžio citologinis tyrimas buvo laikomas patikimiausiu ir ekonomiškiausiu patikros gimdos kaklelio vėžio prevencijos programos metodu. Nors šiuo metu gimdos kaklelio citologija yra laikoma labai reikšmingu metodu patikros programose, kuris padėjo sumažinti gimdos kaklelio vėžio atvejų, dažni klaidingai teigiami rezultatai sukėlė ne tik teisinių, bet ir socialinių problemų [4].

Buvo sukurti įvairūs patikros metodai, įskaitant ŽPV DNR tyrimą, kuriuo siūloma pakeisti arba papildyti citologinį tyrimą. Žemas citologinio metodo jautrumas galėtų būti pagerintas nustatant ŽPV DNR patikros programose. ŽPV DNR aptikimo įvairių tyrimų jautrumas – 66-100 %, specifiškumas – 49-86 % [7].

Plačiai paplitusi moterų patikros programa, naudojant Pap tyrimą, lėmė ryškų gimdos kaklelio vėžio ir mirties nuo jo atvejų sumažėjimą, tose šalyse, kur jis buvo atliekamas sistemingai. Tačiau citologiniu tyrimu grįstos gimdos kaklelio patikros programos nedavė tokių gerų rezultatų tose šalyse, kur patikros programos nebuvo vykdomos sistemingai, ypač besivystančiose šalyse. Maža apimtis, prastas moterų dalyvavimas ir subjektyvus rezultatų interpretavimas yra keletas galimų priežasčių, lėmusių prastus citologiniu tyrimu grįstų gimdos kaklelio vėžio patikros programų rezultatus. Didelės rizikos ŽPV tipų nustatymas yra tinkamesnis metodas patikroms, nei citologinis tyrimas, o molekuliniai ŽPV DNR tyrimai

nustato ŽPV tipus [5]. Taikant tyrimus, skirtus ŽPV aptikti ir gavus neigiamus ŽPV tyrimo rezultatus, laikotarpis iki kitos patikros yra ilgesnis, nei neigiamo Pap tepinėlio atveju, todėl tokį tyrimą galima atlikti rečiau, o tai padidina pacienčių norą dalyvauti programoje. Pagrindinis ŽPV tyrimo, kaip pirminės patikros metodo, minusas yra gana aukštas klaidingai teigiamų atvejų skaičius (žemas specifiškumas). Taip nutinka, nes dauguma ŽPV infekcijų neišsivysto į ligą, ypač jaunoms moterims. Ar išsivystys liga priklauso nuo ŽPV tipo, genetinių ir aplinkos veiksnių, tokių kaip rūkymas [4].

Citologijos tyrimo įtaka gimdos kaklelio epidemiologijai pasiekė ribą ir nebegali pagerinti gimdos kaklelio vėžio prevencijos. ŽPV tyrimai leidžia geriau ir greičiau įvertinti gimdos kaklelio vėžio riziką, nei citologiniai pokyčiai. ŽPV DNR tyrimas yra tinkamas pirminio gimdos kaklelio vėžio patikrai atlikti, ar jis būtų derinamas su citologiniu tyrimu ar naudojamas vienas. ŽPV DNR nustatymu pagrįsta gimdos kaklelio vėžio patikra nuo gimdos kaklelio vėžio apsaugo 60-70 % geriau, nei citologinis tyrimas [5].

Keletą dešimtmečių efektyviai vykdžius gimdos kaklelio citologinius tyrimus, ŽPV tyrimas vis labiau pripažįstamas tinkama priemone vykdyti gimdos kaklelio vėžio patikros programą. Įprastu citologiniu tyrimu pagrįsta gimdos kaklelio vėžio patikros programa gali būti taikoma, kai ji apima labai didelę populiacijos dalį, esant puikiam kokybės užtikrinimui [3,6,7].

Profilaktiniai patikrinimai padeda aptikti ikivėžines gimdos kaklelio būkles – pirmuosius gimdos kaklelio ląstelių pokyčius. PAP testas atliekamas siekiant nustatyti, ar gimdos kaklelyje nėra pakitusių ląstelių. PAP testas padeda tokius pokyčius aptikti dar prieš susergant vėžiu. Esant ikivėžinei būklei, aptinkami pirmieji ląstelių pokyčiai, todėl itin svarbu aptikti šiuos pokyčius tada, kai dar galima išvengti gimdos kaklelio vėžio. Per 10-15 metų gimdos kaklelio ląstelės gali virsti anomalijomis ir po to išsivystyti į gimdos kaklelio vėžį.

Gimdos kaklelio atrankinės patikros prevencijos programa Lietuvoje vykdoma nuo 2004 m., tai gimdos kaklelio patologijos atrankinės patikros programa, kuri patvirtinta 2004 m. LR sveikatos apsaugos ministro įsakymu V-548. Programos tikslas yra sumažinti Lietuvos moterų sergamumą gimdos kaklelio vėžiu ir mirtingumą nuo jo.

1.5.2. ŽPV aptikimas individualiais paėmėjais surinktoje medžiagoje

Molekulinius ŽPV DNR tyrimus galima taikyti ne tik specialistų surinktai medžiagai, bet ir pačių moterų paimtų ėminių tyrimui. Priešingai nei taikant citologijos metodą, ŽPV tyrimui moterys gali pačios surinkti tiriamąją medžiagą iš makšties. Galimybė pačioms moterims paimti ėminį tikėtina padidintų moterų, dalyvaujančių patikros programoje skaičių, o kartu ir populiacijos ištyrimo procentą. Pačių moterų paimtų ėminių rezultatai panašūs į sveikatos specialistų

surinktos medžiagos rezultatus. Moterų iš makšties surinkti sausi tamponai gali būti laikomi ir gabenami kambario temperatūroje, o tai pagerina atrankos programų prieinamumą, esant minimalioms išlaidoms. Tinkamai informavus moterį apie procedūrą, pačių moterų surinktų ėminių rezultatai yra panašūs, kaip ir profesionalų surinktoje medžiagoje [31]. Pačių moterų surinktų ėminių specifiškumas ir jautrumas panašus kaip ir gydytojų surinktų ėminių, bet jautresnis nei citologija [6].

Citologinės atrankos programos barjerai – žmogiškųjų ir finansų išteklių trūkumas, moterų nenoras dalyvauti programoje. Vaginaliniai pačių moterų paimtų mėginių tyrimai patikros programą padaro prieinamesnę, nes jie nebrangūs, nereikia brangios infrastruktūros, procesas paprastesnis moterims ir užima mažiau laiko. Deja vaginaliniai pačių moterų surinktų ėminių tyrimai nėra tokie jautrūs ar specifiški, kaip specialisto surinktų ėminių iš gimdos kaklelio tyrimai. Manoma, kad vaginalinių ėminių jautrumas yra žemesnis, nes šie ėminiai surenkami iš viršutinės makšties dalies. Endocervikinės ląstelės lupasi į viršutinę makšties dalį. Gali būti, kad didesnis virusų skaičius yra endocervikinėse ląstelėse. Taip pat vaginaliniuose ėminiuose gali būti mažiau ląstelių, nei ėminiuose iš gimdos kaklelio ir tai suteikia pranašumą gydytojų surinktos medžiagos tyrimui [1].

1.7. ŽPV ir kitos lytinių takų infekcijos

Kad išsivystytų gimdos kaklelio vėžys, neužtenka vien AR-ŽPV infekcijos. Kaip minėta, dažniausiai ŽPV infekcija yra laikina ir praeina savaime. 70 % naujai užsikrėtusių moterų organizme patogeno neberandama po vienerių metų, 90 % – po dvejų. ŽPV sukeltos ligos dažniau pasireiškia, esant imunodeficitui, todėl ŽPV infekcija itin dažna ŽIV infekuotiems asmenims. Lytiškai plintančios infekcijos yra laikomos papildomais veiksniais lemiančiais gimdos kaklelio vėžio išsivystymą ŽPV teigiamoms moterims. Infekcijos lytiniais keliais plintančiais patogenais, tokiais kaip *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex* virusas, ŽIV, yra laikomi veiksniais, padidinančiais tikimybę, kad nuo ŽPV infekcijos gimdos kaklelyje procesas progresuos į HSIL ir gimdos kaklelio vėžį [22]. Manoma, kad gimdos kaklelio vėžio rizika, esant kitoms infekcijoms, išauga dėl uždegiminio atsako susijusio su laisvųjų radikalų gamyba ir genetiniu nestabilumu.

Kiti organizmai, tokie kaip *Gardnerella sp.*, *Candida sp.*, *Trichomonas sp.*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* ir *Treponema pallidum* taip pat siejami su gimdos kaklelio uždegiminiais procesais, kurių metu ŽPV yra lengviau patekti į ląstelę [23].

1.7.1. ŽPV ir *Chlamydia trachomatis*

Manoma, kad *Chlamydia trachomatis* infekcija gali veikti kaip papildomas veiksnys onkogeniniam ŽPV poveikiui, nes *Chlamydia trachomatis* gali inicijuoti keletą biologinių mechanizmų, kurie padidina vėžio riziką. Tai antiapoptotinis poveikis ir gebėjimas paveikti imuninį atsaką. Infekuotų ląstelių atsparumas apoptozei užtikrina *Chlamydia trachomatis* išsilaikymą. Toks antiapoptotinis poveikis gali lemti ir epitelio ląstelių išlikimą, kurios tuo pačiu metu yra užsikrėtę ŽPV, taip kaupiantis chromosomų pažeidimus ir didėjant vėžio išsivystymo rizikai. Taip pat yra duomenų, kad *Chlamydia trachomatis* gali inhibuoti NK ląsteles, kurios naikina virusais užsikrėtusias ląsteles.

1.7.2. ŽPV ir bakterinė vaginozė

Makštis ir gimdos kaklelis yra pirmoji fizinės ir imunologinės gynybos linija prieš lytiškai plintančius patogenus. Bakterinė vaginozė yra uždegiminis vis pasikartojantis apatinių lytinių takų sindromas, kuris laikomas labiausiai paplitusiu makšties disbalansu, aptinkamu reproduktyvaus amžiaus moterims [24]. BV metu, moters lytiniuose takuose sumažėja *Lactobacillus* rūšies bakterijų, o jų vietą užima anaerobinės bakterijos [13]. Pakitus makšties ekosistemai sutrinka imuninės sistemos pajėgumas, tai gali lemti infekcijas, o kartu ir padidėjusį jautrumą ŽPV infekcijai.

Makšties *Lactobacillus spp.* atlieka apsauginę funkciją gamindamos pieno rūgštį, bakteriocinus (bakteriocidinės molekulės), biosurfaktantus. Keletas tyrimų parodė, kad esant BV, ŽPV ilgiau išlieka organizme. Buvo nustatyta, kad ŽPV teigiamos pacientės turėjo mažiau *Lactobacillus spp.* nei ŽPV neigiamos pacientės, o makšties mikrobiotoje *L. gasseri* dominavimas buvo siejamas su greitesniu ŽPV pašalinimu [25]. Dažniausiai pieno rūgšties bakterijų vietą užima *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus species*, *Prevotella species*, *Mycoplasma hominis* ir *Atopobium vaginae*. BV pasireiškia padidėjusiu makšties pH – didesniu nei 4,5 [24]. Didėjant makšties pH dažnėja ŽPV aptikimas, LPL rizika, LSIL, *Chlamydia trachomatis* infekcijos [25].

BV gali pažeisti makšties epitelį dėl gimdos kaklelio gleivių skaidymo proteazėmis, tokiomis kaip sialidazės, taip pakeisdamos fizikocheminę ir imunologinę aplinką makštyje ir palengvinti patogenų patekimą [26]. Dėl gleivių skaidymo patogenai gali kontaktuoti su epiteliu [24], padaugėja mikro įbrėžimų, palengvėja ŽPV prisikabinimas ir patekimas į transformacinės zonos ląsteles [22].

