

lek. Katarzyna Bojanowska

**„Ocena wartości diagnostycznej testu
immunocytochemicznego identyfikującego
p16 i Ki67 w wykrywaniu HSIL i
weryfikacji pozytywnych wyników
cytodiagnostyki i testów molekularnych”.**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o
zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Witold Kędzia

Klinika Ginekologii
Katedra Perinatologii i Ginekologii
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Poznań, 2021

*Szczególne podziękowania składam na ręce
mojego Promotora i Mentora,
Pana prof. dr hab. Witolda Kędzi,
za rozbudzenie we mnie naukowego zainteresowania problematyką
profilaktyki i leczenia nowotworów żeńskich narządów płciowych.*

*Dziękuję **Panu Profesorowi**
za rzetelną opiekę promotorską i nadzór merytoryczny,
a nade wszystko za okazane wsparcie i nieustanne motywowanie mnie
na każdym etapie powstawania tej pracy.*

*Niniejszą rozprawę dedykuję **Rodzicom,**
dziękując za wychowanie w poczuciu własnej wartości
oraz naukę wytrwałości.*

Spis treści.

Wykaz stosowanych skrótów.	4
1. Wstęp.	7
1.1. Epidemiologia nowotworów HPV-zależnych okolicy anogenitalnej u kobiet.	7
1.1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy.	8
1.2. Etiologia i patogeneza raka szyjki macicy.	15
1.2.1. Wirus brodawczaka ludzkiego jako czynnik etiologiczny raków szyjki macicy.	15
1.2.2. Molekularne i komórkowe procesy zaangażowane w karcynogenezę na podłożu infekcji HPV.	18
1.2.3. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy jako prekursor raka szyjki macicy.	21
1.3. Profilaktyka raka szyjki macicy.	24
1.4. Wczesne wykrywanie stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy – narzędzia diagnostyczne.	26
1.4.1. Rozwój cytodiagnostyki – od metody konwencjonalnej do cytologii cienkowsarstwowej na podłożu płynnym.	27
1.4.2. Badania molekularne wykrywające wirusowe DNA lub mRNA.	30
1.4.3. Nowe metody diagnostyczne – rola biomarkerów i epigenetyki.	33
1.4.4. Kolposkopia.	36
1.5. Immunocytochemia i immunohistochemia – miejsce obu metod w diagnostyce patologii szyjki macicy.	39
1.5.1. Założenia metodologiczne testu immunocytochemicznego p16/Ki-67.	39
1.5.2. Test diagnostyczny CINtec® PLUS - zasada działania.	41
1.5.3. Rola testu CINtec® PLUS w skriningu pierwotnym - narzędzie diagnostyczne I rzutu.	42
1.5.4. Zastosowanie testu CINtec® PLUS w badaniach uzupełniających - narzędzie skriningowe II rzutu.	43
1.5.5. Test CINtec® PLUS do monitorowania nawrotu HSIL po leczeniu.	45
2. Cele pracy.	46
2.1. Cel główny.	46
2.2. Cele szczegółowe.	46
3. Materiał.	47
4. Metoda.	49
4.1. Cytodiagnostyka.	49
4.2. Test immunocytochemiczny CINtec® PLUS.	50
4.3. Test molekularny DNA HPV.	53
4.4. Kolposkopia.	54

4.5.	Biopsja szyjki macicy.....	55
4.6.	Analiza statystyczna.....	56
5.	Wyniki.....	59
5.1.	Charakterystyka populacji.....	59
5.2.	Wyniki poszczególnych narzędzi skriningowych.	64
5.2.1.	Cytodiagnostyka (LBC).	64
5.2.2.	Test DNA HPV.	66
5.2.3.	Test p16/Ki-67.	68
5.3.	Analiza korelacji dodatnich wyników testu p16/Ki-67 z nieprawidłową cytologią oraz obecnością DNA HPV.....	72
5.4.	Porównanie wartości diagnostycznej poszczególnych badań przesiewowych.	74
5.4.1.	Ocena testów przesiewowych w wykrywaniu rzeczywistych patologii szyjki macicy dla zmian CIN2+.	74
5.4.2.	Ocena testów przesiewowych w wykrywaniu rzeczywistych patologii szyjki macicy dla zmian CIN3+.	79
5.4.3.	Porównanie wartości diagnostycznej testów skriningowych w poszczególnych grupach wiekowych.	83
5.5.	Ocena wartości diagnostycznej testu CINtec® PLUS jako narzędzia uzupełniającego diagnostykę pierwszorzętową.....	86
6.	Dyskusja.....	88
7.	Wnioski.....	106
8.	Streszczenie.	107
9.	Abstract.	109
10.	Spis tabel, wykresów i rycin.....	111
10.1.	Tabele.....	111
10.2.	Wykresy.	112
10.3.	Ryciny.....	114
11.	Piśmiennictwo.	115

Wykaz stosowanych skrótów.

ACS	Amerykańskie Towarzystwo Walki z Rakiem (<i>ang. American Cancer Society</i>)
AGC	Atypowe komórki gruczołowe (<i>ang. atypical glandular cells</i>)
AIS	Gruczolakorak w miejscu, przedinwazyjny (<i>łac. adenocarcinoma in situ</i>)
ASCCP	Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (<i>ang. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology</i>)
ASC-H	Atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego, nie można wykluczyć HSIL (<i>ang. atypical squamous cells, cannot exclude HSIL</i>)
ASCP	Amerykańskie Towarzystwo Patologii Klinicznej (<i>ang. American Society for Clinical Pathology</i>)
ASC-US	Atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu (<i>ang. atypical squamous cells of undetermined significance</i>)
AUC	Pole powierzchni pod wykresem krzywej (<i>ang. area under curve</i>)
CAP	Kolegium Amerykańskich Patologów (<i>ang. College of American Pathologists</i>)
CDC	Ośrodek ds. Zwalczania i Profilaktyki Chorób (<i>ang. Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CDK	Kinaza cyklinozależna (<i>ang. cyclin-dependent kinase</i>)
CI	Przedział ufności (<i>ang. confidence interval</i>)
CIN1	Śródnabłonkowa neoplazja małego stopnia, łagodna (<i>ang. cervical intraepithelial neoplasia grade 1, mild</i>)
CIN2	Śródnabłonkowa neoplazja średniego stopnia, umiarkowana (<i>ang. cervical intraepithelial neoplasia grade 2, moderate</i>)
CIN3	Śródnabłonkowa neoplazja dużego stopnia, ciężka (<i>ang. cervical intraepithelial neoplasia grade 3, severe</i>)
CIS	Rak w miejscu, przedinwazyjny (<i>łac. carcinoma in situ</i>)
CONCORD	Globalny nadzór nad przeżywalnością pacjentów chorych na raka (<i>ang. Global surveillance of cancer survival</i>)
dsDNA	Dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. double-stranded deoxyribonucleic acid</i>)
ECIS	Europejski system informacji o nowotworach (<i>ang. European Cancer Information System</i>)
FDA	Agencja Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
GLOBOCAN	Światowe dane o nowotworach (<i>ang. Global Cancer Data</i>)

GPSK	Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny (<i>ang. University Hospital of Gynecology and Obstetrics</i>)
HDI	Wskaźnik rozwoju społecznego (<i>ang. Human Development Index</i>)
HIV	Ludzki wirus niedoboru odporności (<i>ang. Human immunodeficiency virus</i>)
HPV	Wirus brodawczaka ludzkiego (<i>ang. Human papillomavirus</i>)
HPV HR	Wysokoonkogenne typy wirusa brodawczaka ludzkiego (<i>ang. high-risk human papillomaviruses</i>)
HSIL	Śródnabłonkowa neoplazja wysokiego stopnia, wysokiego stopnia zmiany śródnabłonkowe w komórkach nabłonka płaskiego (<i>ang. high-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
HSV-2	Wirus opryszczki pospolitej typu 2 (<i>ang. Herpes simplex virus type 2</i>)
IARC	Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (<i>ang. International Agency for Research on Cancer</i>)
IFCPC	Międzynarodowa Federacja Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii (<i>ang. International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy</i>)
LAST	Mianownictwo zmian w nabłonku płaskim dolnej części przewodu pokarmowego i narządów płciowych (<i>ang. The Lower Anogenital Squamous Terminology</i>)
LBC	Cytologia na podłożu płynnym (<i>ang. Liquid-based Cytology</i>)
LSIL	Śródnabłonkowa neoplazja niskiego stopnia; niskiego stopnia zmiany śródnabłonkowe w komórkach nabłonka płaskiego (<i>ang. low-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
NHS	Państwowa ochrona zdrowia w Wielkiej Brytanii (<i>ang. National Health Service</i>)
NILM	Brak zmian śródnabłonkowych lub nowotworu złośliwego (<i>ang. negative for intraepithelial lesion or malignancy</i>)
NLR	Iloraz wiarygodności wyniku ujemnego (<i>ang. negative likelihood ratio</i>)
NPV	Ujemna wartość predykcyjna (<i>ang. negative predictive value</i>)
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>)
PLR	Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (<i>ang. positive likelihood ratio</i>)
PPSM	Pracownia i Poradnia Patofizjologii Szyjki Macicy (<i>ang. Laboratory and Outpatient Clinic of Cervical Patophysiology</i>)
PPV	Dodatnia wartość predykcyjna (<i>ang. positive predictive value</i>)
PTGiP	Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników (<i>ang. Polish Society of Gynecologists and Obstetricians</i>)
PTKiPSM	Polskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (<i>ang. Polish Society of Colposcopy and Pathology of the Cervix</i>)

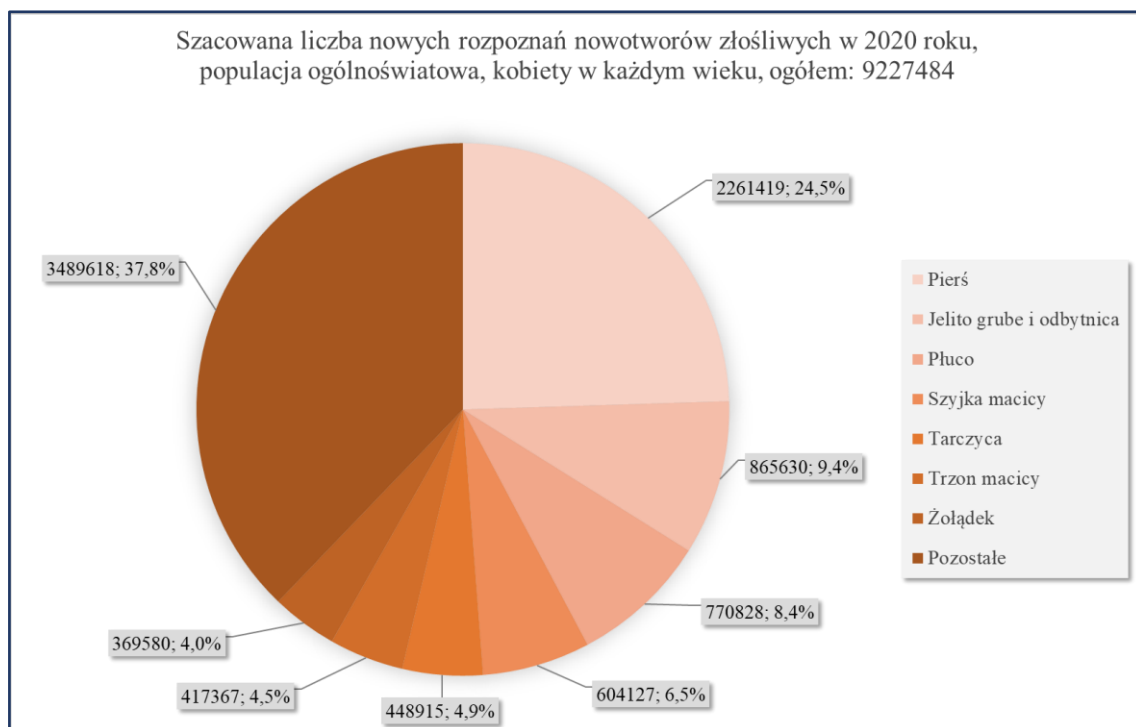
RCI	Skala Reida (<i>ang. Reid Colposcopic Index</i>)
SCJ	Połączenie międzynabłonkowe, między nabłonkiem płaskim i walcowatym (<i>ang. squamocolumnar junction</i>)
STD	Choroba przenoszona drogą płciową (<i>ang. sexually transmitted disease</i>)
STI	Zakażenie przenoszone drogą płciową (<i>ang. sexually transmitted infection</i>)
TBS	System klasyfikacji wyników cytologicznych według Bethesda (<i>ang. The Bethesda System</i>)
TZ	Strefa transformacji, strefa przekształceń (<i>ang. transformation zone</i>)
UE	Unia Europejska (<i>ang. European Union</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>ang. World Health Organization</i>)

1. Wstęp.

1.1. Epidemiologia nowotworów HPV-zależnych okolicy anogenitalnej u kobiet.

Uwzględniając szacunkowe dane Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), przyjmuje się, że globalnie w ciągu życia u jednej na pięć osób dojdzie do rozwoju nowotworu złośliwego, a na skutek choroby nowotworowej umrze 1 na 8 mężczyzn oraz 1 na 11 kobiet. Nowotwory złośliwe są pierwszą lub drugą przyczyną przedwczesnych zgonów osób przed siedemdziesiątym rokiem życia w większości raportowanych krajów¹.

W skali świata najczęstszym nowotworem złośliwym diagnozowanym u kobiet jest rak piersi. Szacowana zapadalność to 2,26 miliona nowych przypadków rozpoznanych w 2020 roku, co stanowi około 24,5% wszystkich nowo wykrytych nowotworów złośliwych u kobiet. Analizując wiodącą zachorowalność na nowotwory złośliwe u kobiet w 2020 roku w populacji ogólnoswiatowej, kolejno po raku piersi występują: rak jelita grubego (9,4%), rak płuca (8,4%), rak szyjki macicy (6,5%), rak tarczycy (4,9%) i rak trzonu macicy (4,5%)².



Wykres 1. Globalna zachorowalność na nowotwory złośliwe u kobiet w 2020 roku (źródło danych: GLOBOCAN 2020).

Około 4,5% wszystkich nowotworów złośliwych jest związanych z przetrwałą infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV, *human papillomavirus*). U obu płci łącznie stwierdza się 630 000 nowych przypadków w skali roku, przy czym obserwuje się istotną dysproporcję zapadalności na nowotwory HPV-zależne u kobiet i mężczyzn. W populacji kobiet notuje się rocznie około 570 000 przypadków nowotworów związanych z infekcją HPV, co stanowi 8,6% wszystkich nowo wykrytych nowotworów złośliwych. W grupie mężczyzn liczba ta wynosi 60 000 przypadków/rok czyli 0,8%. Znamienne są też różnice w zachorowalności na nowotwory HPV-zależne w różnych rejonach świata. Dla przykładu w Indiach i Afryce Subsaharyjskiej wysokoonkogenne typy wirusa brodawczaka ludzkiego są identyfikowane jako czynnik etiologiczny ponad 20 procent wszystkich nowotworów, będąc znaczącym problemem epidemiologicznym. Dla porównania w wysokorozwiniętych krajach, takich jak Australia, Nowa Zelandia, Stany Zjednoczone Ameryki Północnej, dzięki wprowadzeniu przed wieloma laty skutecznych działań prewencyjnych, nowotwory HPV-zależne stanowią mniej niż 3 procent nowych rozpoznań³.

Kancerogeneza na podłożu przetrwałego zakażenia high-risk HPV jest czynnikiem sprawczym heterogennej grupy nowotworów, rozwijających się w okolicy anogenitalnej oraz regionie głowy i szyi. Rak szyjki macicy stanowi 83% wszystkich nowotworów HPV-zależnych. Wirusowi brodawczaka ludzkiego przypisuje się również udział w onkogenezie innych nowotworów złośliwych, do których należą rak odbytu, sromu, pochwy, penisa, jamy ustnej i języka, gardła oraz krtani.

1.1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy.

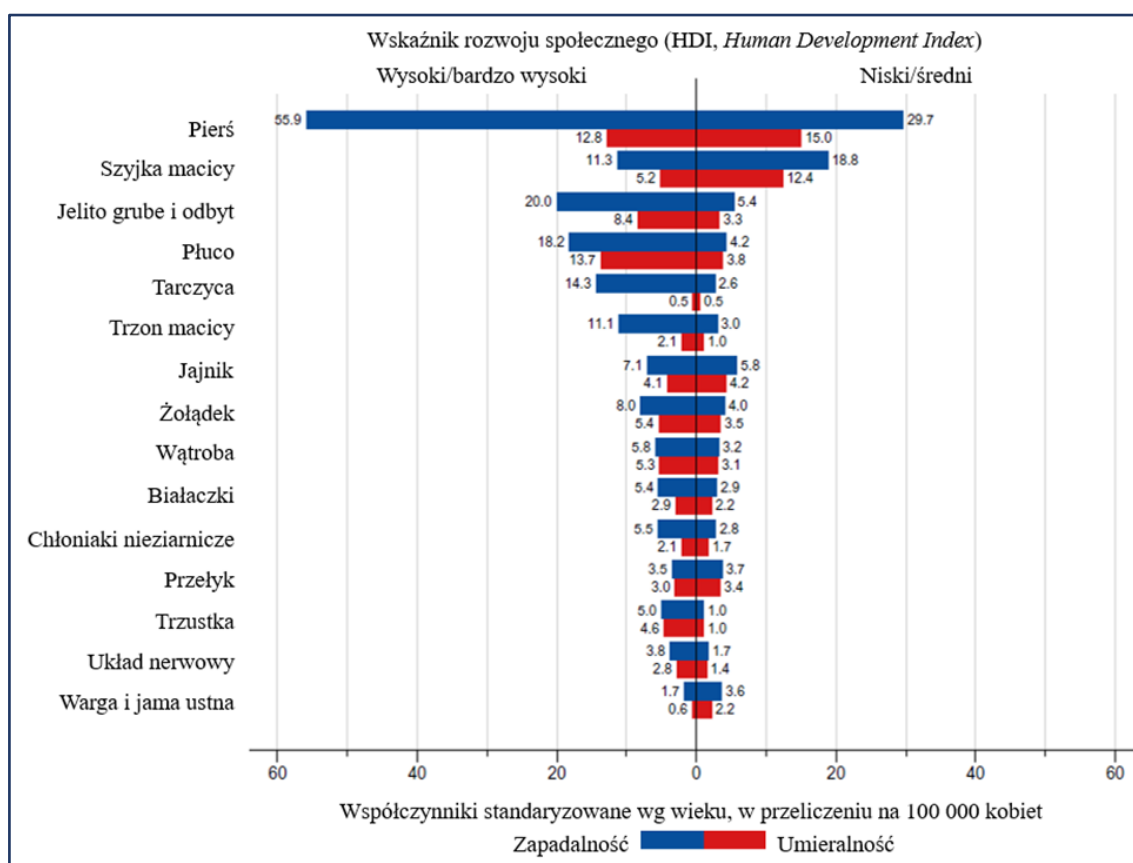
Najczęstszym nowotworem indukowanym przez onkogenne typy wirusa brodawczaka ludzkiego jest rak szyjki macicy. Stanowi on ponad 80 procent diagnoz spośród wszystkich nowotworów HPV-zależnych. Niemal wszystkie przypadki płaskonabłonkowego raka szyjki macicy mają swoje źródło w przetrwałej infekcji wysokoonkogennymi typami HPV. Wśród gruczolakoraków szyjki macicy ten udział jest mniejszy, jednak wciąż tylko 5-10% raków gruczolowych szyjki macicy nie ma związku z HPV.

W skali całego świata, rak szyjki macicy plasuje się na czwartej pozycji wśród najczęstszych onkologicznych rozpoznań i przyczyn zgonów u kobiet. W 2020 roku

odnotowano 604 127 nowych przypadków nowotworu oraz 341 831 zgony z jego powodu².

Blisko 2/3 przypadków raka szyjki macicy występuje w krajach słabo rozwiniętych. Światowe rozbieżności we współczynnikach zapadalności i umieralności z powodu raka szyjki macicy są dobrym wskaźnikiem jakości opieki zdrowotnej i profilaktyki onkologicznej. Korelują one z poziomem życia i rozwoju gospodarczego, jak również z panującymi nierównościami społecznymi.

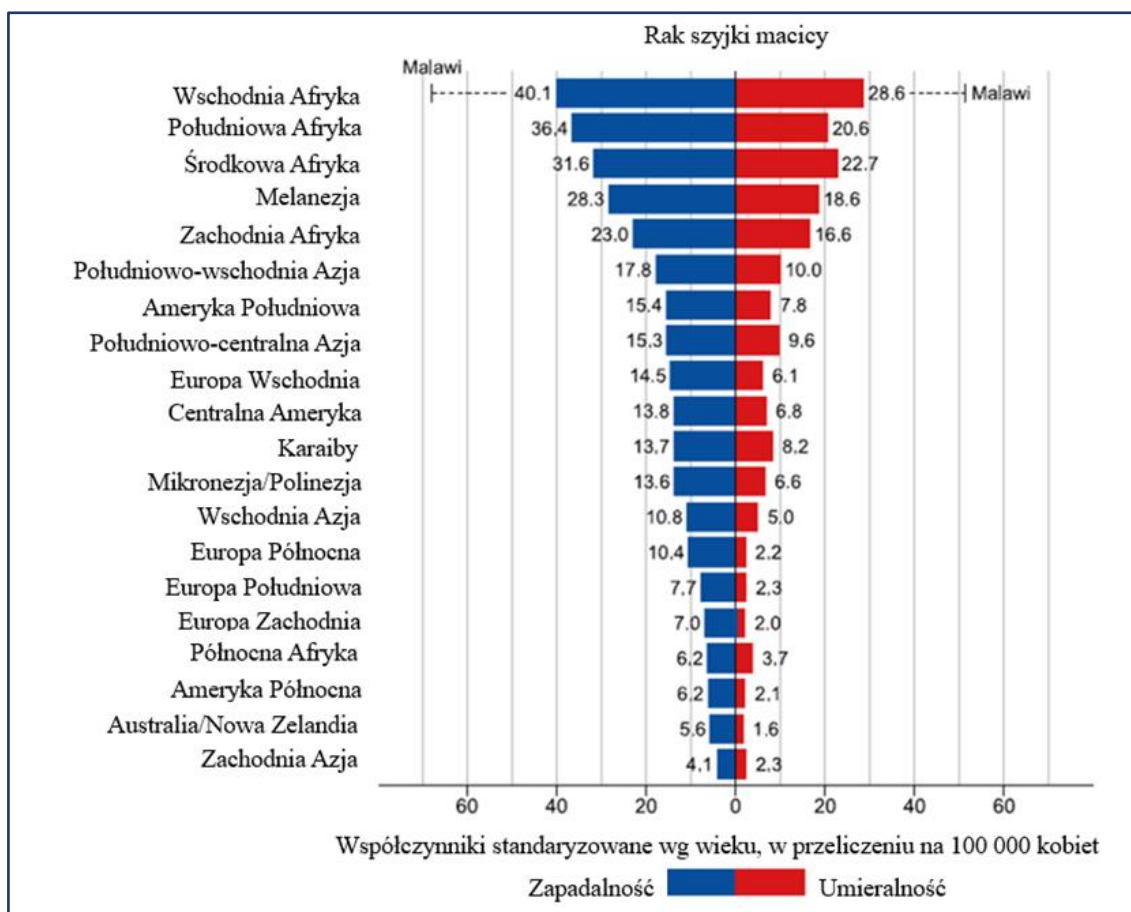
Podążając za bazą danych GLOBOCAN 2020, utworzoną dzięki działalności Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem i gromadzącą dane epidemiologiczne pochodzące ze 185 krajów, można stwierdzić, że podczas gdy dominującym rozpoznaniem onkologicznym wśród kobiet ze 159 krajów w 2020 roku był rak piersi, to wciąż istnieją rejony świata, gdzie najczęściej diagnozowanym nowotworem pozostaje rak szyjki macicy. Nowotwór ten prowadzi w statystykach wśród 23 z pozostałych 26 raportowanych krajów².



Wykres 2. Zapadalność i umieralność z powodu 15 najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet na świecie w 2020 roku z podziałem na kraje o wysokim/bardzo wysokim oraz niskim/średnim wskaźniku rozwoju społecznego (źródło danych: GLOBOCAN 2020).