BV buvo aptinkama su arba po ŽPV infekcijos, o ne kaip ŽPV infekciją lemiantis veiksnys. Galbūt ŽPV infekcijai yra parankūs pokyčiai, lemiantys BV atsiradimą. Tebėra neaišku ar BV ir ŽPV infekcija yra susiję dėl jų biologinės sąveikos ar todėl, kad abu yra būdingi seksualiai aktyvioms moterims. Jei BV yra ŽPV infekcijos veiksnys, tokiu atveju siūloma visoms BV sergančioms moterims taikyti ŽPV DNR tyrimus vietoj citologinio tyrimo [22].

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo medžiaga

Tyrimė dalyvavo 100 nuo 21 iki 65 m. amžiaus moterų. ŽPV tyrimui buvo naudojami ėminiai iš makšties surinkti individualiais paėmėjais, kuriuos surinko tyrimė dalyvavusios moterys ir ėminiai iš gimdos kaklelio, kuriuos toms paėioms moterims Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Akušerijos ginekologijos centre, ginekologo konsultacijų kabinete surinko ginekologai. Nuo surinkimo datos ėminiai buvo laikomi kambario temperatūroje septynias dienas, taip imituojant patikros programoje dalyvaujančios moters individualiais surinkėjais surinktos medžiagos siuntimą ištirti. Tyrimas buvo vykdomas nuo 2015 m. liepos 7 d. iki 2016 m. vasario 2 d. Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje.

PGR metodu nustatyti ŽPV tipai buvo lyginami su tos paėios moters drėgno makšties tepinėlio, bakterinę vaginozę atspindinčio sukėlėjo *Atopobium vaginae* tyrimų rezultatais, siekiant nustatyti ŽPV sąsają su kitomis lytinių takų infekcijomis.

2.2. ŽPV nustatymas

2.2.1. Mėginio paruošimas

Praėjus septynioms dienoms po ėminio surinkimo, sausas paėmėjas su tiriamąja medžiaga buvo užpilamas 1 ml specialios nukleorūgštims išsaugoti skirtos terpės *Preservation Medium for Nucleic Acids* („Copan“, Italija). Mėginys buvo inkubuojamas +4 °C temperatūroje 24 valandas. Nukleorūgštys šioje terpėje išlieka stabilios iki 4 savaičių, mėginius laikant kambario temperatūroje ir iki 6 mėnesių mėginius laikant -20 °C temperatūroje.

2.2.2. DNR išskyrimas

Iš paruošto mėginio DNR buvo išskiriama kolonėlių metodu (4 pav.), naudojant *RibospinTM vRD* rinkinį („GeneAll“, Pietų Korėja). Rinkinį sudarantys komponentai ir jų kiekiai nurodyti 1 lentelėje.

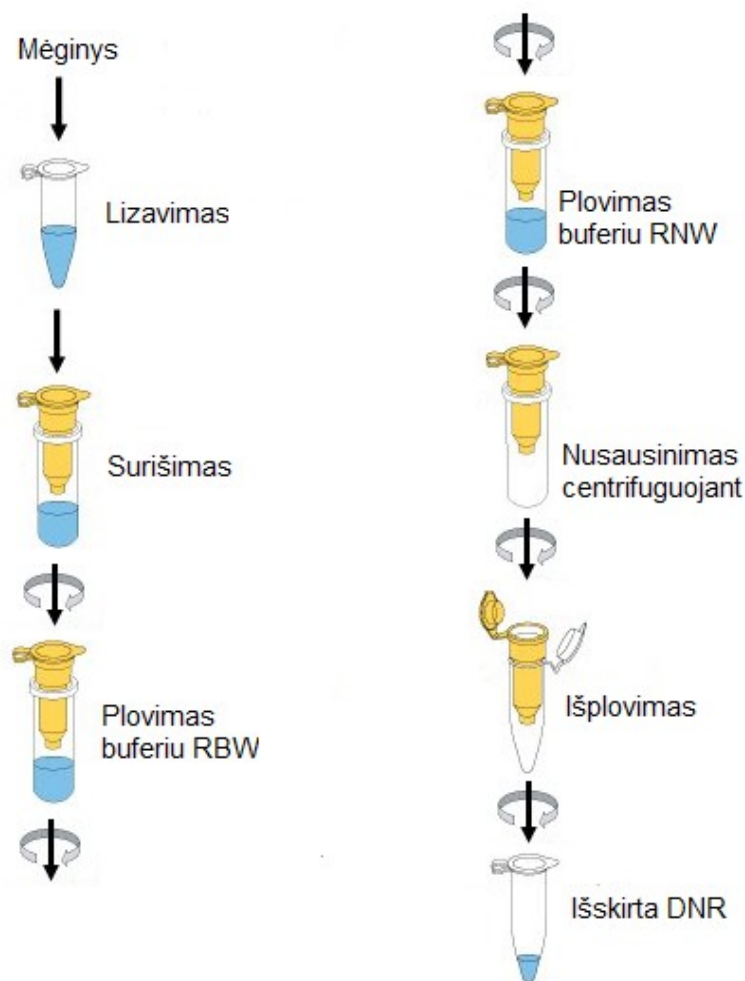
1 lentelė. Ribospin™ vRD rinkinys.

Reagentai ir priemonės	Kiekis
VL buferis	30 mL
RB1 buferis	40 mL
RBW buferis	30 mL
RNW buferis	30 mL
Vanduo be nukleazų	15 mL
Kolonėlės	50
Surinkimo mėgintuvėliai	50
1.5 mL mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai	50

DNR išskyrimas vykdytas pagal gamintojo nurodytą metodiką:

1. Mėginį sumaišyti (purtyti ir trumpai centrifuguoti);
2. Į 1,5 mL talpos mėgintuvėlį įpilti 300 µL mėginio;
3. Į mėgintuvėlį įpilti 500 µL VL buferio (vykdoma ląstelių lizė). Mėgintuvėlį trumpai purtyti (10 s) ir trumpai centrifuguoti;
4. Mėgintuvėlį 10 min. inkubuoti kambario temperatūroje;
5. Į mėgintuvėlį įpilti 700 µL RB1 buferio, mėgintuvėlį trumpai purtyti (10 s) ir trumpai centrifuguoti;
6. Ant kolonėlės perkelti 750 µL mėginio ir centrifuguoti 1 min. 10 000 g;
7. Po centrifugavimo kolonėlę perkelti į naują surinkimo mėgintuvėlį;
8. Ant kolonėlės perkelti 800 µL mėginio (likutį) ir centrifuguoti 1 min. 10 000 g;
9. Po centrifugavimo kolonėlę perkelti į naują surinkimo mėgintuvėlį;
10. Ant kolonėlės pilti 500 µL RBW buferio (kolonėlės plovimas) ir centrifuguoti 1 min. 10 000 g;
11. Po centrifugavimo kolonėlę perkelti į naują surinkimo mėgintuvėlį;
12. Ant kolonėlės pilti 500 µL RNW buferio (kolonėlės plovimas) ir centrifuguoti 1 min. 10 000 g;
13. Po centrifugavimo kolonėlę perkelti į naują surinkimo mėgintuvėlį;
14. Kolonėlę nusausinti centrifuguojant 2 min. 13 000 g;
15. Po centrifugavimo kolonėlę perkelti į mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį;
16. Ant kolonėlės pilti 50 µL vandens be nukleazų;
17. Inkubuoti kolonėlę 3 min. kambario temperatūroje;

18. Kolonėlę centrifuguoti 1 min. 10 000 g. Po centrifugavimo mėgintuvėlyje yra išskirta DNR.



4 pav. DNR išskyrimas kolonėlių metodu.

2.3. Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (TR-PGR)

2.3.1. ŽPV tipų nustatymas *Anyplex II HPV28* rinkiniu

TL-PGR reakcijai atlikti buvo naudojamas *Anyplex II HPV28* rinkinys („Seegene“, Pietų Korėja). Rinkinį sudarantys reagentai nurodyti 2 lentelėje. Naudojant šį rinkinį galima nustatyti 19 aukštos onkogeninės rizikos ŽPV (AR-ŽPV) tipų ir 9 žemos onkogeninės rizikos ŽPV (ŽR-ŽPV) tipus. Rinkiniu nustatomi ŽPV tipai nurodyti 3 lentelėje.

2 lentelė. *Anyplex II HPV28* rinkinį sudarantys reagentai.

Reagentų pavadinimai	Sudėtis	Kiekis
4X HPV28A TOM	14 AR-ŽPV tipų amplifikacijai reikalingų oligonukleotidų mišinys	500 µL
4X HPV28B TOM	5 AR-ŽPV ir 9 ŽR-ŽPV tipų amplifikacijai reikalingų oligonukleotidų mišinys	500 µL
4X Anyplex PCR Master Mix	DNR polimerazė ir buferis su dNTP	500 µL
HPV28A PC1	Teigiamos kontrolės. Patogenų klonų mišinys	100 µL
HPV28A PC2		100 µL
HPV28A PC3		100 µL
Rnase-free Water	Utrašvarus sterilus vanduo	1000 µL

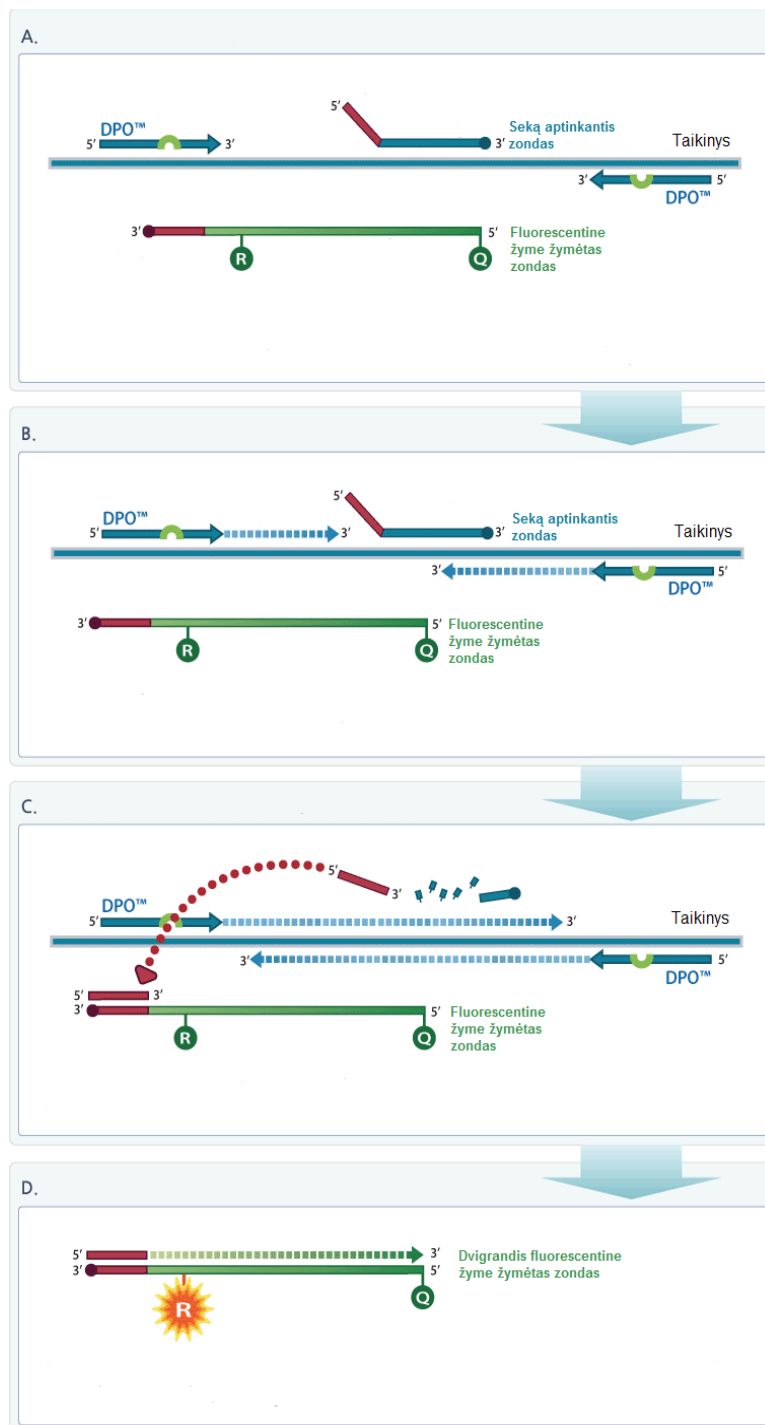
3 lentelė. ŽPV tipai, kuriuos galima aptikti su *Anyplex II HPV28* rinkiniu.

19 AR-ŽPV tipų	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82
9 ŽR-ŽPV tipai	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70

Taikant *Anyplex II HPV28* metodą, atliekama TL-PGR, kurios metu taikomi skirtingiems ŽPV tipams specifiški dvigubi pradmenų oligonukleotidai (DPO). Tyrimo metu taip pat naudojami skirtingiems ŽPV tipams specifiški seką aptinkantys zondai bei antriniai fluorescentine žyme pažymėti zondai, kurie yra specifiški skirtingiems seką aptinkantiems zondams (veikimo schema pateikta 5 pav.). Seką aptinkantis zondas hibridizuojasi prie savitos taikinio (konkreto ŽPV tipo DNR) sekos. PGR reakcijos metu ilginamas DPO pradmuo ir egzozonukleaziniu aktyvumu pasižyminti DNR polimerazė atskelia konkretaus ŽPV tipo DNR seką aptinkančio zondo grandinę. Atskilus 5' aptinkančio zondo sekai, ji jungiasi su komplementariu fluorescentine žyme pažymėto zondo 3' galu ir vyksta DNR grandinės sintezė. Viengrandis fluorescentine žyme pažymėtas zondas tampa dvigrandžiu, todėl fluorescencijos slopiklis nutolsta nuo fluoroforo ir stebima fluorescencija. Tuo pačiu fluoroforu pažymėti zondai yra specifiški tam tikriems 3 genotipams, kurie atskiriami iš 3 genotipams specifinių lydimosi kreivių. Šiuo metodu 2 reakcijų metu nustatomi 28 ŽPV tipai, panaudojant 5 dažus (kokius ŽPV tipus identifikuoja kiekvienas fluoroforas nurodyta 4 lentelėje). *Anyplex II HPV28* TL-PGR reakcijos metu yra išvengiama klaidingai neigiamų rezultatų, nes reakcijos metu vykdoma vidinė kontrolė (IC), kuri parodo ar PGR reakcija įvyko. Šiame rinkinyje vidinė kontrolė – žmogaus beta-globino genas. Vieno tyrimo metu vykdomos dvi PGR reakcijos A ir B (A reakcijos metu nustatomi mėginiuose esantys 14 AR-ŽPV tipų, B reakcijos metu – likę 5 AR-ŽPV tipai ir 9 ŽR-ŽPV tipai).

4 lentelė. *Anyplex II HPV28* rinkinio ŽPV tipus identifikuojantys fluoroforai.

Fluoroforas	A reakcija	B reakcija
FAM	ŽPV 66, 45, 58	ŽPV 26, 69, 73
HEX	ŽPV 51, 59, 16	ŽPV 42, 82, 53
Cal Red 610	ŽPV 33, 39, 52	ŽPV 43, 54, 70
Quasar 670	IC, ŽPV 35, 18	IC, ŽPV 61, 6
Quasar 705	ŽPV 56, 68, 31	ŽPV 44, 40, 11



5 pav. ŽPV aptikimo *Anyplex II HPV28* metodu schema. A. Sėką aptinkantis zondas hibridizuojasi prie specifinės taikinio sekos. B. Vykstant DPO pradmens ilginimui, DNR polimerazė, pasižyminti egz nukleaziniu aktyvumu, perskelia sėką aptinkančio zondo grandinę. C. Atskilusi sėką aptinkančio zondo dalis hibridizuojasi su fluorescentine žyme žymėtu zonu ir veikia kaip pradmuo. D. Vyksta sekos ilginimas, dėl kurio nutolsta fluorescencijos slopiklis (Q) nuo fluoroforo (R) [27].

2.3.1. TL-PGR mišinio paruošimas ir reakcijos vykdymas

- Prieš vykdant PGR reakciją, iš mėginių išskiriama DNR, anksčiau nurodytu metodu. *Anyplex II HPV28* rinkinio reagentai prieš ruošiant reakcijos mišinį turi būti atšildyti ir sumaišyti purtant ir trumpai centrifuguojant.
- Vienam mėginiui ištirti ruošiami du TL-PGR reakcijos mišiniai (5 lentelė).

5 lentelė. Du aptikimo mišiniai, vienam mėginiui ištirti.

A mišinys:	B mišinys:
5 µL HPV28A TOM	5 µL HPV28B TOM
5 µL Anyplex PCR Master Mix	5 µL Anyplex PCR Master Mix
5 µL Rnase-free Water	5 µL Rnase-free Water
Bendras reakcijos mišinio tūris 15 µL	Bendras reakcijos mišinio tūris 15 µL

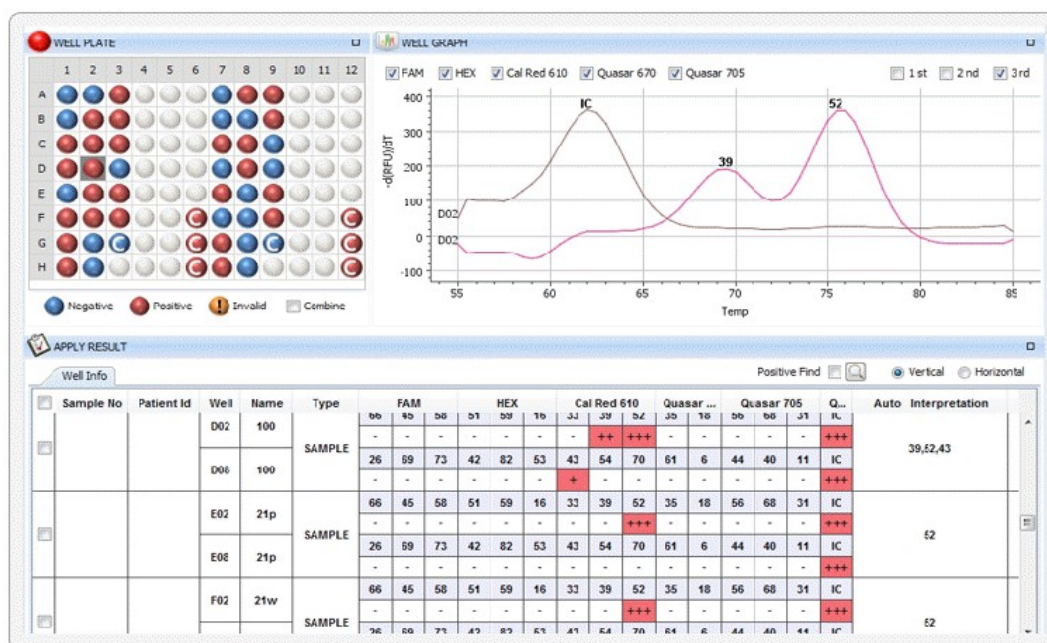
- Reikalingas kiekvieno reagento kiekis apskaičiuojamas pagal vykdomų reakcijų skaičių (reagentų tūrius dauginant iš tiriamų mėginių ir atliekamų kontrolių skaičiaus).
- Į PGR mėgintuvėlius įpilama 15 µl PGR mišinio (A arba B mišinio).
- Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama 5 µl tiriamos DNR mišinio (bendras reakcijos tūris 20 µl).
- Neigiamą kontrolę paruošiama į mėgintuvėlį įpylus 15 µl PGR mišinio ir pridėjus 5 µl sterilaus vandens („Rnase-free Water“).
- Teigiamos kontrolės paruošiamos į mėgintuvėlius įpylus po 15 µl PGR mišinio ir pridėjus po 5 µl atitinkamos kontrolės reagento (HPV28 PC1, HPV28 PC2 arba HPV28 PC3).
- Reakcija vykdoma ir signalai aptinkami naudojant CFX96 TL-PGR aparatą („Bio-Rad“, Šveicarija).
- Pasirenkama ŽPV identifikuoti skirta TL-PGR programa, kuri nurodyta 6 lentelėje.
- Duomenys įrašomi ir interpretuojami automatiškai, naudojant kompiuterinę *Seegene Viewer* programą.

6 lentelė. TL-PGR programa (* pažymėtose dalyse aptinkama fluorescencija).

Dalis	Ciklų skaičius	Temperatūra	Trukmė
1	1	50 °C	4 min.
2	1	95 °C	15 min.
3	30	95 °C	30 s
4		60 °C	1 min.
5		72 °C	30 s
6		3 dalį kartoti 29 kartus	
7	1	55 °C	30 s
8*	1	Lydimosi temperatūros kreivė 55 °C ~ 85 °C (5 s / 0,5 °C)	
9	10	95 °C	30 s
10		60 °C	1 min.
11		72 °C	30 s
12		9 dalį kartoti 9 kartus	
13	1	55 °C	30 s
14*	1	Lydimosi temperatūros kreivė 55 °C ~ 85 °C (5 s / 0,5 °C)	
15	10	95 °C	30 s
16		60 °C	1 min.
17		72 °C	30 s
18		15 dalį kartoti 9 kartus	
19	1	55 °C	30 s
20*	1	Lydimosi temperatūros kreivė 55 °C ~ 85 °C (5 s / 0,5 °C)	

2.3.2. TL-PGR duomenų analizė

Gauti duomenys analizuojami kompiuterine *Seegene Viewer* programa (6 pav.). Programa nurodo, kurie mėginiai neigiami (ŽPV neaptikta), teigiami (ŽPV aptikta) ir nurodo ŽPV tipus, kurie buvo nustatyti konkrečiame mėginyje. Taip pat nurodoma ar tinkamai atlikti kontroliniai mėginiai ir ar PGR reakcija įvyko (tam naudojama vidinė kontrolė).



6 pav. TL-PGR rezultatų analizė kompiuterine *Seegene Viewer* programa [28].