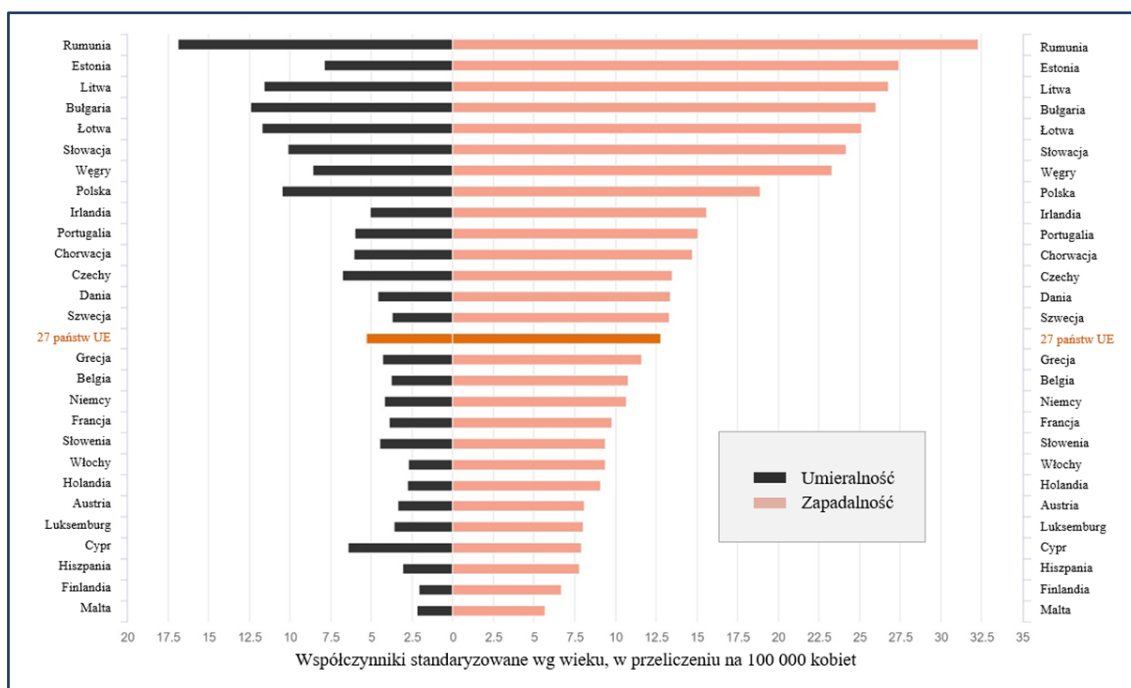
W wielu krajach Afryki i południowo-wschodniej Azji rak szyjki macicy pozostaje najczęstszą przyczyną zgonów z powodu choroby nowotworowej u kobiet. W niechlubnych statystykach przoduje położona w południowo-wschodniej Afryce Republika Malawi, która należy do grona najsłabiej rozwiniętych krajów świata. Na podstawie szacunków Międzynarodowego Funduszu Walutowego, Produkt Krajowy Brutto Malawi w 2020r. wyniósł 567,59 USD na głowę mieszkańca⁴. Wśród krajów najdotkliwiej zmagających się z problemem raka szyjki macicy są takie, w których paradoksalnie w 2020 roku obserwowano tendencje spadkowe zachorowań. Należą do nich Kolumbia, Indie, Filipiny. Równie poważne konsekwencje dla zdrowia społecznego ma rak szyjki macicy w krajach, gdzie od lat utrzymuje się stały trend wzrostowy zapadalności i umieralności na ten nowotwór. Przykładami takich krajów są Uganda, Zimbabwe oraz niektóre państwa we wschodniej Europie.

Dla kontrastu, w wysokorozwiniętych rejonach świata, takich jak Ameryka Północna, Australia i Nowa Zelandia, a także w zachodniej części Azji, gdzie leży Arabia Saudyjska i Irak, częstość zachorowań na inwazyjnego raka szyjki macicy jest od 7 do 10 razy niższa, a zgony z powodu tego nowotworu występują nawet 18 razy rzadziej w porównaniu do rejonów najbardziej dotkniętych czyli krajach Afryki Subsaharyjskiej, Wysp Melanezji, Ameryki Południowej i południowo-wschodniej Azji.



Wykres 3. Zapadalność i umieralność na raka szyjki macicy na świecie w 2020 roku z podziałem na rejony geograficzne (źródło danych: GLOBOCAN 2020).

Można zaobserwować dużą rozbieżność we wskaźnikach epidemiologicznych dla krajów zachodniej i środkowo-wschodniej Europy⁵. Korzystając z danych Komisji Europejskiej, zawartych w bazie ECIS i dotyczących dwudziestu siedmiu państw członkowskich Unii Europejskiej, standaryzowane współczynniki zapadalności i umieralności na raka szyjki macicy w 2020 roku wyniosły odpowiednio 12,8/100 000 i 5,3/100 000 kobiet. Wśród państw należących do Unii Europejskiej, najtrudniejsza sytuacja epidemiologiczna występuje aktualnie w Rumunii, gdzie zapadalność wynosi 32,3/100 000, a umieralność 16,9/100 000. Podobnie niekorzystne trendy epidemiologiczne utrzymują się w Bułgarii, na Litwie, Łotwie i Estonii. Krajami UE o najniższych współczynnikach zachorowalności są: Malta (5,7), Finlandia (6,7), Hiszpania (7,8). Najmniej zgonów z powodu raka szyjki macicy odnotowano w 2020 roku w Finlandii (2,1), na Malcie (2,2) oraz we Włoszech (2,7)⁶.



Wykres 4. Szacowana zapadalność i umieralność na raka szyjki macicy w 27 krajach Unii Europejskiej w 2020 roku (źródło danych: ECIS).

Wśród państw członkowskich Unii Europejskiej Polska znajduje się na 8. miejscu wśród krajów o największej liczbie nowo wykrytych przypadków raka szyjki macicy. W 2020 roku odnotowano 3862 nowe rozpoznania, co przekłada się na wartość wskaźnika zapadalności równą 18,9/100 000. Na uwagę zasługuje fakt, że Polska w tym zestawieniu znalazła się w niechlubnej czołówce krajów o największej liczbie zgonów z powodu raka szyjki macicy. W 2020 roku zareportowano 2137 zgonów, co plasuje Polskę na 5. pozycji wśród państw UE o najwyższej umieralności ze współczynnikiem zgonów równym 10,5/100 000. Dla porównania, według tej samej bazy ECIS, w 2013 roku w Polsce stwierdzono 1669 zgonów z powodu raka szyjki macicy, uzyskując współczynnik umieralności na poziomie 8,5/100 000⁶.

Dodatkowo według badania CONCORD-3, Polska ma jeden z najniższych w Europie odsetków 5-letnich przeżyć wynoszący 55,1% w latach 2010-2014, co jest miarą wyleczalności raka szyjki macicy⁷. Ta katastrofalna sytuacja jest wynikiem opóźnionego wykrywania i rozpoznawania nowotworu. Fakt, że większość raków szyjki macicy jest stwierdzanych w stadium nieoperacyjnym, ma bezpośredni związek z brakiem zorganizowanych programów profilaktycznych i ogólną zapaścią systemu ochrony zdrowia w Polsce.

Globalnie 5-letnie przeżycia kobiet z diagnozą raka szyjki macicy, oceniane w latach 2010-2014, zamykają się w granicach 50-70%. Spośród krajów europejskich najlepsze wyniki leczenia, przekładające się na powyżej 70% 5-letnich przeżyć, osiągnęli Niemcy, Norwegowie i Szwajcarzy. Kraje, które wypadły najgorzej w tych statystykach, to Polska wraz z Łotwą, Litwą, Bułgarią, Rosją i Maltą. Wszędzie tam odsetki 5-letnich przeżyć mieszczą się w ramach 50-59%. Pozostałe 18 badanych krajów znalazło się w środku stawki z 5-letnimi przeżyciami na poziomie 60-69%⁷.

Onkogenne typy wirusa brodawczaka ludzkiego są rozpowszechnione na całym świecie. Według szacunkowych danych amerykańskiego Ośrodka ds. Zwalczenia i Profilaktyki Chorób (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*), zakażenie powodowane przez HPV to najczęstsza choroba przenoszona drogą płciową (STD, *sexually transmitted disease*)⁸. Większość infekcji wywoływanych przez HPV ma charakter incydentalny, bezobjawowy i ustępuje samoistnie szczególnie u kobiet w wieku do 35 lat.

Zapoczątkowaniu procesów kancerogenezy oraz powstawaniu i progresji zmian śród nabłonkowych, czyli stanów przedrakowych, sprzyja występowanie dodatkowych czynników ryzyka nowotworzenia. Zalicza się do nich współistniejące zakażenie HIV, *Chlamydia trachomatis*, palenie tytoniu, wielodietność oraz wieloletnie stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych. Stopień ryzyka rozwoju przetrwałej infekcji HPV koreluje również z niskim statusem socjoekonomicznym. Nawet w krajach z niskimi wskaźnikami zapadalności i śmiertelności z powodu raka szyjki macicy, zauważalne są duże dysproporcje między populacjami dużych miast o wysokim standardzie życia, a ludnością zasiedlającą biedniejsze przedmieścia i tereny wiejskie. W wielokulturowych i zróżnicowanych pod względem rasowym Stanach Zjednoczonych, stwierdza się wyższe odsetki rozpoznań raka szyjki macicy u Latynosów (9,3/100 000) i Afroamerykanek (8,3/100 000), względem Amerykanek rasy białej (7,4/100 000)⁹.

Nierównomierny rozkład wskaźników zachorowalności i umieralności z powodu raka szyjki macicy jest wynikiem różnic w polityce zdrowotnej oraz nierównego dostępu do opieki medycznej na świecie. Znane są skuteczne metody zapobiegania rozwojowi raka szyjki macicy poprzez prewencję pierwotną, czyli powszechny dostęp do szczepień przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego, a także profilaktykę wtórną, czyli badania przesiewowe oparte o ulepszone narzędzia skriningowe, pozwalające na wczesne wykrywanie i leczenie stanów przednowotworowych.

Wyliminowanie raka szyjki macicy jako istotnego obciążenia dla zdrowia publicznego, jest jednym z priorytetowych działań Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), co zostało zapoczątkowane 19 maja 2018 roku apelem Dyrektora Generalnego WHO Dr Tedrosa Adhanoma Ghebreyesusa^{10,11}, a następnie zaowocowało opracowaniem i opublikowaniem w 2020 roku „Globalnej strategii na rzecz przyspieszenia eliminacji raka szyjki macicy jako problemu zdrowia publicznego”¹².

1.2. Etiologia i patogeneza raka szyjki macicy.

Wśród wielu czynników ryzyka nowotworzenia identyfikowanych w środowisku, istotną rolę pełnią karcynogeny biologiczne pod postacią bakterii i wirusów. Do najbardziej znaczących czynników infekcyjnych, które mogą indukować lub wspomagać kancerogenezę w organizmie człowieka należą: *Helicobacter pylori* (36,3%), wirus brodawczaka ludzkiego - HPV (31,1%), wirus zapalenia wątroby typu B - HBV (16,3%) oraz wirus zapalenia wątroby typu C - HCV (7,1%), a także inne o mniejszym wpływie, odpowiedzialne łącznie za prawie 10% przypadków nowotworów wywoływanych czynnikami infekcyjnymi, jak wirus Epstein-Barr (EBV), herpeswirus człowieka typu 8 (HHV-8), nazywany również herpeswirusem związanym z mięsakiem Kaposiego (KSHV), wirus T-limfotropowy typu 1 (HTLV-1) oraz pasożyty *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* i *Schistosoma haematobium*^{13,14}.

1.2.1. Wirus brodawczaka ludzkiego jako czynnik etiologiczny raków szyjki macicy.

Powszechnie wiadomo, że czynnikiem etiologicznym niemal wszystkich przypadków raka szyjki macicy jest wirus brodawczaka ludzkiego (HPV)^{15,16}. Odkrycie to ma swoje korzenie w latach 70-tych XX wieku, kiedy zespół pod kierownictwem niemieckiego wirusologa Haralda zur Hausena rozpoczął badania nad związkiem zakażeń HPV z występowaniem raka szyjki macicy^{17,18}. Przełomowe dokonania profesora Haralda zur Hausena umożliwiły kolejnym pokoleniom badaczy opracować testy do identyfikacji DNA HPV oraz stworzyć szczepionki efektywnie zmniejszające ryzyko rozwoju przetrwałego zakażenia HPV i tym samym zachorowania na raka szyjki macicy. Profesor Harald zur Hausen za swój dorobek naukowy został uhonorowany w 2008 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Według danych literaturowych, HPV implikuje około 99,7% przypadków raków płaskonabłonkowych szyjki macicy. W przypadku gruczolakoraków korelacja jest mniejsza i zależy od wieku pacjentek – wśród kobiet poniżej 40 roku życia HPV odpowiada za około 89% raków gruczolowych szyjki macicy, podczas gdy u kobiet po 60 roku życia udział HPV obserwuje się jedynie w 43% gruczolakoraków¹⁹.

W najświeższym raporcie Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem, dotyczącym środowiskowych czynników rakotwórczych dla człowieka, zatytułowanym

„The IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans”, za czynniki o dobrze udokumentowanym wpływie onkogennym u ludzi uznano 12 typów HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59. Kolejne typy HPV są uznawane za potencjalnie kancerogenne dla człowieka: 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82²⁰. W wielośrodkowych analizach najczęściej w komórkach raków szyjki macicy identyfikowano HPV16 (53%), HPV18 (15%), HPV45 (9%), HPV31 (6%) i HPV33 (3%). Łącznie dwa najczęstsze podtypy HPV16 i HPV18 wykrywane są w prawie 70 procentach wszystkich przypadków raka szyjki macicy na świecie¹⁵.

Wirus brodawczaka ludzkiego to ponad 200 zidentyfikowanych i opisanych typów wirusów z rodziny *Papillomaviridae*. Wykazują one tropizm do nabłonka wielowarstwowego płaskiego w obrębie skóry i błon śluzowych narządów płciowych, odbytu, jamy ustnej, gardła i krtani. Transmisja wirusa następuje głównie drogą kontaktów seksualnych waginalnych, oralnych i analnych. Możliwe jest zarażenie przez kontakt skóra-do-skóry, przez zainfekowane przedmioty, a także transmisja wertykalna. Do zakażenia płodu od matki może dochodzić przełożyskowo, drogą wstępującą z pochwy lub w trakcie porodu podczas przejścia przez kanał rodny. Następstwem takiego zakażenia jest objawiająca się w wieku dziecięcym młodzieńcza nawrotowa brodawczakowatość krtani²¹.