2.3. Papildomi tyrime naudoti duomenys

Tyrime dalyvaujančių moterų buvo paprašyta užpildyti anketą apie veiksnius, galėjusius lemti užsikrėtimą ŽPV. Buvo teiraujama apie moterų amžių, lytinio gyvenimo pradžią (amžius), lytinių partnerių skaičių, gimdymų skaičių, naudojamos kontracepcijos būdus, rūkymą. Toms pačioms moterims buvo atliktas drėgnas makšties tepinėlis, kurį atliko ir vertino Santariškių klinikų Akušerijos ginekologijos centro ginekologo konsultacijų kabineto gydytojai (drėgnam tepinėliui vertinti buvo naudota Vagoras A, Hallen A, Domeika M. „Lyties takų mikroskopijos pagrindai“ 2001 m. metodika). Taip pat Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje tyrime dalyvavusioms moterims buvo atliktas mikrobiologinis pasėlis iš gimdos kaklelio. *Atopobium vaginae* DNR nustatymą ėminiuose iš gimdos kaklelio atliko VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros darbuotojai. Tyrimo rezultatai apdoroti statistine duomenų analizės programa SPSS 17.0.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

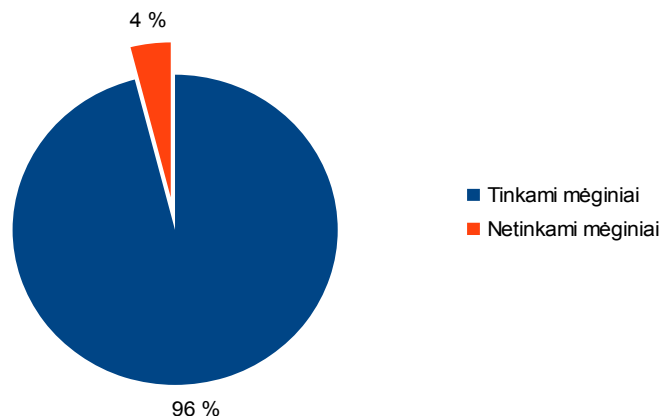
3.1. Bendrosios charakteristikos

Atlikto tyrimo tikslas buvo įvertinti gydytojo (mėginys iš gimdos kaklelio) ir pačios moters (mėginys iš makšties) paimtų mėginių rezultatų atitikimą ir sužinoti ar pačios moters paimto mėginio tyrimo rezultatas yra patikimas ir atitinka gydytojo paimto mėginio rezultatus. Taip pat pagal anketos duomenis buvo tiriama ar yra ryšys tarp užsikrėtimo ŽPV ir veiksnių, kurie anot literatūros, didina riziką užsikrėsti ŽPV. Tokiais veiksniais įvardijami ankstyva lytinio gyvenimo pradžia, didelis lytinių partnerių skaičius, didelis gimdymų skaičius, ilgalaikis hormoninės kontracepcijos naudojimas, rūkymas. Tyrime dalyvavusioms moterims gydytojas paėmė drėgną tepinėlį iš makšties, kuris buvo įvertintas, o gauti rezultatai buvo panaudoti tiriant ar yra sąsaja tarp drėgno tepinėlio ir ŽPV tyrimo rezultatų. Tyrime dalyvavo 100 lytiškai aktyvių nuo 21 iki 65 metų amžiaus moterų, kurios skundėsi pagausėjusiomis išskyromis iš makšties.

3.2. ŽPV nustatymas ir sąsajos su kitais veiksniais

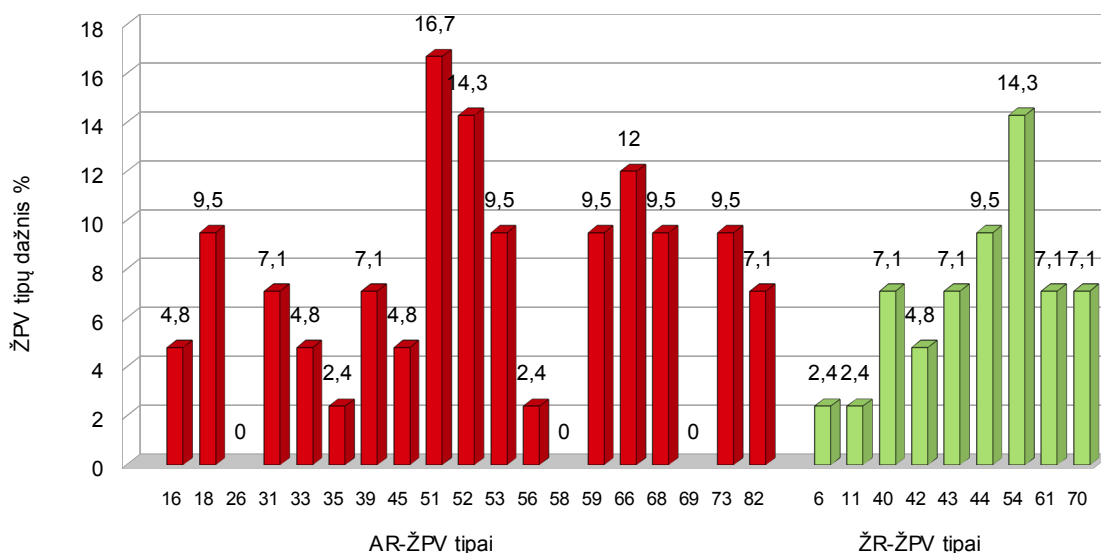
3.2.1. ŽPV nustatymas gydytojo ir moters paimtuose mėginiuose

Tyrimo metu buvo palyginti gydytojo ir moters paimti ŽPV mėginiai. Ar mėginys tinkamai paimtas, buvo vertinama pagal vidinę kontrolę, kaip aprašyta 2.3.1. skyrelyje (vidinė kontrolė (IC) parodo ar PGR reakcija įvyko). Visi gydytojo surinkti mėginiai buvo tinkami atlikti tyrimą. Tuo tarpu 4 iš 100 moterų surinktų mėginių nebuvo tinkami atlikti tyrimą – PGR reakcija buvo inhibuota. Šie mėginiai buvo ištirti juos atskiedus per pusę (santykiu 1:1). Galima manyti, kad šiuose netinkamuose pačių moterų surinktuose mėginiuose buvo per daug DNR, todėl neskiesti mėginiai buvo inhibuoti. Tyrimui netinkami pačių moterų surinkti mėginiai sudarė 4 % (7 pav.).



7 pav. Netinkamai moterų surinktų mėginių dalis.

Iš visų 100 tyrime dalyvavusių moterų, 58 moterims nebuvo nustatytas joks ŽPV tipas, o 42 buvo infekuotos ŽPV. 35 (83,3 %) iš jų buvo nustatytas bent vienas aukštos onkogeninės rizikos (AR-ŽPV) tipas ir 7 (16,7 %) moterims nustatyti tik žemos onkogeninės rizikos (ŽR-ŽPV) tipai. Tyrime naudotu metodu galima nustatyti 28 ŽPV tipus, išvardintus 3 lentelėje. Tyrime dalyvavusioms moterims buvo nustatyti 25 skirtingi ŽPV tipai, o 26, 58 ir 69 tipai tyrimo metu nebuvo nustatyti. Dažniausiai, 31 atvejis iš 42 (74 %), nustatytas 1 arba 2 skirtingi ŽPV tipai tai pačiai moteriai. 11 iš 42 (26 %) atvejų buvo nustatyti 3-4 skirtingi ŽPV tipai tai pačiai moteriai. Dažniausiai nustatyti AR-ŽPV tipai: 51 tipas – 7 iš 42 (16,7 %), 52 tipas – 6 iš 42 (14,3 %), 66 tipas – 5 iš 42 (11,9 %). Dažniausiai nustatytas ŽR-ŽPV buvo 54 tipas – 6 iš 42 (14,3 %). Itin aukštos onkogeninės rizikos 16 ir 18 ŽPV tipai buvo nustatyti atitinkamai 2 (4,8 %), ir 4 (9,5 %) atvejais iš 42. Nustatytų ŽPV tipų dažnis pavaizduotas 8 pav.



8 pav. Nustatytų ŽPV tipų dažnis (%).

Vertinant pačių moterų ir gydytojo akušerio ginekologo paimtus ŽPV mėginius, visiškai sutapo 78 iš 100 atvejų. Iš 42 moterų, kurioms nustatyta ŽPV infekcija, 20 (47,6 %) moterų nustatyti identiški ŽPV tipai pačios moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose. Dar 13 (31 %) atvejų sutapimas buvo dalinis, kai moters ar gydytojo surinktame mėginyje nustatomi papildomi ŽPV tipai:

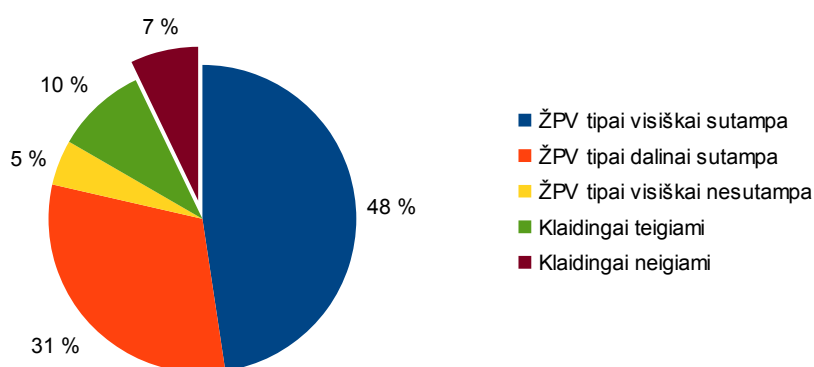
- 8 iš tokių atvejų (19 %), papildomi ŽPV tipai nustatyti moters surinktame mėginyje iš makšties.
- 4 (9,5 %) dalinio sutapimo atvejais, papildomi ŽPV tipai nustatyti gydytojo surinktame mėginyje iš gimdos kaklelio.

Iš 42 moterų, kurioms nustatyta ŽPV infekcija, 9 (21,4 %) atvejais pačios moters ir

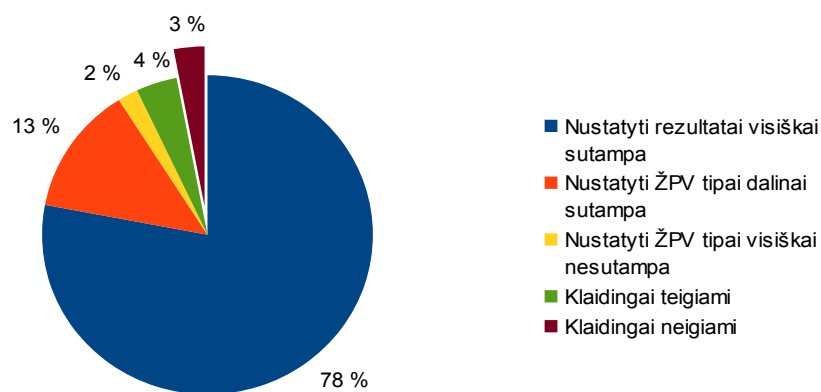
gydytojo surinktuose mėginiuose nustatyti ŽPV tipai visiškai nesutapo:

- 4 atvejais (9,5 %) moters surinktame mėginyje iš makšties buvo nustatytas ŽPV tipas, o ginekologo surinktas mėginys buvo neigiamas. Tokie mėginiai galėtų būti vertinami kaip klaidingai teigiami.
- 2 atvejais (4,8 %) moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose buvo nustatyti visiškai skirtingi ŽPV tipai.
- Tik 3 atvejai (7 %) iš 42 buvo klaidingai neigiami, kai moters surinktame mėginyje ŽPV nenustatytas, o gydytojo surinktame mėginyje iš gimdos kaklelio ŽPV aptiktas. Taigi iš 100 ištirtų moterų tik 3 atvejai buvo klaidingai neigiami.

9 pav. pavaizduota, kaip pasiskirstė nustatytų ŽPV tipų rezultatai moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose tarp 42 moterų, kurios užsikrėtę ŽPV. 10 pav. pavaizduota, kaip pasiskirstė nustatytų ŽPV tipų rezultatai moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose tarp visų tyrime dalyvavusių moterų.



9 pav. Nustatytų ŽPV tipų moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose rezultatai.



10 pav. Moters ir gydytojo surinktų mėginių ištirimo rezultatai.

Vykdamas gimdos kaklelio vėžio prevencijos programos patikrą tiriamąją medžiagą

individualiais paėmėjais surenkant pačioms moterims, tikėtina, kad tik 3 % moterų nebūtų nustatyta ŽPV infekcija (10 pav.) arba 7 % visų ŽPV infekuotų moterų (9 pav.).

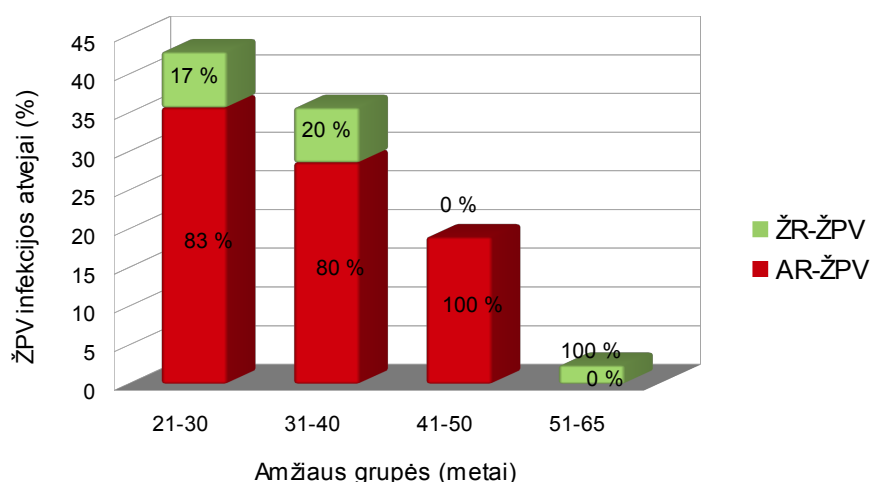
3.2.2. ŽPV tipo sąsaja su moters amžiumi

100 tyrime dalyvavusių nuo 21 iki 65 metų moterų amžiaus vidurkis $33,6 \pm 9,1$ metų. Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su moterų amžiumi, 42 ŽPV užsikrėtusios moterys buvo suskirstytos į 4 amžiaus grupes 10 metų intervalais (7 lentelė).

7 lentelė. ŽPV infekuotų moterų amžiaus grupės.

Amžiaus grupės (metai)		N	%
1 grupė	21-30	18	42,9
2 grupė	31-40	15	35,7
3 grupė	41-50	8	19
4 grupė	51-65	1	2,4

Pirmoje amžiaus grupėje (nuo 21 iki 30 metų) ŽPV nustatytas 42,9 % moterų, iš kurių AR-ŽPV tipų buvo 83,3 %, o ŽR-ŽPV – 16,7 %. Antroje amžiaus grupėje (nuo 31 iki 40 metų) ŽPV nustatytas 35,7 %, iš kurių 80 % buvo AR-ŽPV ir 20 % ŽR-ŽPV. Trečioje amžiaus grupėje (nuo 41 iki 50 metų) ŽPV nustatytas 19 % moterų, iš kurių visi buvo AR-ŽPV. Ketvirtoje amžiaus grupėje (nuo 51 iki 65 metų) ŽPV nustatytas 2,4 % moterų. Šią grupę sudarė tik ŽR-ŽPV. 11 pav. pavaizduoti gauti rezultatai.



11 pav. ŽPV infekcijos atvejų pasiskirstymas amžiaus grupėse.

3.2.3. ŽPV tipo sąsaja su moters lytinio gyvenimo pradžia

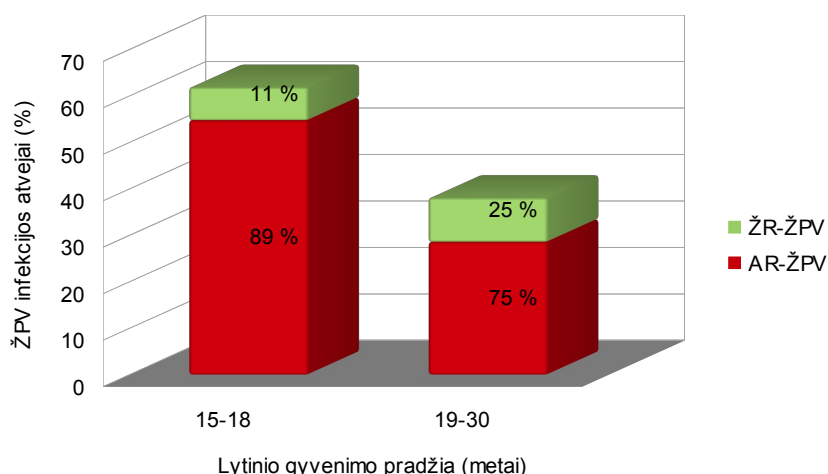
Vykdamas tyrimą, moterų buvo paprašyta užpildyti anketą, nurodant amžių, kada pradėjo

lytinį gyvenimą. Pagal surinktus duomenis, tyrime dalyvavusių moterų lytinio gyvenimo pradžia buvo nuo 15 iki 30, vidurkis $19,02 \pm 2,6$ metų. Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su moters lytinio gyvenimo pradžia, 42 ŽPV užsikrėtusios moterys buvo suskirstytos į 2 amžiaus grupes: lytinį gyvenimą pradėjusios nuo 15 iki 18 metų ir nuo 19 iki 30 metų (8 lentelė).

8 lentelė. ŽPV infekuotų moterų lytinio gyvenimo pradžios amžiaus grupės.

Grupės pagal lytinio gyvenimo pradžia		N	%
1 grupė	≤ 18	26	61,9
2 grupė	≥ 19	16	38,1

Pirmoje amžiaus grupėje (nuo 15 iki 18 metų) ŽPV nustatytas 61,9 % moterų. Šioje grupėje AR-ŽPV sudarė 88,5 %, o ŽR-ŽPV – 11,5 %. Antroje amžiaus grupėje (nuo 19 iki 30 metų) ŽPV nustatytas 38,1 % moterų, iš kurių 75 % sudarė AR-ŽPV infekcija, o 25 % – ŽR-ŽPV infekcija (12 pav.). Užsikrėtimas ŽPV statistiškai patikimai dažnesnis moterims, kurių lytinio gyvenimo pradžia ankstesnė (1 grupė), lyginant su moterimis, kurių lytinio gyvenimo pradžia vėlesnė (2 grupė) $p = 0,001$.



12 pav. ŽPV infekcijos atvejų pasiskirstymas grupėse pagal lytinio gyvenimo pradžia.

3.2.4. ŽPV tipo sąsaja su moters lytinių partnerių skaičiumi

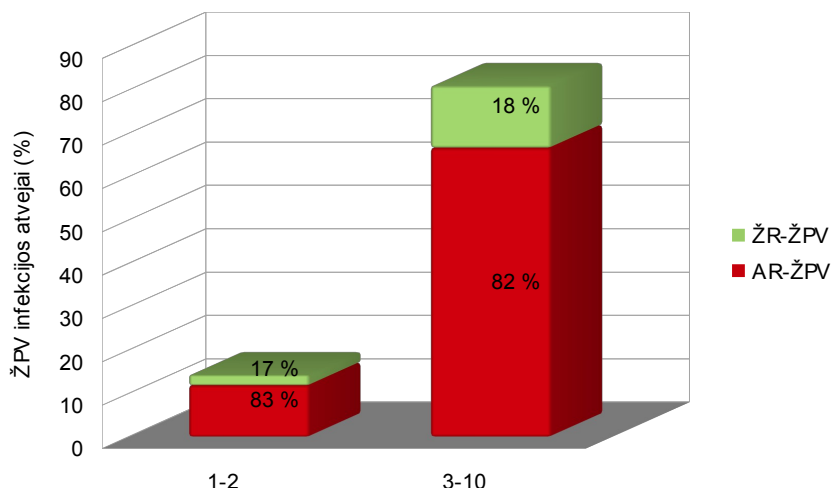
Tyrime dalyvaujančių moterų buvo paprašyta anketoje nurodyti lytinių partnerių skaičių. Pagal surinktus duomenis, tyrime dalyvavusių moterų lytinių partnerių skaičius buvo nuo 1 iki 10, vidurkis $3,61 \pm 2,6$ partnerių. Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su moters lytinių partnerių skaičiumi, 42 ŽPV užsikrėtusios moterys buvo suskirstytos į 2 grupes: turėjusias mažai partnerių – nuo 1 iki 2 ir turėjusias daug partnerių – nuo 3 iki 10 (9 lentelė).

Pirmoje grupėje (mažai lytinių partnerių) ŽPV nustatytas 14,3 % moterų, iš kurių AR-ŽPV sudarė 83,3 %, o ŽR-ŽPV sudarė 16,7 %. Antroje grupėje (daug lytinių partnerių) ŽPV

nustatytas 81 % moterų, iš kurių AR-ŽPV sudarė 82,4 %, o ŽR-ŽPV sudarė 17,6 % (13 pav.). Užsikrėtimas ŽPV statistiškai patikimai dažnesnis moterims turėjusioms daug lytinių partnerių (2 grupė – nuo 3 iki 10 partnerių), lyginant su turėjusiomis mažai lytinių partnerių (1 grupė – nuo 1 iki 2 partnerių) $p=0,001$.

9 lentelė. ŽPV infekuotų moterų grupės pagal lytinių partnerių skaičių.

Grupės pagal lytinių partnerių skaičių		N	%
1 grupė (mažai partnerių)	1-2	6	14,3
2 grupė (daug partnerių)	≥ 3	34	81



13 pav. ŽPV infekcijos atvejų pasiskirstymas grupėse pagal lytinių partnerių skaičių.

3.2.5. ŽPV tipo sąsaja su gimdymu

Vykdamas tyrimą buvo surinkta informacija apie tai, kiek kartų moteris gimdė. Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su gimdymų skaičiumi, moterys turėjo būti suskirstytos į 2 grupes: mažai gimdžiusias (nuo 0 iki 2 vaikų) ir daug gimdžiusias (3 ir daugiau vaikų). Tačiau dėl mažos daug gimdžiusių moterų imties (10 lentelė) tokių grupių lyginimas neįmanomas. Todėl buvo išskirtos kitokios 2 grupės: gimdžiusių ir negimdžiusių moterų (11 lentelė). Taip buvo siekiama patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su gimdymu.

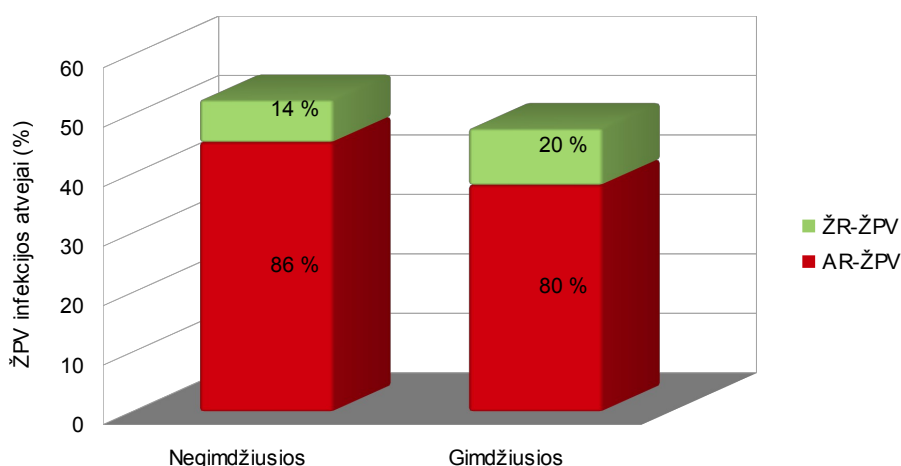
10 lentelė. Tyrimo dalyvavusių moterų pasiskirstymas pagal gimdymų skaičių.

Gimdymų skaičius	N
0	48
1	20
2	25
3	5
4	1

11. lentelė. ŽPV infekuotų moterų grupės pagal gimdymą.

Grupės pagal gimdymą		N	%
1 grupė	Negimdžiusios	22	52,4
2 grupė	Gimdžiusios	20	47,6

Pirmoje (negimdžiusių moterų) grupėje ŽPV nustatytas 52,4 % moterų, iš kurių AR-ŽPV sudarė 86,4 %, o ŽR-ŽPV sudarė 13,6 %. Antroje (gimdžiusių moterų) grupėje ŽPV nustatytas 47,6 %, iš kurių AR-ŽPV sudarė 80 %, o ŽR-ŽPV sudarė 20 % (14 pav.). Skirtumas tarp šių grupių statistiškai nereikšmingas ir ŽPV infekcijos tikimybė su gimdymu nesusijusi.



14 pav. ŽPV infekcijos atvejų pasiskirstymas grupėse pagal gimdymą.