Szacunkowo około 80% ludności świata, zarówno kobiet jak i mężczyzn, w ciągu życia zostanie incydentalnie lub przetrwale zakażonych HPV z grupy niskiego lub wysokiego ryzyka. Wirusy o niskim potencjale onkogennym, takie jak HPV6 i HPV11, powodują brodawki płciowe w okolicy anogenitalnej, kłykciny kończyste lub kłykciny płaskie. U osób aktywnych seksualnie zakażenie HPV stanowi najczęstszą infekcję przenoszoną drogą. Zazwyczaj do zakażenia dochodzi w krótkim odstępie czasu po inicjacji seksualnej, stąd najliczniej występuje ono u osób młodych do 35 roku życia. Drugi pik zakażeń obserwowany jest po osiągnięciu wieku okołomenopauzalnego.

U większości kobiet zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego przyjmuje postać utajoną, nie powodując żadnych objawów klinicznych. Dzięki sprawnym mechanizmom układu odpornościowego, głównie odpowiedzi komórkowej, zwykle dochodzi do całkowitej eliminacji wirusa z ustroju w ciągu 12-24 miesięcy od zakażenia. W przypadku przetrwałej infekcji wysokoonkogennymi typami HPV, dochodzi do inkorporacji wirusowego DNA z genomem gospodarza, co zapoczątkowuje w komórkach proces kancerogenezy, skutkującej rozwojem śród nabłonkowej neoplazji, a w dalszej konsekwencji prowadzi do inwazyjnego raka szyjki macicy.

Narażenie na incydentalną infekcję HPV wśród osób aktywnych seksualnie jest powszechne i trudne do uniknięcia, ponieważ nawet stosunek zabezpieczony prezerwatywą nie chroni przed kontaktem z wirusem bytującym na sromie i kroczu, mosznie czy w okolicy odbytu¹⁹. Znane są jednak czynniki istotnie zwiększające ryzyko zakażenia HPV: promiskuityzm, duża liczba partnerów seksualnych, współżycie z osobą, która w przeszłości utrzymywała kontakty seksualne z wieloma partnerami, wczesny wiek inicjacji seksualnej, dodatni wywiad w kierunku przebytych innych chorób przenoszonych drogą płciową, obecności brodawek płciowych oraz historii leczenia stanów przednowotworowych lub nowotworów HPV-zależnych.

Wyszczególniono również potencjalne kofaktory, które promują przejście przygodnej infekcji HPV w postać przetrwałą oraz zwiększają ryzyko progresji zmian śródnabłonkowych do raka szyjki macicy. Należą do nich: deficyty odporności, na przykład w przebiegu zakażenia ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV), leczenie immunosupresyjne po przeszczepach narządów, ko-infekcje innymi patogenami przenoszonymi drogą płciową, w tym HSV-2 i *Chlamydia trachomatis* oraz bakteryjna waginoza, a także palenie tytoniu, długotrwałe ponad 5-letnie stosowanie doustnej dwuskładnikowej antykoncepcji hormonalnej, wielorództwo, niski status socjoekonomiczny, niedobory żywieniowe w tym dieta uboga w antyoksydanty¹.

1.2.2. Molekularne i komórkowe procesy zaangażowane w karcynogenezę na podłożu infekcji HPV.

HPV jest niewielkim wirusem o średnicy około 55nm. Materiał genetyczny wirusa ma formę kolistej dwuniciowej cząsteczki DNA wielkości około 8000 par zasad. W skład genomu wchodzi: region niekodujący, regulatorowy (LCR, *Long Control Region*), a także fragmenty kodujące, tak zwane „geny wczesne” (E, *Early*), stanowiące ponad 50% genomu, związane z replikacją i transformacją nowotworową oraz „geny późne” (L, *Late*), zajmujące około 40% genomu i kodujące ikozahedralny kapsyd wirusowy^{19,22,23}.

Wrotami dla zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego są mikrourazy nabłonka, powodujące odsłonięcie jego warstw przypodstawnych bogatych w integryny, będące prawdopodobnymi receptorami wiążącymi cząstki wirusa. Białka kapsydowe L1 i L2 uczestniczą w dalszej penetracji wirusa do jądra komórkowego.

W patogenezie śródnabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy największe znaczenie mają produkty „genów wczesnych” czyli białka E1, E2, E4, E5, E6 i E7. Spośród wymienionych, kluczową rolę przypisuje się onkogennym białkom wirusowym E6 i E7, z uwagi na ich wpływ na deregulację prawidłowego cyklu komórkowego²⁴.

Cykl życiowy każdej komórki organizmu eukariotycznego składa się ze ściśle wytyczonych procesów prowadzących do podziału komórkowego. Można wyodrębnić 4 stadia tworzące pełny cykl komórkowy: faza G₁, faza S i faza G₂, zwane łącznie interfazą, oraz faza M, na którą składają się kariokineza i cytokineza. Komórka w stanie spoczynku, czyli nie podlegająca podziałom, znajduje się w fazie G₀. Na regulację cyklu komórkowego, zachodzącą w szczególności w fazie G₁, składa się wiele elementów, w tym wykrywanie i naprawa uszkodzeń materiału genetycznego oraz mechanizmy nadzoru, zapobiegające niekontrolowanej proliferacji. Jeśli procesy regulujące prawidłowy cykl komórkowy zawodzą, powstaje komórka nowotworowa, którą charakteryzuje zdolność do niepohamowanych podziałów oraz kumulowanie błędów genetycznych.

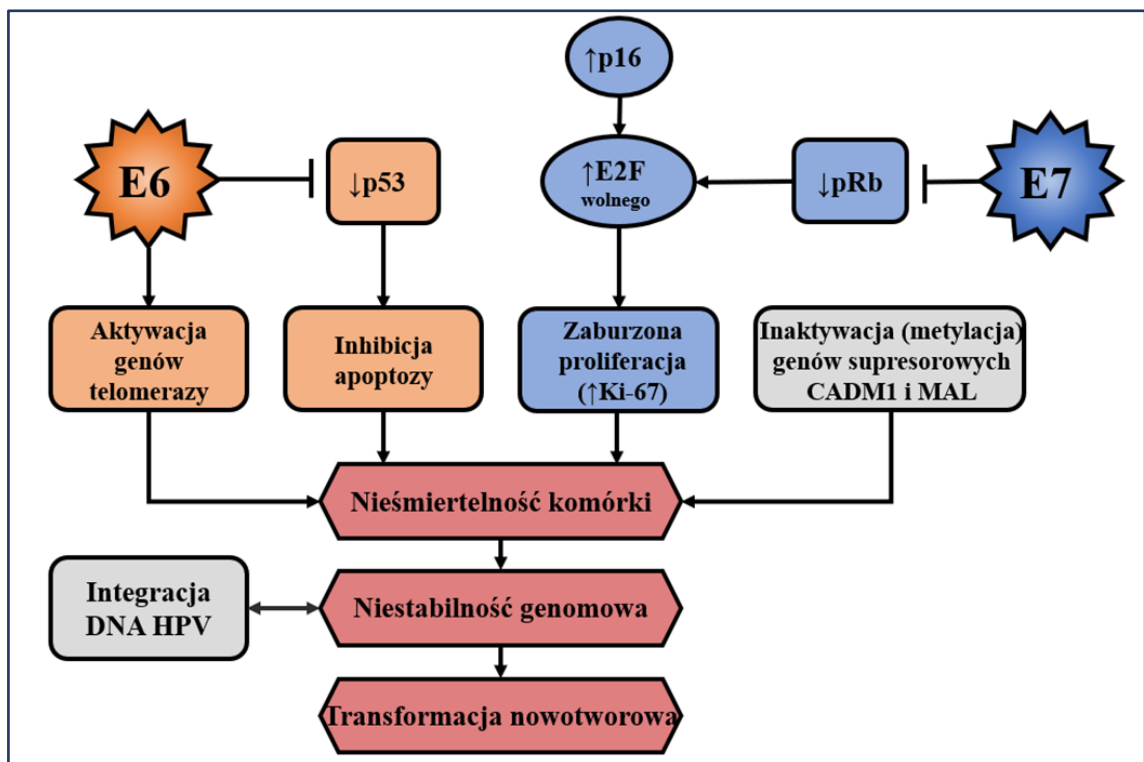
TP53 i *RB1* są istotnymi ludzkimi genami supresorowymi, których produkty białkowe p53 i pRB wpływają na cykl komórkowy i apoptozę.

Podstawową rolą białka supresorowego p53 jest aktywacja mechanizmów naprawy DNA, a w sytuacji zaistnienia zbyt poważnych uszkodzeń, wprowadzenie komórki na drogę apoptozy czyli programowanej śmierci komórki²⁵. Udowodniono, że

białko E6 wirusa HPV typu wysokoonkogennego ma zdolność degradacji białek p53. Dzieje się to na skutek niszczenia w komórkowych proteasomach kompleksów utworzonych z białka E6 i enzymu ligazy ubikwitynowej (E6-AP) wraz z przyłączonym do nich białkiem p53. W efekcie unieczynnienia białka p53, następuje zahamowanie procesów apoptozy, pomimo kumulowania się patogennych zmian w materiale genetycznym. Wirusowe białko E6 jest ponadto zdolne do aktywacji genów kodujących enzym telomerazę, odpowiedzialną za odbudowę telomerów skracających się wraz z każdym podziałem komórkowym. W wyniku tego procesu powstałe komórki nowotworowe nie „starzeją się”²².

W prawidłowych warunkach białko supresorowe pRB ma za zadanie zapobiegać powielaniu błędnych genów przez hamowanie przejścia komórki z uszkodzonym DNA z fazy G₁ do fazy S. W komórce zatrzymanej w fazie G₁, nieufosforylowane białko pRB występuje w kompleksach z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, powodując jego inhibicję²⁵. W wyniku zakażenia wysokoonkogennym wirusem HPV, onkoproteina E7 po połączeniu z pRB, powoduje jego unieczynnienie, a tym samym zwiększa liczbę wolnych czynników E2F. Wywołuje to stałą, niekontrolowaną nadekspresję białek uczestniczących w procesach replikacji DNA. Miarą deregulacji cyklu komórkowego pod wpływem wirusowego białka E7, są równocześnie zwiększona produkcja białka supresorowego p16 oraz nadekspresja Ki-67, będącego markerem zaburzonej proliferacji²².

Wyżej opisane mechanizmy, w połączeniu z inaktywacją genów supresorowych CADM1 i MAL w procesie metylacji, doprowadzają do uzyskania przez powstałą komórkę nowotworową jej zasadniczej właściwości, jaką jest nieśmiertelność. Powstała niestabilność genomowa nie może być równoważona przez zaburzone mechanizmy naprawy DNA. Dotychczas nie ma konsensusu, czy integracja DNA HPV z genomem gospodarza jest raczej inicjatorem, czy efektem niestabilności genomowej. Niemniej fuzja materiału genetycznego wirusa z jądrowym dsDNA komórki nabłonka jest momentem krytycznym HPV-zależnego nowotworzenia, prowadzącego do wysokiego stopnia śródnabłonkowej neoplazji (HSIL, *high-grade squamous intraepithelial lesion*) i w ostateczności rozwoju inwazyjnego raka szyjki macicy¹.

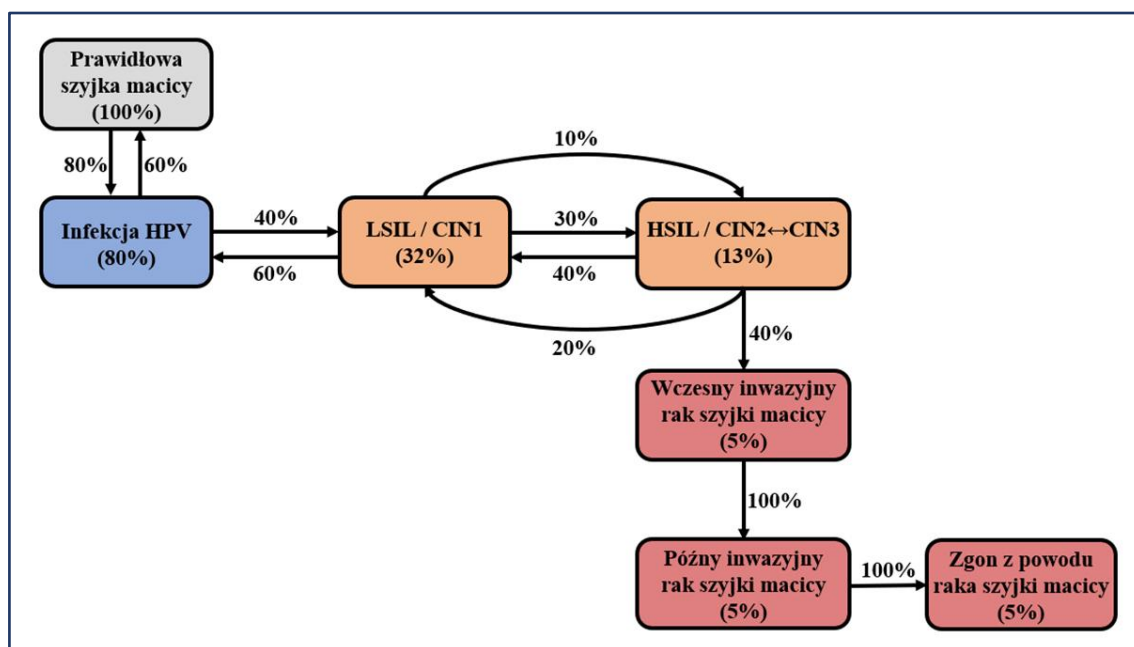


Rycina 1. Molekularne i komórkowe procesy zaangażowane w kancerogenezę na podłożu infekcji wysokoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego - opis w tekście (utworzono na podstawie: World Cancer Report, IARC, 2020).