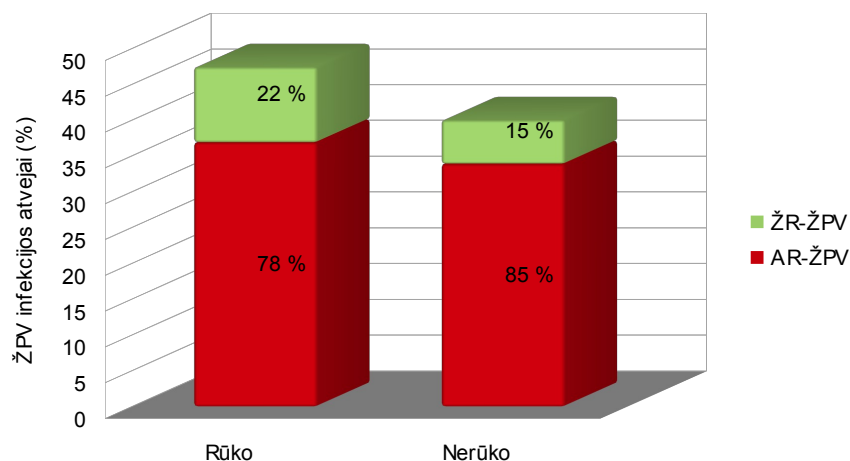
3.2.6. ŽPV tipo sąsaja su rūkymu

Vykdam tyrimą, moterų buvo paprašyta užpildyti anketą, nurodant ar jos rūko. Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su rūkymu, buvo lyginama kiek ŽPV atvejų yra kiekvienoje iš grupių (12 lentelė).

12. lentelė. ŽPV infekcijos atvejų skaičius moterų grupės pagal rūkimą.

Grupės pagal rūkimą		N	%
1 grupė	Rūko	9	47,4
2 grupė	Nerūko	33	40,7

Pirmoje (rūkančių moterų) grupėje ŽPV nustatytas 47,4 % moterų, iš kurių AR-ŽPV sudarė 77,8 %, o ŽR-ŽPV – 22,2 %. Antroje (nerūkančių moterų) grupėje ŽPV nustatytas 40,7 %, iš kurių AR-ŽPV sudarė 84,8 %, o ŽR-ŽPV – 15,2 %. Rezultatai pateikti 15 pav. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nėra.



15 pav. ŽPV infekcijos atvejų skaičius moterų grupės pagal rūkimą

3.2.7. ŽPV tipo sąsaja su moters naudojama apsaugos nuo nėštumo priemone

Tyrime dalyvaujančių moterų buvo paprašyta anketoje nurodyti kokią apsaugos nuo nėštumo priemonę naudoja. Pagal surinktus duomenis, 19 tyrime dalyvavusių moterų nesisaugo, o likusios moterys naudojo įvairius apsaugos metodus: 45 moterys naudojo prezervatyvus; 6 – spiralę; 13 – hormoninius kontraceptikus; 5 – vaisingų dienų skaičiavimą; 8 – nutrauktą lytinį aktą. Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su apsaugos nuo nėštumo priemone, 42 ŽPV užsikrėtusios moterys buvo suskirstytos į 2 grupes: naudojančias barjerinę ir nebarjerinę kontracepciją (13 lentelė). Buvo tiriama ar yra sąsaja tarp apsaugos nuo nėštumo tipo ir užsikrėtimo ŽPV ir ar hormoninių kontraceptikų vartojimas susijęs su ŽPV infekcija.

13. lentelė. ŽPV infekuotų moterų grupės pagal naudojamos kontracepcijos tipą.

Grupės pagal kontracepcijos tipą		N	%
1 grupė	Barjerinė kontracepcija	20	47,6
2 grupė	Nebarjerinė kontracepcija	15	35,7
Grupės pagal hormoninės kontracepcijos vartojimą			
1 grupė	Vartoja hormoninę kontracepciją	21	50
2 grupė	Nevartoja hormoninės kontracepcijos	21	50

Infekcija ŽPV buvo nustatyta 47,6 % barjerinę ir 35,7 % nebarjerinę kontracepciją naudojančioms moterims. Nenustatytas ryšys tarp užsikrėtimo ŽPV ir naudojamos apsaugos nuo nėštumo grupės. Hormoninės kontracepcijos naudojimas taip pat neturėjo įtakos ŽPV infekcijai – ir ją vartojančių ir nevartojančių moterų grupėse ŽPV infekcijos atvejų skaičius buvo vienodas.

3.2.8. ŽPV infekcijos sąsaja su drėgno tepinėlio rezultatais

Vykdamas tyrimą buvo ne tik nustatomas ŽPV tipas, bet taip pat buvo atliktas drėgnas

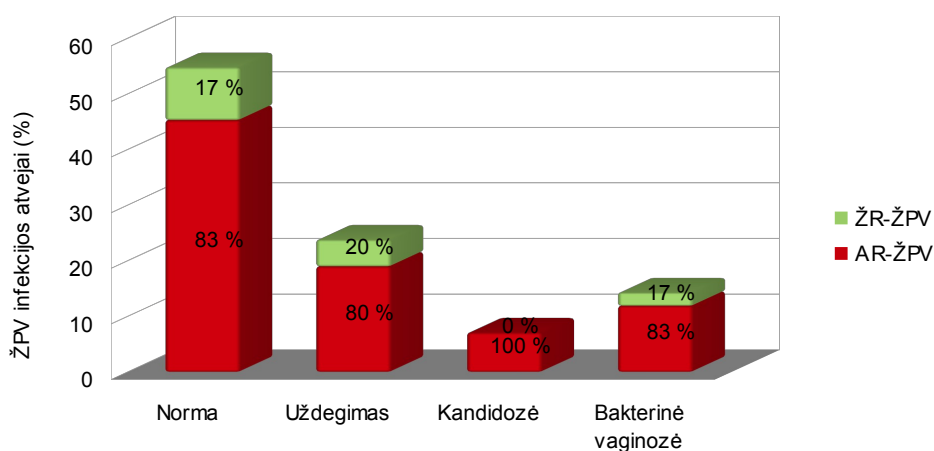
tepinėlis, kurio rezultatai buvo suskirstyti į 4 grupes: norma, uždegimas, kandidozė arba bakterinė vaginozė (14 lentelė).

14 lentelė. ŽPV infekuotų moterų drėgno tepinėlio rezultatų grupės.

Drėgno tepinėlio rezultatų grupės	N	%
1. Norma	23	54,8
2. Uždegimas	10	23,8
3. Kandidozė	3	7,1
4. Bakterinė vaginozė	6	14,3

Pirmojoje grupėje (norma) ŽPV aptikta 23 atvejais (54,8 %), iš kurių 82,6 % buvo AR-ŽPV, o ŽR-ŽPV – 17,4 %. Antroje grupėje (uždegimas) aptikta 10 atvejų ŽPV (23,8 %), iš kurių 8 buvo AR-ŽPV (80 %) ir 2 – ŽR-ŽPV (20 %). Trečiojoje grupėje (kandidozė) – ŽPV aptikta 3 atvejais (7,1 %), kurių 100 % sudarė AR-ŽPV tipai. Ketvirtojoje grupėje (bakterinė vaginozė) ŽPV aptikta 6 atvejais (14,3 %), kurių 5 (83,3 %) buvo AR-ŽPV tipai ir 1 (16,7 %) ŽR-ŽPV tipas (16 pav.). Užsikrėtimas ŽPV statistiškai patikimai nebuvo susietas su nei viena iš grupių.

16 pav. ŽPV infekcijos atvejų pasiskirstymas pagal drėgno tepinėlio grupes.



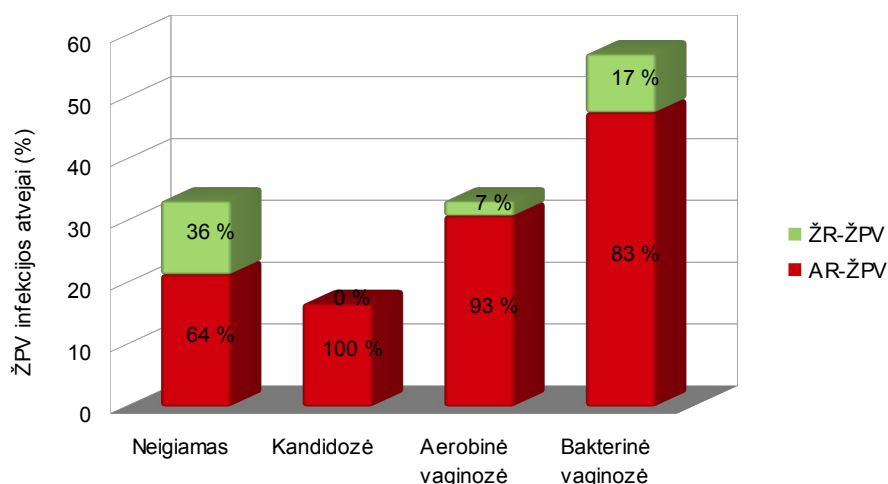
3.2.9. ŽPV infekcijos sąsaja su pasėlio iš gimdos kaklelio rezultatais

Vykdamas tyrimą taip pat buvo atliktas pasėlis iš gimdos kaklelio, kurio rezultatai buvo suskirstyti į tokias grupes: neigiamas, kandidozė, aerobinės vaginozės sukėlėjų aptikimas (pasėlyje nustačius *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*) ir bakterinės vaginozės sukėlėjų aptikimas (pasėlyje nustačius *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*). Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su pasėlio iš gimdos kaklelio rezultatais, 42 ŽPV užsikrėtusios moterys buvo suskirstytos į išvardintas 4 grupes (15 lentelė).

15 lentelė. ŽPV infekuotų moterų pasėlio iš gimdos kaklelio grupės.

Pasėlio iš gimdos kaklelio rezultatų grupės	N	%
1. Neigiamas	14	33,3
2. Kandidozė	7	16,7
3. Aerobinio vaginito sukėlėjų aptikimas	14	33,3
4. Bakterinės vaginozės sukėlėjų aptikimas	24	57,1

Pirmoje grupėje (neigiamas pasėlis) ŽPV aptikta 14 atvejų (33,3 %), iš kurių 9 buvo AR-ŽPV (64,3 %) ir 5 – ŽR-ŽPV (35,7 %). Antroje grupėje (kandidozė) ŽPV aptikta 7 atvejais (16,7 %), kurių 100 % sudarė AR-ŽPV. Trečioje grupėje (aerobinis vaginitas) ŽPV aptikta 14 atvejų (33,3 %), iš kurių 13 buvo AR-ŽPV (92,9 %) ir 1 – ŽR-ŽPV (7,1 %). Ketvirtoje grupėje (bakterinė vaginozė) ŽPV aptikta 24 atvejais (57,1 %), iš kurių 20 buvo AR-ŽPV (83,3 %) ir 4 – ŽR-ŽPV (16,7 %). Rezultatai pavaizduoti 17 pav. Užsikrėtimas ŽPV statistiškai patikimai nebuvo susietas su nei viena iš grupių.



17 pav. ŽPV infekcijos atvejų pasiskirstymas pagal pasėlio iš gimdos kaklelio grupes.

Siekiant patikrinti ar užsikrėtimas ŽPV yra susijęs su lytinių takų infekcijomis, 42 ŽPV užsikrėtusios moterys buvo suskirstytos į grupes, pagal pasėlyje iš gimdos kaklelio nustatytus kandidozės (*Candida sp.*), aerobinio vaginito (*Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*) ir bakterinės vaginozės (*Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*) sukėlėjus (16 lentelė).

16 lentelė. ŽPV infekuotų moterų pasėlio iš gimdos kaklelio grupės pagal lytinių takų infekcijų sukėlėjus.

Lytinių takų infekcijų sukėlėjai	N	%
<i>Candida sp.</i>	7	16,7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	4,8
<i>Atopobium vaginae</i>	20	47,6
<i>Gardnerella vaginalis</i>	4	9,5

Gardnerella vaginalis buvo statistiškai patikimai ($p=0,016$) dažniau nustatoma ŽPV infekuotoms moterims, tačiau *Gardnerella vaginalis* tokie rezultatai gauti dėl labai mažos imties – visi 4 *Gardnerella vaginalis* atvejai buvo ŽPV teigiami. Tarp kitų lytinių takų infekcijų sukėlėjų ir ŽPV infekcijos ryšys nenustatytas.