1.2.3. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy jako prekursor raka szyjki macicy.

Rzeczywistym stanem przedrakowym szyjki macicy jest śródnabłonkowa neoplazja średniego lub dużego stopnia (CIN2/CIN3), równoznaczna z wysokiego stopnia zmianami śródnabłonkowymi w komórkach nabłonka płaskiego (HSIL).

Historia naturalna raka szyjki macicy to powolny i długotrwały proces. Szacuje się, że od momentu zainfekowania komórek nabłonka szyjki macicy przez onkogenne HPV, do rozwoju inwazyjnego raka szyjki macicy, może upłynąć nawet 15 lat²⁶. Taki scenariusz dotyczy oczywiście kobiet nieobjętych działaniami profilaktycznymi i pozbawionych adekwatnego leczenia na etapie zmian przednowotworowych.



Rycina 2. Historia naturalna raka szyjki macicy. Procenty odzwierciedlają dane szacunkowe dotyczące konsekwencji zakażenia HPV w ciągu życia kobiety, w przypadku braku działań profilaktycznych czyli szczepień ochronnych i badań przesiewowych oraz wczesnego leczenia zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy (utworzono na podstawie: P. Sasieni, Cancer Research, Wielka Brytania).

Tylko niewielki odsetek incydentalnych infekcji wysokoonkogennymi typami wirusa HPV przechodzi w zakażenie przetrwałe, zdolne do powodowania zmian śródnabłonkowych (CIN/SIL). Dopóki nie dojdzie do przekroczenia błony podstawnej i inwazji podścieliska, co jest równoznaczne z powstaniem inwazyjnego raka szyjki macicy, na każdym etapie zmiany śródnabłonkowe szyjki macicy mogą ulegać zarówno

progresji do wyższych stopni zaawansowania, jak i samoistnej regresji, a nawet całkowitemu samowyleczeniu. Szanse na spontaniczną regresję zmian śródnabłonkowych oraz eliminację wirusa HPV są wyższe u młodych kobiet, szczególnie przed 35 rokiem życia. Znane są różne czynniki mogące przyczyniać się do akceleracji procesu powstawania HSIL i raka szyjki macicy. Należą do nich: upośledzenie odporności, współistniejące stany zapalne i zaburzenie mikrobiomu pochwy, palenie papierosów, wieloletnie stosowanie estrogenowo-gestagenowych tabletek antykoncepcyjnych oraz przebycie powyżej 4 porodów drogami natury^{27,28,29}.

Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (CIN) to nazwa wprowadzona dla opisu nieprawidłowości histopatologicznych stwierdzanych w materiale tkankowym pochodzącym z biopsji. Zastąpiła ona wcześniej używane pojęcie „dysplazji”. W zmianach typu śródnabłonkowej neoplazji (CIN) obserwuje się zaburzoną warstwowość nabłonka oraz obecność komórek o odmiennej morfologii. Na atypię komórkową składają się: duże, wielokształtne jądra komórkowe, zaburzony stosunek jądrocytoplazmatyczny, nadbarwliwość chromatyny, polimorfizm jądrocytoplazmatyczny, obecność licznych mitoz, a w zmianach dużego stopnia CIN3/HSIL często również atypowe figury podziału³⁰.

Dawna klasyfikacja wyodrębniała trzy stopnie zaawansowania zmian śródnabłonkowych, CIN1, CIN2 i CIN3, oznaczające kolejno neoplazję małego, średniego i dużego stopnia. Jako kryterium podziału ustanowiono grubość nabłonka wielowarstwowego płaskiego zajętego przez zmianę śródnabłonkową, licząc od błony podstawnej. Dla CIN1/LSIL nieprawidłowe komórki stwierdza się w 1/3 dolnej grubości nabłonka. Dla CIN2/HSIL zmiany występują w 2/3 dolnych części grubości nabłonka. Natomiast dla CIN3/HSIL śródnabłonkowa neoplazja obejmuje całą grubość nabłonka wielowarstwowego płaskiego³¹.

W 2014 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaproponowała zmodyfikowaną nomenklaturę dla zmian prekursorowych raka szyjki macicy. Wprowadzono podział dwustopniowy na LSIL i HSIL. Akronim LSIL (ang. *low-grade squamous intraepithelial lesion*), w tłumaczeniu oznacza niskiego stopnia zmiany w komórkach nabłonka płaskiego. Do tej grupy należą koilocyty czyli atypowe komórki, których obecność jest najczęściej pochodną infekcji HPV, CIN1 oraz łagodne brodawczaki. Wysokiego stopnia zmiany w komórkach nabłonka płaskiego, czyli HSIL

(ang. *high-grade squamous intraepithelial lesion*), to rzeczywiste stany przedrakowe: CIN2, CIN3 oraz CIS.

Powyższe nazewnictwo histopatologiczne lepiej koresponduje z rozpoznaniem cytologicznym według Systemu Bethesda (TBS). Powszechne wprowadzenie nomenklatury LSIL i HSIL jest ponadto zgodne z rekomendacjami Projektu LAST (ang. *The Lower Anogenital Squamous Terminology*), utworzonego przy współpracy Kolegium Amerykańskich Patologów (CAP, *College of American Pathologists*) i Amerykańskiego Towarzystwa Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (ASCCP, *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*)³².

Tabela 1. Porównanie zmian w nazewnictwie stanów przednowotworowych raka szyjki macicy (według WHO).

Klasyfikacja WHO 1975/1994	Klasyfikacja WHO 2003	Klasyfikacja WHO 2014
Łagodna dysplazja	CIN1	LSIL
Umiarkowana dysplazja	CIN2	HSIL
Ciężka dysplazja	CIN3	
Rak in situ		

Nowy podział ma dużą użyteczność kliniczną, ponieważ doskonale różnicuje niegroźne z onkologicznego punktu widzenia zmiany o charakterze LSIL, będące wynikiem zakażenia wirusowego i podlegające wyłącznie obserwacji w oczekiwaniu na samoistną regresję, od rzeczywistego stanu przednowotworowego HSIL, który z kolei zawsze wymaga leczenia ekscyzyjnego.

1.3. Profilaktyka raka szyjki macicy.

Rak szyjki macicy to jeden z niewielu nowotworów złośliwych, dla których opracowano efektywne metody prewencji pierwotnej i wtórnej. Dzięki systematycznemu rozszerzaniu działań profilaktycznych na coraz większą populację Świata, realna wydaje się wizja całkowitej eliminacji raka szyjki macicy jako problemu zdrowia publicznego. Stanowi to jedną z priorytetowych inicjatyw Światowej Organizacji Zdrowia (WHO)³³.

Kamieniem milowym w zakresie profilaktyki raka szyjki macicy było wynalezienie, a następnie zarejestrowanie i wprowadzenie do użytku w 2006 roku, szczepionki przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego. Szczepienia populacyjne są dobrym przykładem profilaktyki wczesnej (I fazy), czyli działań ukierunkowanych na zapobieganie wystąpienia choroby u osób zdrowych. W ostatnich 15 latach, bezpieczne i skuteczne szczepionki dwu-, cztero- lub dziewięciowalentne³⁴, zostały zaaprobowane w ponad 80 krajach, a do roku 2017 ponad 100 milionów dorastających dziewcząt otrzymało minimum jedną dawkę szczepionki. Na uwagę zasługuje fakt, że 95% zaszczepionych nastolatek pochodziło z krajów rozwiniętych. Stopniowo dostępność szczepionki rozszerza się również na kraje rozwijające się, ale poziom wyszczepienia jest nadal niezadawalający. Według analiz, globalnie wśród dziewcząt w wieku 10-20 lat, uodpornienie jest na poziomie 32,1% w krajach wysokorozwiniętych i zaledwie 0,3% w krajach o średnim lub niskim PKB³⁵. Do 2020 roku mniej niż 25% państw o niskich i 30% państw o średnich dochodach włączyło szczepienia przeciwko HPV do Narodowych Programów Szczepień. Jednocześnie uczyniło to ponad 85% krajów wysokorozwiniętych. Coraz więcej państw wprowadza populacyjne szczepienia obejmujące już nie tylko dziewczynki, ale również chłopców w wieku przed inicjacją seksualną, dzięki czemu istotnie ogranicza się ryzyko transmisji HPV.

W ramach „Globalnej strategii na rzecz przyspieszenia eliminacji raka szyjki macicy jako problemu zdrowia publicznego”, w WHO postawiono sobie za cel, aby do 2030 roku we wszystkich krajach osiągnąć wyszczepialność przeciwko HPV rzędu 90% populacji dziewcząt do 15 roku życia¹². Istnieje jednak wiele potencjalnych ograniczeń, które w wielu rejonach świata nie pozwolą osiągnąć zaplanowanego celu, w tym brak akceptacji metody, wysoki koszt, niewystarczająca infrastruktura oraz działalność ruchów antyszczepionkowych.

Długoterminowy wpływ szczepień populacyjnych na ograniczenie zachorowalności i umieralności z powodu raka szyjki macicy jest niezaprzeczalny i

należy szeroko propagować ideę szczepień. Niemniej potrzeba wielu lat, żeby zobaczyć pełen efekt tak prowadzonej profilaktyki pierwszorzędowej. Dlatego niezmiernie ważnym dla zdrowia publicznego jest utrzymywanie wysokiej jakości programów skriningowych, aby uchronić przed zachorowaniem na inwazyjnego raka szyjki macicy wciąż przeważającą populację kobiet niezaszczepionych.

Profilaktyka późna (II fazy) to działania mające na celu możliwie wczesne wykrycie choroby w stadium przedklinicznym i jej skuteczne leczenie. Tutaj też sformułowano konkretne cele w ramach „Globalnej strategii na rzecz przyspieszenia eliminacji raka szyjki macicy jako problemu zdrowia publicznego” WHO. Założono konieczność wprowadzenia do 2030 roku powszechnych badań przesiewowych, przy użyciu testu DNA HPV lub innego o porównywalnej dokładności, u nie mniej niż 70% populacji kobiet w 35 roku życia oraz ponownie w wieku 45 lat. Kolejnym celem jest uzyskanie poprawy dostępu do świadczeń opieki zdrowotnej tak, aby 90% kobiet z rozpoznany stanem przednowotworowym zostało poddanych skutecznemu leczeniu niezwłocznie po uzyskaniu diagnozy¹².

1.4. Wczesne wykrywanie stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy – narzędzia diagnostyczne.

Kluczowym dla powodzenia profilaktyki wtórnej raka szyjki macicy jest stałe doskonalenie narzędzi diagnostycznych i opracowywanie efektywnych modeli skринingu.

Już w latach 60-tych ubiegłego stulecia ogłoszono pryncypia dla badań przesiewowych. Powinny być one ukierunkowane na choroby stanowiące istotny problem dla zdrowia publicznego. Dla takich chorób znane są wczesne, bezobjawowe stadia przedkliniczne, które wykrywa się przy użyciu powszechnych, prostych i tanich metod, akceptowalnych zarówno dla przedmiotu badań, jak i samego badacza. Istnieją uznane standardy leczenia takich chorób, a im wcześniej zostanie wdrożona terapia, tym większa skuteczność i niższy koszt leczenia, co uzasadnia ekonomicznie prowadzenie populacyjnych badań przesiewowych³⁶.

Miarą efektywności testu skринingowego jest dokładność (ang. *accuracy*), którą definiuje się na podstawie kilku parametrów. Czułość (ang. *sensitivity*), oznacza zdolność testu diagnostycznego do poprawnego rozpoznania choroby, tam gdzie ona rzeczywiście występuje. Swoistość (ang. *specificity*), to umiejętność prawidłowego wykluczenia choroby u osoby zdrowej. Dodatnią wartość predykcijną (PPV, ang. *positive predictive value*), oblicza się, jako stosunek prawdziwie chorych do wszystkich osób, które w teście diagnostycznym uzyskały wynik pozytywny. Ujemna wartość predykcyjna (NPV, ang. *negative predictive value*), to proporcja osób rzeczywiście zdrowych do wszystkich z negatywnym wynikiem badania przesiewowego. Wymagania, jakie stawia się przed idealnym testem skринingowym, to czułość i swoistość bliskie 100% oraz wysokie wartości PPV i NPV³⁷.