3.3. Rezultatų aptarimas

3.3.1. Moters ir gydytojo surinktų mėginių rezultatų palyginimas

Vertinant pačių moterų ir gydytojo akušerio ginekologo paimtus ŽPV mėginius, visiškai sutapo 78 % mėginių. Dar 13 % mėginių sutapimas buvo dalinis, kai moters ar gydytojo surinktame mėginyje nustatomi papildomi ŽPV tipai:

- 61,5 % tokių mėginių papildomi ŽPV tipai nustatyti moters surinktame mėginyje iš makšties. Taip gali būti tokiais atvejais, kai ŽPV virusas organizmo apsauginių sistemų yra jau pašalintas iš gimdos kaklelio ir mėginyje iš gimdos kaklelio jis nebeaptinkamas, o į makštį patenka su apmirusiomis gimdos kaklelio ląstelėmis ir mėginyje iš makšties gali būti aptinkami ilgiau, nei mėginyje iš gimdos kaklelio [1].
- 38,5 % dalinio sutapimo atvejų, papildomi ŽPV tipai nustatyti gydytojo surinktame mėginyje iš gimdos kaklelio. Taip galėjo nutikti dėl naujos ŽPV infekcijos, kai ŽPV virusas dar neaptinkamas makštyje [1].

Vykdam patikros programą nustatant ŽPV moterų surinktoje medžiagoje iš makšties, šios 13 % moterų patenkančių į dalinio nesutapimo grupę vis tiek būtų kviečiamos pasitikrinti pas gydytoją ginekologą, nes joms buvo nustatytas bent vienas AR-ŽPV tipas [48].

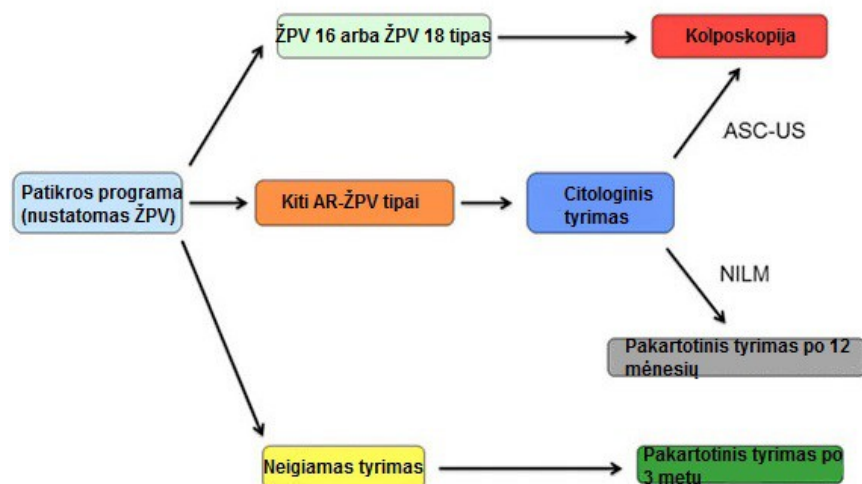
9 % atvejų ŽPV tipai visiškai nesutapo pačios moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose:

- 4 % atvejų moters surinktame mėginyje iš makšties buvo nustatytas ŽPV tipas, o ginekologo surinktas mėginys buvo neigiamas (klaidingai teigiami rezultatai). Taip galėjo

nutikti dėl minėtos priežasties, kai ŽPV virusas iš gimdos kaklelio jau pašalintas, bet makštyje dar aptinkamas.

- 2 % atvejų moters ir gydytojo surinktuose mėginiuose buvo nustatyti visiškai skirtingi ŽPV tipai, tačiau abiem atvejais moters surinktame mėginyje buvo nustatytas bent vienas AR-ŽPV tipas, todėl vykdant patikros programą tokios moterys būtų kviečiamos pasitikrinti pas gydytoją ginekologą, kur būtų tiksliau įvertinama gimdos kaklelio būklė (18 pav.).
- Tik 3 % atvejų buvo klaidingai neigiami, kai moters surinktame mėginyje ŽPV nenustatytas, o gydytojo surinktame mėginyje iš gimdos kaklelio ŽPV aptiktas.

Taigi iš 100 ištirtų moterų tik 3 atvejai buvo klaidingai neigiami (10 pav.), todėl, jeigu gimdos kaklelio vėžio prevencijos programa būtų vykdoma tiriamąją medžiagą individualiais paėmėjais surenkant pačioms moterims, remiantis gautais rezultatais tikėtina, kad tik 3 % moterų nebūtų nustatyta ŽPV infekcija. Tikėtina, kad patikros programą vykdant tiriamąją medžiagą surenkant pačioms moterims, programoje dalyvautų daugiau moterų dėl procedūros supaprastėjimo. Juolab, kad dauguma tyrime dalyvavusių moterų (99 %) anketoje nurodė, kad savarankiškai imdamos mėginį jautėsi komfortabiliai, o jį paimti nebuvo sudėtinga. Taigi šie 3 % klaidingai neigiamų rezultatų sudaro labai nežymią dalį dar ir dėl to, nes tikėtina, kad pačioms moterims surenkant tiriamąją medžiagą, gimdos kaklelio vėžio prevencijos programoje dalyvautų didesnė populiacijos dalis. Todėl būtų pagerintas prevencijos programos vykdymas, o kartu, tikėtina, kad sumažėtų mirčių dėl gimdos kaklelio vėžio atvejų.



18 pav. Rekomenduojamas patikros programos algoritmas [32].

3.3.2. Įvairių veiksnių įtakos ŽPV infekcijai rezultatų palyginimas

Darbo metu gauti rezultatai rodo, kad ŽPV infekcijos atvejų skaičius mažėja, didėjant moterų amžiui. Nors paskutinė amžiaus grupės (51–65 metų) imtis labai maža ir nepatikima, iš kitų trijų amžiaus grupių matyti tendencija, kad amžiui didėjant, ŽPV infekcijos atvejų mažėja (11 pav). Tai atitinka literatūroje pateikiamus duomenis [49] ir gali būti aiškinama tuo, kad jaunesniame amžiuje būdinga didesnė partnerių kaita, taip pat vyksta pirminis užsikrėtimas ŽPV. Su amžiumi duguma ŽPV tipų pašalinama ir dėl mažesnės partnerių kaitos sumažėja naujų ŽPV infekcijų.

Literatūroje teigiama, kad ŽPV infekcijos riziką didina tokie veiksniai, kaip ankstyva lytinio gyvenimo pradžia, didelis lytinių partnerių skaičius (3 ir daugiau), didelis gimdymų skaičius, hormoninių kontraceptikų vartojimas, rūkymas, kai kurios lytinių takų infekcijos [41, 43]. Šio darbo metu buvo nustatyta, kad ŽPV infekcija statistiškai patikimai dažnesnė ankstyvą lytinį gyvenimą pradėjusioms (iki 18 metų) ir didesnę (≥ 3) lytinių partnerių skaičių turėjusioms moterims. Dėl mažos daug gimdžiusių (3 ir daugiau vaikų) moterų imties, nebuvo įmanoma statistiškai patikimai palyginti gimdymo įtakos ŽPV infekcijos atsiradimui, todėl tiriamos grupės buvo sudarytos taip, kad grupių imtys būtų panašaus dydžio (gimdymo veiksnys išskirtas į gimdžiusių ir negimdžiusių moterų grupes), tačiau nebuvo nustatytas statistiškai patikimas ryšys tarp ŽPV infekcijos dažnio ir gimdymo, kaip ir tarp ŽPV infekcijos dažnio ir rūkymo ar naudojamos kontracepcijos tipo.

Literatūroje pateikiama prieštaringa informacija dėl ŽPV infekcijos ryšio su BV. Vieni šaltiniai teigia, kad ŽPV infekcija statistiškai patikimai dažnesnė moterims, kurioms nustatyta BV [44, 50, 51], kiti tokio ryšio neaptinka [39]. Šio darbo metu ryšys tarp ŽPV infekcijos ir BV nenustatytas. Taip pat nebuvo nustatytas ŽPV infekcijos ryšys su nei vienu iš lytinių takų infekcijos sukėlėjų, išskyrus *Gardnerella vaginalis*. Ryšio nebuvimas tarp ŽPV infekcijos ir *Candida sp.*, *Streptococcus agalactiae* bei *Atopobium vaginae* atitinka literatūroje aprašomus duomenis [43], kaip ir ryšio buvimas tarp ŽPV ir *Gardnerella vaginalis* infekcijos [33, 43]. Tačiau, nors šie duomenys atitinka literatūroje pateikiamą informaciją, dėl labai mažos *Gardnerella vaginalis* imties, derėtų pakartoti tyrimus, esant didesnei *Gardnerella vaginalis* imčiai ir tik tada vertinti ar šios infekcijos yra susijusios.

IŠVADOS

1. Ištyrus 100 gydytojo (mėginys iš gimdos kaklelio) ir 100 pačios moters (mėginys iš makšties) paimtų mėginių TL-PGR metodu, mėginiuose buvo nustatyti ŽPV tipai, kurie buvo priskirti aukštos (AR-ŽPV) arba žemos (ŽR-ŽPV) onkogeninės rizikos tipams.
2. Palyginus gydytojo ir pačios moters paimtų mėginių rezultatus buvo nustatyta, kad moters individualiais paėmėjais surinkta medžiaga yra tinkama ŽPV DNR nustatyti ir rekomenduojama gimdos kaklelio vėžio patikros programą vykdyti ŽPV DNR nustatant iš pačios moters surinktos medžiagos.
3. ŽPV infekcijos atvejų mažėja su amžiumi; mažėjant lytinių partnerių skaičiui ir vėlėjant lytinio gyvenimo pradžiai. Tarp ŽPV infekcijos ir rūkymo, naudojamos kontracepcijos tipo bei kitų lytinių takų infekcijų sukėlėjų, neaptiktas.

REKOMENDACIJOS

Atlikti tyrimai parodė, kad pačios moters individualiais paėmėjais surinkta medžiaga iš makšties yra tinkama ŽPV DNR nustatyti ir tik 3 % atvejų buvo klaidingai neigiami, todėl taip surinkta tiriamoji medžiaga yra tinkama vykdyti gimdos kaklelio vėžio patikros programą. Yra tikėtina, jog toks tiriamosios medžiagos surinkimo būdas padidintų patikros programoje dalyvaujančios populiacijos apimtį taip pagerinant ligos diagnozavimą ir sumažinant gimdos kaklelio vėžio atvejų.

SUMMARY

Assessment of the Suitability of Self-collected Samples for the Detection of Human Papillomavirus (HPV) DNA and Correlation Between HPV Infection and Other Sexually Transmitted Infections

Cervical carcinoma is the second most common neoplasia in women worldwide that is associated with *Human papillomavirus* (HPV) infection. In order to diagnose the disease in early stages, it is crucial to implement cervical cancer screening program and to cover the widest possible part of the population.

The aim of the Thesis: Assessment of the suitability of self-collected specimens for the detection of the DNA of *Human Papillomavirus* (HPV) and correlation between HPV infection and other sexually transmitted infections, submit recommendations regarding the specimen used in the cervical cancer screening program.

Objectives:

1. To identify HPV virus and its' genotypes in the self-collected specimens and specimens collected by gynecologists while using RT-PCR method.
2. To assess the suitability of self-collected specimens for the detection of the HPV DNA while comparing the HPV types detected in the self-collected specimens and specimens collected by gynecologists.
3. To assess the correlation between HPV infection and persistent bacteria in the vagina.

Methods. 100 women participated in the study. During the study various HPV types were detected in the vaginal self-collected specimens and a cervical specimen collected by a gynecologist. In order to do that, at first DNA was being extracted from the specimens and after that the RT-PCR was performed. The results acquired were compared in between in order to assess the suitability of the method.

Results. Results of 78 % of the self-collected specimens and specimens collected by gynecologist were identical. Coincidence of another 13 % of the results was partial. 9 % of detected HPV types did not coincide at all, but only 3 % of these cases were false negative (HPV was not detected in the self-collected sample, but was present in the doctor collected specimen). Incidence of HPV infection goes down as women get older, HPV infection is statistically more probable for women, whose sexual life started at early age (earlier than 18 years old) and those who had more sexual partners (3 and more). There was detected no correlation between HPV and smoking, ways of birth control, bacterial vaginitis or candidiasis. However, *Gardnerella vaginalis* was detected more frequently in HPV-positive women.

Conclusions.

1. The 100 specimens were analysed using RT-PCR method. HPV virus types were detected and classified as high or low oncogenic risk.
2. After the assessment of suitability of self-collected specimens for the detection of the HPV DNA while comparing the HPV types detected in the self-collected specimens and specimens collected by gynecologists it was determined that self-collected specimens can be used aiming to detect HPV. It is recommended to perform the cervical cancer screening program using self-collected specimens.
3. It was determined that *Gardnerella vaginalis* were detected more frequently in HPV-positive women. No correlation with other sexually transmitted agents was determined.

Keywords. Cervical cancer, *Human Papillomavirus*, cervical cancer screening program, bacterial vaginosis, samples self-collection.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Eperon I, Vassilakos P, Navarria I, Menoud P, Gauthier A, Pache J et al. Randomized comparison of vaginal self-sampling by standard vs. dry swabs for Human papillomavirus testing. *BMC Cancer*. 2013;13(1):353.
2. Stutz C, Reinz E, Honegger A, Bulkescher J, Schweizer J, Zanier K et al. Intracellular Analysis of the Interaction between the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein and Inhibitory Peptides. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0132339.
3. Eide M, Debaque H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. *Annales de Pathologie*. 2012;32(6):e15-e23.
4. Schiffman, M., Burk, R. D., Boyle, S., Raine-Bennett, T., Katki, H. A., Gage, J. C., Castle, P. E. A study of genotyping for management of human papillomavirus-positive, cytology-negative cervical screening results. *J Clin Microbiol*, 2015;53(1), 52-59. doi:10.1128/JCM.02116-14.
5. Ronco, G., Dillner, J., Elfstrom, K. M., Tunesi, S., Snijders, P. J., Arbyn, M., International, H. P. V. s. w. g. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014;383(9916), 524-532. doi:10.1016/S0140-6736(13)62218-7.
6. Cadman, L., Ashdown-Barr, L., Waller, J., & Szarewski, A. Attitudes towards cytology and human papillomavirus self-sample collection for cervical screening among Hindu women in London, UK: a mixed methods study. *J Fam Plann Reprod Health Care*, 2015;41(1), 38-47. doi:10.1136/jfprhc-2013-100705.
7. Kim, J. H., Kim, I. W., Kim, Y. W., Park, D. C., Kim, Y. W., Lee, K. H., Ahn, W. S. Comparison of single-, double- and triple-combined testing, including Pap test, HPV DNA test and cervicography, as screening methods for the detection of uterine cervical cancer. *Oncol Rep*, 2013;29(4), 1645-1651. doi:10.3892/or.2013.2257.
8. Belinson, J. L., Hu, S., Niyazi, M., Pretorius, R. G., Wang, H., Wen, C., Qiao, Y. L. Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: Implications for vaginal self-collection. *Int J Cancer*; 2010;127(5), 1151-1157. doi:10.1002/ijc.25144
9. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical Cancer Burden and Prevention Activities in Europe. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2012;21(9):1423-1433.

10. Statistinių duomenų apie mirties priežastis paieškos priemonė pagal pasirinktus parametrus - Higienos institutas [Internet]. Hi.lt. 2016 [cited 17 March 2016]. Available from: http://www.hi.lt/lt/paieskos_priemone.html
11. Cervical cancer epidemiology and aetiology of cervical carcinoma | Eurocytology [Internet]. Eurocytology.eu. 2016 [cited 17 March 2016]. Available from: <http://www.eurocytology.eu/en/course/953>
12. Lawson, J. S., & Heng, B. Viruses and breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2010;2(2), 752-772. doi:10.3390/cancers2020752.
13. Mongelos P, Mendoza L, Rodriguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;39:44-49.
14. McMillan, A., Young, H., Ogilvie, M., & Scot, R. *Clinical practice in sexually transmissible infections*. Philadelphia: W. B. Saunders. 2012.
15. Horvath C, Boulet G, Renoux V, Delvenne P, Bogers J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology Journal*. 2010;7(1):11.
16. Braaten, K. P., & Laufer, M. R. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol*, 2008;1(1), 2-10.
17. Winnie Wan P. Onco Health [Internet]. Oncohealthcorp.com. 2016 [cited 22 May 2016]. Available from: <http://www.oncohealthcorp.com/technology.html>
18. Schiller J, Day P, Kines R. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*. 2010;118(1):S12-S17.
19. Asih T, Lenhart S, Wise S, Aryati L, Adi-Kusumo F, Hardianti M et al. The Dynamics of HPV Infection and Cervical Cancer Cells. *Bulletin of Mathematical Biology*. 2015;78(1):4-20.
20. Amador-Molina A, Hernández-Valencia J, Lamoyi E, Contreras-Paredes A, Lizano M. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses*. 2013;5(11):2624-2642.
21. Karim R, Tummers B, Meyers C, Biryukov J, Alam S, Backendorf C et al. Human Papillomavirus (HPV) Upregulates the Cellular Deubiquitinase UCHL1 to Suppress the Keratinocyte's Innate Immune Response. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003384.
22. Gillet E, Meys J, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, Temmerman M et al. Association between Bacterial Vaginosis and Cervical Intraepithelial Neoplasia: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e45201.

23. Mendoza L, Mongelos P, Paez M, Castro A, Rodriguez-Riveros I, Gimenez G et al. Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay: a cross-sectional analytical study. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):531.
24. Campos A, Murta E, Michelin M, Reis C. Evaluation of Cytokines in Endocervical Secretion and Vaginal pH from Women with Bacterial Vaginosis or Human Papillomavirus. *ISRN Obstetrics and Gynecology.* 2012;2012:1-7.
25. Brotman R, Shardell M, Gajer P, Tracy J, Zenilman J, Ravel J et al. Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *Journal of Infectious Diseases.* 2014;210(11):1723-1733.
26. Peres A, Camarotti J, Cartaxo M, Alencar N, Stocco R, Beçak W et al. Molecular analysis and conventional cytology: association between HPV and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a Brazilian population. *Genetics and Molecular Research.* 2015;14(3):9497-9505.
27. Seegene [Internet]. Seegene.com. 2016 [cited 22 January 2016]. Available from: http://www.seegene.com/neo/en/introduction/core_dpo.php
28. Seegene [Internet]. Seegene.com. 2016 [cited 12 April 2016]. Available from: <http://www.seegene.com/neo/en/products/hpv/anyplex2 HPV28.php>
29. Agorastos T, Chatzistamatiou K, Katsamagkas T, Koliopoulos G, Daponte A, Constantinidis T et al. Primary Screening for Cervical Cancer Based on High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Detection and HPV 16 and HPV 18 Genotyping, in Comparison to Cytology. *PLOS ONE.* 2015;10(3):e0119755.
30. Arbyn M, Antoine J, Mägi M, Smailyte G, Stengrevics A, Suteu O et al. Trends in cervical cancer incidence and mortality in the Baltic countries, Bulgaria and Romania. *International Journal of Cancer.* 2010;128(8):1899-1907.
31. Cadman L, Ashdown-Barr L, Waller J, Szarewski A. Attitudes towards cytology and human papillomavirus self-sample collection for cervical screening among Hindu women in London, UK: a mixed methods study. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2014;41(1):38-47.
32. New recommendation for cervical cancer screening, using HPV test alone [Internet]. Medicalxpress.com. 2016 [cited 22 March 2016]. Available from: <http://medicalxpress.com/news/2015-01-cervical-cancer-screening-hpv.html>
33. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):271.

34. Ahn W. Comparison of single-, double- and triple-combined testing, including Pap test, HPV DNA test and cervicography, as screening methods for the detection of uterine cervical cancer. *Oncology Reports*. 2013.
35. Liu, Y., Lu, Z., Xu, R., & Ke, Y. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget*, 2015;7(5),5852-5864. Retrieved from <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=6809>
36. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget*. 2016;.
37. Gonçalves A, Guerreiro da Silva I, Eleutério Junior J, Tenório da Silva T, Bruneska D, Ximenes R et al. High Risk HPV E6/E7 Oncoprotein Expression in Women with High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2016;38(03):154-159.
38. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, et al. Multiple Human Papillomavirus Infections with High Viral Loads Are Associated with Cervical Lesions but Do Not Differentiate Grades of Cervical Abnormalities. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(5):1458-1464. doi:10.1128/JCM.00087-13.
39. Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, et al. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016;111(2):106-113. doi:10.1590/0074-02760150330.
40. Alberts C, Schim van der Loeff M, Papenfuss M, da Silva R, Villa L, Lazcano-Ponce E et al. Association of Chlamydia trachomatis Infection and Herpes Simplex Virus Type 2 Serostatus With Genital Human Papillomavirus Infection in Men. *Sexually Transmitted Diseases*. 2013;40(6):508-515.
41. Donders GVieira-Baptista P. Bacterial vaginosis and inflammatory response showed association with severity of cervical neoplasia in HPV-positive women. *Diagnostic Cytopathology*. 2016;:n/a-n/a.
42. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch F, de Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(12):1789-1799.
43. Rodriguez-Cerdeira C, Sanchez-Blanco E, Alba A. Evaluation of Association between Vaginal Infections and High-Risk Human Papillomavirus Types in Female Sex Workers in Spain. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2012;2012:1-7.

44. Gillet E, Meys J, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1):10.
45. Castell S, Krause G, Schmitt M, Pawlita M, Deléré Y, Obi N et al. Feasibility and acceptance of cervicovaginal self-sampling within the German National Cohort (Pretest 2). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2014;57(11):1270-1276.
46. van de Wijgert J, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H et al. The Vaginal Microbiota: What Have We Learned after a Decade of Molecular Characterization?. *PLoS ONE.* 2014;9(8):e105998.
47. Mahomed K, Evans D, Sauls C, Richter K, Smith J, Firnhaber C. Human papillomavirus (HPV) testing on self-collected specimens: perceptions among HIV positive women attending rural and urban clinics in South Africa. *Pan African Medical Journal.* 2014;17.
48. Lazcano-Ponce E, Lorincz A, Cruz-Valdez A, Salmerón J, Uribe P, Velasco-Mondragón E et al. Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial. *The Lancet.* 2011;378(9806):1868-1873.
49. Laia Bruni, Mireia Diaz, Mireia Castellsagué, Elena Ferrer, F. Xavier Bosch, and Silvia de Sanjosé. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J Infect Dis.* (2010) 202 (12): 1789-1799 doi:10.1086/657321.
50. Menon SS, Rossi R, Harebottle R, Mabeya H, vanden Broeck D. Distribution of human papillomaviruses and bacterial vaginosis in HIV positive women with abnormal cytology in Mombasa, Kenya. *Infectious Agents and Cancer.* 2016;11:17. doi:10.1186/s13027-016-0061-1.
51. Lu H, Jiang P-C, Zhang X-D, et al. Characteristics of bacterial vaginosis infection in cervical lesions with high risk human papillomavirus infection. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2015;8(11):21080-21088.
52. SONG D, LI H, LI H, DAI J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncology Letters.* 2015;10(2):600-606. doi:10.3892/ol.2015.3295.