1.4.1. Rozwój cytodiagnostyki – od metody konwencjonalnej do cytologii cienkowarstwowej na podłożu płynnym.

Początek cytodiagnostyki ginekologicznej datuje się na drugą dekadę XX wieku, kiedy George N. Papanicolaou zaobserwował związane z cyklem menstruacyjnym różnice morfologiczne w komórkach złuszczonego się nabłonka pochwy i szyjki macicy. W 1928 roku na Konferencji w Battle Creek w Michigan po raz pierwszy ogłosił publicznie, że w wymazach cytologicznych można poszukiwać komórek nowotworowych³⁸. Niestety jego wystąpienie nie spotkało się z entuzjastycznym przyjęciem. Papanicolaou kontynuował swoje badania, co w 1941 roku zaowocowało opublikowaniem, wraz z Herbertem F. Trautem, przełomowej pracy w *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, zatytułowanej „The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus”. W kolejnym roku powstała monografia „Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear”³⁸. Odkrycia doktora Papanicolaou stały się podwalinami dla wprowadzenia w latach 50-tych XX wieku w Kanadzie i Stanach Zjednoczonych badań przesiewowych. Najwcześniejsze doniesienia pochodzą z 1949 roku z Kolumbii Brytyjskiej w Kanadzie³⁹. W USA pierwszy program finansowany ze środków publicznych wprowadzono w 1952 roku w hrabstwie Shelby w stanie Tennessee, gdzie w wyniku trzyletnich prac skринingiem objęto 108 000 kobiet, wykrywając 773 przypadki raka⁴⁰. Na przestrzeni lat badania przesiewowe upowszechniono na całym świecie, co uchroniło wiele milionów kobiet przed zachorowaniem i śmiercią z powodu raka szyjki macicy.

Z czasem udoskonalono cytodiagnostykę, między innymi modyfikując technikę pobierania wymazu cytologicznego. Skonstruowano dedykowane narzędzia, takie jak szpatułki Ayre i Aylesbury, które następnie zastąpiła używana do dziś szczoteczka Cyto-Brush. Preferowaną metodą przygotowania preparatu do dalszej oceny mikroskopowej, było jego naniesienie na szkiełko podstawowe czyli rozmaz cytologiczny i utrwalenie w wodnym roztworze etanolu lub za pomocą gotowego utrwalacza w aerozolu, a następnie barwienie sposobem Papanicolaou. Metoda ta obecnie nazywana jest cytologią konwencjonalną.

Historycznie wyniki badań cytologicznych wymazów z szyjki macicy przedstawiano za pomocą pięciostopniowej skali Papanicolaou, która ostatecznie została wyparta przez wprowadzony w 1988 roku nowy system klasyfikacji obrazów cytologicznych wg Bethesda (TBS, ang. *The Bethesda System*)⁴¹.

Do nieprawidłowych rozpoznań cytologicznych według klasyfikacji Bethesda (w modyfikacji z 2001 roku)⁴² należą:

- ASC-US (ang. *atypical squamous cells of undetermined significance*) – atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu,
- LSIL (ang. *low-grade squamous intraepithelial lesion*) – zmiany śródnabłonkowe niskiego stopnia, w tym: zmiany wywoływane zakażeniem HPV, łagodna dysplazja, śródnabłonkowa neoplazja małego stopnia (CIN1),
- ASC-H (ang. *atypical squamous cells, cannot exclude HSIL*) - atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego, nie można wykluczyć HSIL,
- HSIL (ang. *high-grade squamous intraepithelial lesion*) – zmiany śródnabłonkowe wysokiego stopnia, na które składają się: umiarkowana i ciężka dysplazja, śródnabłonkowa neoplazja średniego/dużego stopnia (CIN2/CIN3) oraz carcinoma in situ (CIS),
- AGC (ang. *atypical glandular cells*) – atypowe komórki gruczołowe oraz AIS (ang. *adenocarcinoma in situ*) – gruczolakorak in situ
- Rak płaskonabłonkowy oraz rak gruczołowy szyjki macicy.

Wyniki prawidłowe wymazów cytologicznych w nomenklaturze TBS są oznaczane akronimem NILM (ang. *negative for intraepithelial lesion or malignancy*).

Na chwilę obecną badanie cytologiczne jest podstawowym narzędziem w wykrywaniu stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy w Polsce w ramach Programu Profilaktycznego Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ), jak również w skryningu oportunistycznym to znaczy usługach świadczonych prywatnie w gabinetach lekarskich. Badania cytologiczne finansowane ze środków publicznych są dedykowane kobietom między 25 a 59 rokiem życia, w interwałach co 3 lata lub względnie w grupach ryzyka co 12 miesięcy.

Czułość cytodiagnostyki w identyfikacji rzeczywistych stanów przednowotworowych szyjki macicy (CIN2+/HSIL) nie jest zadawalająca. Średnio nie przekracza 50%, ale w różnych badaniach może przyjmować wartości z szerokiego zakresu 30 – 87%. Największym ograniczeniem cytologii jest wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych sięgający 14 – 33%, co w 2/3 przypadków jest spowodowane

nieprawidłowym pozyskaniem lub utwaleniem materiału⁴³. Ocena rozmazów, nawet przez doświadczonych cytotechników, jest mocno subiektywna, przez co dodatkowo obciążona błędem ludzkim.

Znaczącym skokiem technologicznym w cytodiagnostyce było opracowanie w latach 90-tych XX wieku specjalistycznych podłoży płynnych, spośród których ThinPrep oraz SurePath zyskały aprobatę amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA). Umożliwiło to wprowadzenie do diagnostyki raka szyjki macicy nowego narzędzia, nazywanego cytologią cienkowarstwową na podłożu płynnym (LBC, ang. *Liquid-based Cytology*). Niewątpliwą zaletą LBC jest poprawa jakości uzyskiwanych obrazów. Jest to wynikiem braku efektu nakładania się warstw komórek, wyeliminowania tła złożonego z komórek zapalnych, erytrocytów i zanieczyszczeń oraz ograniczenia błędów spowodowanych nieprawidłowym utwaleniem materiału.

W pierwszych badaniach porównawczych potwierdzono istotną przewagę LBC nad cytologią konwencjonalną w wykrywaniu zmian śródnabłonkowych. Poprawa wykrywalności w przypadku użycia ThinPrep wyniosła 65% dla zmian typu LSIL lub wyższych ($p < 0,001$), a przy użyciu SurePath detekcja wzrosła o 47% dla LSIL ($p = 0,0011$) i o 116% dla HSIL ($p = 0,0002$). Kolejne badania oraz metaanalizy albo potwierdziły wyższość cytologii płynnej nad tradycyjną, albo nie wykazały istotnych statystycznie różnic^{40,44}.

Zaletą technologii LBC jest uzyskiwanie wysokiej jakości obrazów oraz możliwość ograniczenia błędów ludzkich, ponieważ uzyskane obrazy mogą być poddawane wydajnej i zobiektywizowanej ocenie automatycznej dzięki dedykowanemu oprogramowaniu. Wstępna analiza komputerowa następnie podlega weryfikacji przez doświadczonych cytotechników. Dodatkowym walorem LBC jest to, że z zabezpieczonego materiału można później wykonywać dodatkowe oznaczenia przykładowo badania molekularne. Na niekorzyść cytologii cienkowarstwowej na podłożu płynnym przemawia wyłącznie wyższy koszt względem metody konwencjonalnej.

1.4.2. Badania molekularne wykrywające wirusowe DNA lub mRNA.

W drugiej połowie dwudziestego wieku wymaz cytologiczny stanowił podstawową metodę wykrywania patologii szyjki macicy, a w wielu krajach stał się jednym z fundamentów dbania o zdrowie kobiet w ramach profilaktyki wtórnej.

Po latach zaczęto dostrzegać ograniczenia cytodiagnostyki i poszukiwać alternatywnych rozwiązań. Było to możliwe, dzięki zrozumieniu roli przetrwałego zakażenia wysokoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego w patogenezie raka szyjki macicy oraz rozwojowi biologii molekularnej. Stworzono nowe narzędzia diagnostyczne, opierające się na identyfikacji materiału genetycznego HPV w próbkach pobieranych z pochwy i szyjki macicy⁴⁵.

Początkowo testy DNA HPV funkcjonowały jako narzędzie weryfikujące konieczność wdrożenia pogłębionej diagnostyki kolposkopowej w przypadkach niejednoznacznych wyników cytodiagnostyki głównie ASC-US. Stopniowo rola diagnostyki molekularnej w praktyce klinicznej rosła. W rekomendacjach z 2011 roku, wydanych przy współpracy trzech amerykańskich towarzystw naukowych ACS, ASCCP i ASCP, uznano skuteczność połączenia obu metod czyli LBC i testu DNA HPV, nazwanego testem podwójnym (ang. *co-testing*), jako pierwszorazowego badania przesiewowego dla kobiet w wieku 30 – 65 lat⁴⁶. W kolejnych latach wyższość takiego połączenia była wielokrotnie poddawana w wątpliwość w meta-analizach⁴⁷. Z czasem podniesiono rangę testów molekularnych, identyfikujących DNA wirusa HPV, do samodzielnego narzędzia pierwszego wyboru w skriningu raka szyjki macicy.

Dnia 24 kwietnia 2014 roku, amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA), zatwierdziła cobas® HPV Test, jako pierwszorazowy test przesiewowy dla kobiet poczynając od 25 roku życia⁴⁸. Test ten wykrywa 14 wysokoonkogennych typów wirusa HPV. Pozwala na genotypowanie osobno HPV16 i HPV18 oraz identyfikuje obecność innych wirusów HR (ang. *high-risk*) ze zbioru 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68⁴⁹.

Uznanie skriningu pierwotnego w oparciu o test DNA HPV, było wynikiem przeprowadzonych dużych badań klinicznych. W prospektywnym badaniu ATHENA prowadzonym w Stanach Zjednoczonych od 2008 roku, w ciągu trzech lat analizie poddano niemal 42 tysiące kobiet, które ukończyły 25 rok życia. Stwierdzono wysoką czułość samodzielnego testu DNA HPV w wykrywaniu zaawansowanych zmian śród nabłonkowych szyjki macicy CIN3+ osiągającą 76%. Dla porównania, czułość samej

cytologii była na poziomie 47,8%, a dla strategii hybrydowej to znaczy cytologii w grupie 25-29 lat oraz testu podwójnego ≥ 30 lat, wyliczono czułość na poziomie około 61,7%. Test HPV wykazywał natomiast najniższą swoistość czyli 93,5%, przy swoistości 97,1% i 94,6% odpowiednio dla cytodiagnostyki i strategii hybrydowej⁵⁰. Wobec tego sformułowano wniosek, że skrining w oparciu o test DNA HPV przeznaczony dla kobiet po 25 roku życia, a w wielu programach profilaktycznych po ukończeniu 30 roku życia, wykrywa istotnie więcej rzeczywistych stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy. Ma wysoką ujemną wartość predykcijną (NPV), co pozwala wydłużyć interwały między badaniami, w rekomendacjach zwykle do 5 lat. Niestety, z powodu niskiej swoistości, test DNA HPV generuje dużą liczbę wyników fałszywie dodatnich, wymagających dalszej diagnostyki na etapie pogłębionym. Nie jest zalecaną metodą diagnostyczną u młodszych kobiet poniżej 25 roku życia, z uwagi na duży odsetek w tej grupie incydentalnych, samoograniczających się zakażeń HPV, które przeważnie ustępują w ciągu 12-24 miesięcy i nie prowadzą do rozwoju rzeczywistej patologii szyjki macicy.

Istnieją dwie główne technologie wykrywania DNA HPV, wykorzystujące albo technikę hybrydyzacji kwasów nukleinowych (Test Hybrid Capture 2, HC2), albo amplifikację genów przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), wykorzystującej startery komplementarne do fragmentów genów L1, E6 lub E7 wirusa HPV (Test Cobas 4800 System). Najczęściej obecnie stosowana metoda Real Time PCR (RT-PCR), pozwala na amplifikację DNA w czasie rzeczywistym, przy użyciu sond znakowanych fluorescencyjnie⁵¹.

Dużą zaletą testu DNA HPV jest jego łatwa aplikacja kliniczna do badań przesiewowych realizowanych na zasadzie „self-samplingu”, czyli samodzielnego pobierania materiału do badań przez pacjentkę. Umożliwia to prowadzenie skriningu w miejscach, gdzie dostęp do opieki zdrowotnej jest ograniczony z powodu braku odpowiedniej infrastruktury i kadry medycznej. Również w krajach rozwiniętych, samobadanie stanowi cenne oręż, pozwalające objąć działaniami profilaktycznymi dodatkową grupę kobiet, które z powodów kulturowych, religijnych lub osobistych przekonań, unikają wizyt w gabinetach ginekologicznych⁵². Dla przykładu, w Argentynie dzięki zastosowaniu testu DNA HPV w „self-samplingu” w ramach badań przesiewowych, zgłaszalność do programu wzrosła do 86% z uprzednio uzyskiwanych zaledwie 20% w ramach diagnostyki przy użyciu LBC w placówkach medycznych. Udowodniono, że w przypadku testu DNA HPV, dokładność metody przy samodzielnym

pobranie materiału przez pacjentkę, nie odbiega jakością od badania wykonanego przez profesjonalistę⁵³.

Identyfikacja DNA HPV nie pozwala na rozróżnienie zakażenia incydentalnego od przetrwałego, które może zapoczątkować kancerogenezę. W celu wyodrębnienia pacjentek z grupy podwyższonego ryzyka rozwoju stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy, można wykonać powtórne oznaczenie DNA HPV po 12-24 miesiącach, identyfikując te kobiety, u których nie doszło do spontanicznego wyeliminowania wirusa.

Inną dostępną metodą wykrywającą przetrwałe zakażenie HPV, jest badanie molekularne, wykrywające transkrypty mRNA wirusowych onkogenów E6/E7 (PreTect HPV-Proofer, NucliSENS EasyQ HPV, APTIMA HPV). Test mRNA HPV cechuje się dużo wyższą swoistością w wykrywaniu rzeczywistych stanów przedrakowych CIN2+, ale jest procedurą kosztowną i trudniej dostępną. Jest postrzegany jako cenne narzędzie doprecyzowujące wskazania do kolposkopii, przykładowo w sytuacji stwierdzenia mniejszych nieprawidłowości cytologicznych (ASC-US, LSIL) lub w razie prawidłowej cytologii (NILM) przy obecnym DNA HPV HR⁵⁴.

1.4.3. Nowe metody diagnostyczne – rola biomarkerów i epigenetyki.

Ze względu na niedostateczną swoistość dostępnych narzędzi diagnostycznych, rozpoczęto badania nad metodami uzupełniającymi, które pozwolą zredukować ilość uzyskiwanych wyników fałszywie dodatnich, wymagających dalszej weryfikacji kolposkopowej. Narzędzia doprecyzowujące, czyli drugiego rzutu, pozwalają zmniejszyć stres u pacjentek wywołowany przez niepotrzebne procedury medyczne oraz obniżyć całkowity koszt diagnostyki.

W szerokim ujęciu, biomarkery oznaczają wskaźniki biologiczne, których badanie pozwala na jakościową i ilościową ocenę różnych zjawisk występujących w przyrodzie. Nowoczesna medycyna wykorzystuje różne mierzalne biomarkery w tym molekularne, genetyczne lub biochemiczne, jako narzędzia pozwalające diagnozować choroby lub indywidualizować terapię⁵⁵.

W proces nowotworzenia na podłożu infekcji wysokoonkogennymi typami HPV zaangażowane są białka onkogenne pochodzenia wirusowego (głównie E5, E6 i E7). W różnych mechanizmach onkoproteiny HPV doprowadzają do niekontrolowanej proliferacji komórek, które dodatkowo pozbawione są zdolności do naprawy powstających błędów w materiale genetycznym. Mutacje kumulują się w kolejnych podziałach, a uszkodzone komórki nie podlegają apoptozie. W ostateczności doprowadza to do rozwoju inwazyjnego raka szyjki macicy.

Po zapoczątkowaniu kancerogenezy pod wpływem HPV, w komórkach gospodarza dochodzi do zaburzenia wielu procesów metabolicznych i enzymatycznych, które mogą przejawiać się nadprodukcją pewnych czynników, stosunkowo łatwych do detekcji metodami laboratoryjnymi.

W wykrywaniu stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy potwierdzono użyteczność kliniczną biomarkerów p16^{INK4a} i Ki-67.

p16^{INK4a} jest białkiem supresorowym, które odgrywa istotną rolę w mechanizmach regulacji cyklu komórkowego eukariontów. Stanowi element kontroli przejścia komórki z fazy G₁ do S⁵⁶. Działa jako inhibitor kinazy cyklinozależnej, hamując fosforylację białka retinoblastoma (pRB). Dzięki temu nieufosforylowane białko pRB może pozostawać w kompleksach z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, co hamuje postęp cyklu komórkowego, zatrzymując go w fazie G₁. W procesie różnicowania się komórek p16^{INK4a} przeciwdziała podziałom, a jego ekspresja w zróżnicowanych komórkach nabłonka jest minimalna⁵⁷.

Za sprawą onkoproteiny E7 wirusa HPV dochodzi do inaktywacji pRB i uwolnienia czynników transkrypcyjnych E2F, co powoduje stałą produkcję białek uczestniczących w replikacji DNA i promuje podziały komórkowe. Wysokoonkogenne wirusy HPV, po wbudowaniu się do genomu gospodarza, powodują intensywną produkcję białek onkogennych. Przyjmuje się, że wysoki poziom wewnątrzkomórkowego E7 potrafi znieść blokadę promotora genu CDKN2A kodującego p16^{INK4a}, co skutkuje niekontrolowaną nadekspresją p16^{INK4a}.

Podsumowując, nadprodukcja p16^{INK4a} w komórce jest mierzalnym wykładnikiem wzmożonej ekspresji onkoproteiny E7, czyli zapoczątkowania kancerogenezy w przebiegu przetrwałej infekcji wysokoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego.

Ki-67 to białko jądrowe, uczestniczące w procesach proliferacji, czyli jest obecne w komórkach intensywnie namnażających się. Może być wykrywane we wszystkich fazach postępującego cyklu komórkowego (G₁, S, G₂ i M), ale nie w stanie spoczynku (G₀)^{58,59}.

Znajomość właściwości obu białek p16^{INK4a} oraz Ki-67 pozwoliła na zaprojektowanie użytecznego testu klinicznego, polegającego na identyfikacji powyższych biomarkerów przy użyciu technik immunocytochemii (CINtec® PLUS), co będzie szczegółowo omówione w dalszym rozdziale.

Trwają badania nad kolejnymi potencjalnymi biomarkerami kancerogenezy zależnej od HPV. Przykładem jest ProEx C, składający się z topoizomerazy II (TOP2) oraz białek MCM2 (ang. *minichromosome maintenance proteins*), obu zaangażowanych w proces replikacji DNA, a ich nadekspresja koreluje z nieprawidłową indukcją fazy S cyklu komórkowego⁶⁰. Inne postulowane biomarkery są zależne od aktywności wirusowego białka E5. Pod wpływem oddziaływania E5 na receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), dochodzi do aktywacji ścieżki przekazywania sygnału Ras-Raf-MAP, co prowadzi do nasilonej proliferacji. E5 wpływa też pośrednio na upośledzenie funkcji białek supresorowych p21 i p27, będących inhibitorami cyklinozależnej kinazy (CDK) zaangażowanymi w hamowanie przejścia komórki z fazy G₁ do S. Postuluje się też wykorzystywanie jako wskaźników innych białek m.in. cyklooksygenazy typu 2 (COX-2), czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) oraz kaweoliny-1 (Cav-1)⁶¹.

W komórkach nabłonka szyjki macicy, które podlegają transformacji nowotworowej, dochodzi do wielu zmian na poziomie DNA. Są to zarówno zaburzenia genetyczne takie jak mutacje punktowe, delecje pojedynczych genów czy aberracje strukturalne chromosomów, jak i zmiany epigenetyczne czyli modyfikacje ekspresji genów bez zmian w prawidłowej sekwencji nukleotydów w DNA.

Epigenetyka jest dziedziną nauki badającą zmiany ekspresji genów, zachodzące pod wpływem różnych endogennych i egzogennych czynników. Mechanizmy epigenetyczne kierują różnicowaniem komórek. Chociaż wszystkie komórki organizmu pierwotnie posiadają jednakowy zestaw genów, to mogą przyjmować różne fenotypy. Takie stabilne wzorce ekspresji genów mogą podlegać dziedziczeniu. Inne modyfikacje umożliwiają krótkotrwałe, odwracalne zmiany ekspresji genów. Przykładem procesów epigenetycznych w organizmie człowieka są modyfikacje histonów, metylacja DNA oraz wyciszanie genów, gdzie mediatorem jest mikroRNA (miRNA)⁶².

Metylacja DNA to zjawisko enzymatycznego przyłączania grup metylowych do zasad azotowych nukleotydów. W genomie człowieka szczególnie często zachodzi w obrębie tzw. wysp CpG, gdzie grupa metylowa ulega kowalencyjnemu przyłączeniu do cytozyny, a reakcję katalizuje metylotransferaza DNA (DNMT). Nasilona metylacja w obszarze wysp CpG, które poprzedzają fragmenty kodujące genomu, skutkuje zahamowaniem ekspresji znajdujących się tam genów.

Nieprawidłowe wzorce metylacji DNA są stałym przedmiotem badań w kontekście kancerogenezy na podłożu przetrwałej infekcji wysokoonkogennymi wirusami HPV. Wykrywanie za pomocą technik molekularnych w komórkach nabłonka szyjki macicy, hipermetylacji regionów promotorowych różnych genów m.in. miR124-2, CADM1, MAL, PAX1, FAM19A4, może być wkrótce użytecznym narzędziem klinicznym, pozwalającym wytypować pacjentki z zaawansowanymi zmianami śródnabłonkowymi (HSIL/CIN3), u których istnieje ryzyko szybkiej progresji do raka szyjki macicy⁶³.

1.4.4. Kolposkopia.

Niezależnie od zastosowanego testu przesiewowego w ramach profilaktyki raka szyjki macicy, uzyskane wyniki są obarczone pewnym błędem, który wynika z ograniczonej czułości i swoistości dostępnych metod. Każdy pozytywny wynik badania pierwszorazowego, w tym nieprawidłowa cytologia, dodatni test DNA HPV, dodatni test immunocytochemiczny p16/Ki67, nasuwa podejrzenie patologii, ale wymaga dalszej weryfikacji. Diagnostyka pogłębiona polega na wykonaniu oceny kolposkopowej z pobraniem bioptatu z szyjki macicy do analizy histopatologicznej, która jest badaniem rozstrzygającym tzw. „złotym standardem”.

Historia kolposkopii zaczyna się w połowie lat dwudziestych XX wieku, kiedy niemiecki ginekolog Hans Hinselmann skonstruował urządzenie optyczne służące do lepszej wizualizacji sromu, pochwy i tarczy części pochwowej szyjki macicy. Wynalazek umożliwił szybsze wykrywanie drobnych ognisk rozwijającego się inwazyjnego raka szyjki macicy⁶⁴.

Współczesna kolposkopia pozwala na wykrywanie zmian w stadium przedklinicznym, czyli na etapie śródnabłonkowej neoplazji. Dzisiejsze kolposkopy to najczęściej dwuokularowe mikroskopy oferujące 40-krotne powiększenie obrazu, wyposażone we własne źródło światła (LED, halogen lub ksenon) oraz aparat cyfrowy umożliwiający podgląd obrazu na monitorze, jego digitalizację i archiwizację⁶⁵.

Zasadnicza część badania odbywa się przy powiększeniu 4-15x. Po potwierdzeniu adekwatnych warunków badania, określa się dostępność strefy przekształceń (TZ, ang. *transformation zone*), w obrębie której najczęściej dochodzi do rozwoju patologii. W ponad 90% zmiany przednowotworowe (HSIL) mają początek w strefie transformacji, czyli obszarze pomiędzy pierwotnym i nowym połączeniem międzynabłonkowym (SCJ, ang. *squamocolumnar junction*), w miejscu, gdzie komórki nabłonka walcowatego, stopniowo w procesie metaplazji, są zastępowane komórkami nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Należy określić typ strefy transformacji (1 - całkowicie widoczna, 2 – częściowo widoczna, ale możliwy pełny wgląd przy użyciu manipulacji instrumentalnych, 3 – niemożliwa do uwidocznienia w całości). Upřednio typ 1 i 2 TZ kategoryzował warunki badania jako satysfakcjonujące, natomiast to określenie straciło na znaczeniu w nowym mianownictwie⁶⁶.

Kolejno dokonuje się oceny podnabłonkowych naczyń krwionośnych przy użyciu filtra zielonego. Obecność atypowych naczyń krwionośnych nasuwa podejrzenie inwazji.

Kluczowe jest wykonanie próby z 3-5% roztworem kwasu octowego, który doprowadza do obrzęku i zbielenia nabłonka szyjki macicy, ponieważ zachodzi odwracalna chemiczna denaturacja cytokeratyn znajdujących się w nabłonku i podścielisku. Wyraźne, szybko pojawiające się, gęste zbielenie nabłonka z utratą jego przejrzystości jest cechą sugerującą duże zmiany śródnabłonkowe. Do innych większych zmian kolposkopowych zalicza się grubą mozaikę, grube punkcikowanie, ostre odgraniczenie zmiany lub objaw granicy wewnętrznej i objaw grzbietu⁶⁷.

Badanie kolposkopowe można uzupełnić próbą Schillera z zastosowaniem wodnego roztworu jodu w jodku potasu czyli płynu Lugola, który oddziałuje z glikogenem zawartym w nabłonku paraepidormalnym szyjki macicy. Komórki, w których został zapoczątkowany proces kancerogenezy są bardziej aktywne metabolicznie i zużywają glikogen, przez co w próbie Schillera nie barwią się na brązowo dając tzw. obszar jodonegatywny. Jest to natomiast objaw niespecyficzny⁶⁸.

Po dokonaniu powyższej oceny kolposkopowej, z miejsc podejrzanych pobiera się celowane wycinki do badania histopatologicznego. W razie niewidocznienia zmian akceptowanym postępowaniem jest losowa biopsja tarczy szyjki macicy z miejsca nowego połączenia międzynabłonkowego na godzinie 2, 4, 8 i 10. W określonych sytuacjach klinicznych, z wyjątkiem pacjentek ciężarnych, rekomendowane jest również pobranie materiału z kanału szyjki macicy przy użyciu ostrej kurety (łyżki ginekologicznej) lub szczoteczki endocerykalnej typu CervexBrush⁶⁸.

W zależności od doświadczenia kolposkopisty i liczby pobranych wycinków czułość metody w wykrywaniu zmian śródnabłonkowych dużego stopnia (HSIL/CIN3+) sięga 49-61%⁶⁹. Według innych danych ryzyko przeoczenia zmiany, czyli wyniki fałszywie ujemne zawierają się w szerokim zakresie od 13% do nawet 69%⁷⁰. Choć sama procedura niesie ze sobą bardzo niskie ryzyko powikłań, to powinna być przeprowadzana przez kompetentne i dobrze wyszkolone osoby, żeby zredukować ryzyko błędnej diagnozy.

Kolposkopia jest techniką bardzo subiektywną, brakuje międzynarodowych algorytmów i wymogu certyfikacji. W trosce o zapewnienie wysokiej jakości i powtarzalności badań kolposkopowych w naszym kraju, wydano w 2020 roku rekomendacje Polskiego Towarzystwa Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (PTKiPSM) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników (PTGiP), dotyczące standardów w kolposkopii. Precyzują one protokół podstawowy, czyli minimalny obligatoryjny zakres badania oraz protokół optymalny, który jest

rekomendowany. Również w 2020 roku, w celu ujednolicenia opisów badań, powstał konsensus dotyczący polskiej nomenklatury kolposkopowej, stworzony w oparciu o mianownictwo IFCPC 2011 Międzynarodowej Federacji Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii^{67,68}.

1.5. Immunocytochemia i immunohistochemia – miejsce obu metod w diagnostyce patologii szyjki macicy.

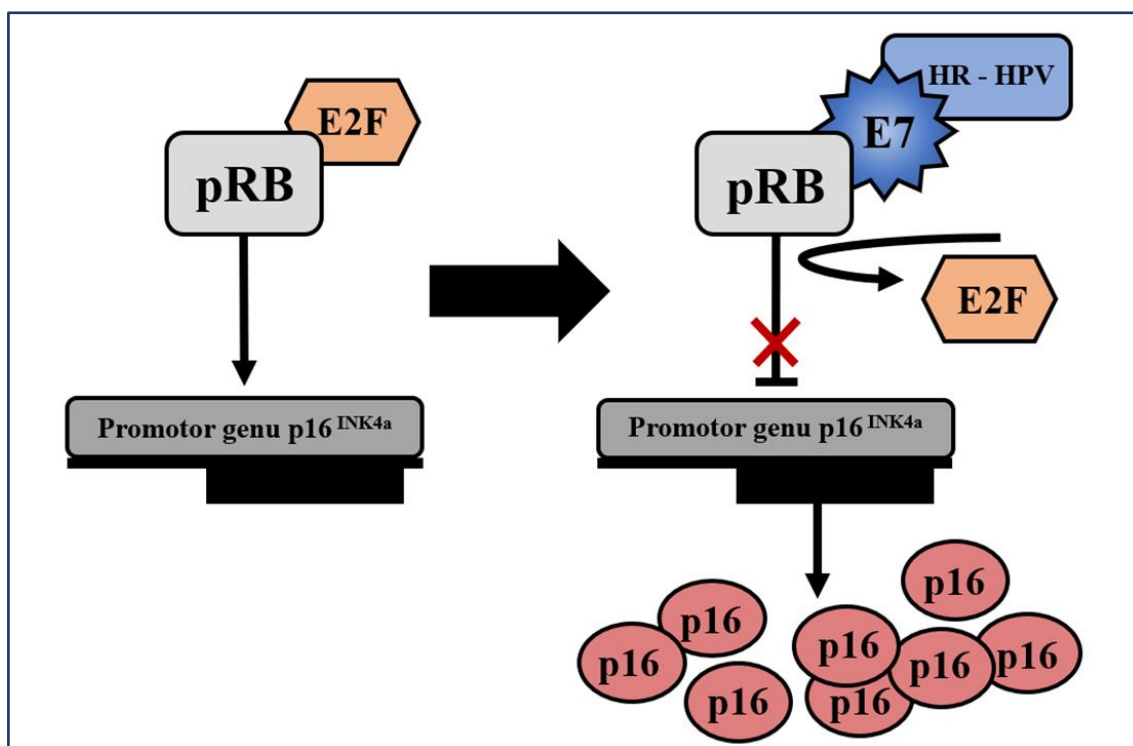
Diagnostyka immunocytochemiczna i immunohistochemiczna polega na detekcji wybranych biomarkerów, odpowiednio w preparacie cytologicznym lub materiale tkankowym, wykorzystując przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko tym biomarkerom.

Test immunocytochemiczny identyfikujący p16/Ki-67 znajduje szerokie zastosowanie w różnych modelach wczesnego wykrywania zmian śródnabłonkowych dużego stopnia i raka szyjki macicy. Istotą testu jest jednoczasowa detekcja dwóch biomarkerów p16 i Ki-67, których obecność w komórkach nabłonka szyjki macicy wynika z onkogennego działania wirusa HPV⁷¹.

1.5.1. Założenia metodologiczne testu immunocytochemicznego p16/Ki-67.

Znaczenie obu białek w regulacji cyklu komórki eukariotycznej jest dobrze poznane. Białko supresorowe p16^{INK4a} (p16) działa jako inhibitor kinazy cyklinozależnej CDK4 i CDK6, odgrywającej rolę w regulacji cyklu komórkowego. W warunkach fizjologicznych CDK4/6 wiąże się w kompleksy białkowe z cykliną D, powodując fosforylację pRb. Po ufosforylowaniu pRb odłącza się od czynnika transkrypcyjnego E2F, który uwolniony przenika do jądra komórkowego i indukuje transkrypcję genów uczestniczących w przejściu komórki z fazy G₁ do S. Zatem, podsumowując rolę białka p16, należy stwierdzić, że jako inhibitor CDK blokuje progresję cyklu komórkowego. W prawidłowej komórce wolne p16 występuje w niewielkich ilościach i nie jest wykrywane standardowymi metodami laboratoryjnymi^{56,57}.

W komórce nabłonka szyjki macicy zakażonej wysokoonkogennymi typami wirusa HPV, po inkorporacji DNA HPV do genomu gospodarza, produkowana w dużej ilości wirusowa onkoproteina E7 wiąże się z pRb, uwalniając je z połączenia z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, co aktywuje postęp cyklu komórkowego. Pod wpływem E7 dochodzi do utraty funkcji pRb, a niejako produktem ubocznym tego procesu jest stała, niekontrolowana nadprodukcja białka p16, co jest wykrywane w cytoplazmie i jądrze komórkowym przy użyciu dedykowanych przeciwciał monoklonalnych⁷².



Rycina 3. Patomechanizm odpowiedzialny za nadekspresję p16 w komórce w odpowiedzi na działanie onkoproteiny E7 wirusa brodawczaka ludzkiego (objaśnienie w tekście).

Ki-67 to kolejne białko wykrywane w teście immunocytochemicznym. Pełni rolę markera proliferacji. W prawidłowym cyklu komórkowym jest zaangażowane w wiele ważnych procesów, między innymi podczas mitozy uczestniczy w tworzeniu ochronnej warstwy wokół chromosomów, zapobiegając ich zlepianiu się podczas podziału. Antygen Ki-67 jest wykrywany w jądrach komórek dzielących się, w każdej czynnej fazie cyklu komórkowego (G₁, S, G₂ i M), ale nigdy w stanie spoczynku (G₀)^{58,59}.

Łatwo zauważyć, że oba białka pełnią przeciwstawne funkcje, to znaczy p16 hamuje cykl komórkowy, a Ki67 jest markerem proliferacji. Dlatego w warunkach fizjologicznych p16 i Ki-67 nie mogą występować jednocześnie w jednej komórce. Ich współwystępowanie oznacza, że doszło do poważnych zaburzeń w regulacji cyklu komórkowego i komórka utraciła zdolność samokontroli. Koekspresja p16/Ki-67 jest więc obrazem deregulacji cyklu komórkowego pod wpływem przetrwałego zakażenia wysokoonkogennymi typami wirusa HPV i stanowi wskaźnik trwającego procesu transformacji nowotworowej w komórkach nabłonka szyjki macicy. Koreluje zatem z występowaniem zmian śródnabłonkowych wysokiego stopnia (HSIL)⁷².

Powyższe obserwacje stały się podstawą stworzenia nowego użytecznego narzędzia w diagnostyce stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy.

1.5.2. Test diagnostyczny CINtec® PLUS - zasada działania.

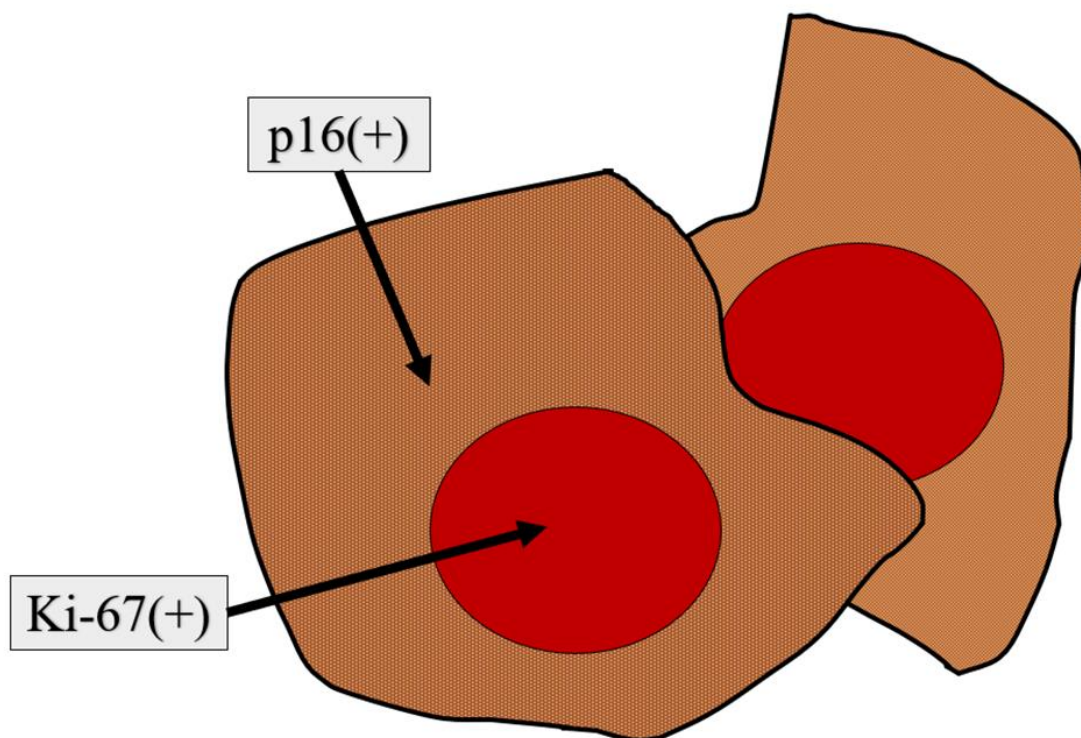
Dwubarwny test immunocytochemiczny p16/Ki-67 (w anglojęzycznych publikacjach funkcjonujący jako *p16/Ki-67 dual-stained cytology*) jest dostępny do użytku klinicznego w Polsce pod postacią produktu CINtec® PLUS firmy Roche⁷³.

Zestaw CINtec® PLUS zawiera odczynniki do jednoczesnego immunocytochemicznego wykrywania obecności białek p16^{INK4a} oraz Ki-67 w preparatach uzyskiwanych z wymazu cytologicznego szyjki macicy. Znajduje zastosowanie zarówno do barwienia preparatów konwencjonalnych utrwalonych na szkiełku podstawowym, jak również do cytologii na podłożu płynnym (ThinPrep®/SurePath™).

Markery są wykrywane w reakcji barwnej przy użyciu gotowej mieszaniny przeciwciał monoklonalnych. Wykorzystuje się klon E6H4™ czyli monoklonalne przeciwciało mysie skierowane przeciwko ludzkiemu białku p16^{INK4a} oraz klon 274-11 AC3 to jest pierwszorzędowe rekombinowane przeciwciało królicze skierowane przeciwko ludzkiemu białku Ki-67.

W wyniku reakcji immunocytochemicznej powstają dwa produkty barwne. W miejscu nadekspresji antygenu p16^{INK4a} pojawia się osad brązowy, a tam gdzie obecna jest ekspresja antygenu Ki-67 powstaje osad czerwony.

Wynik dodatni badania CINtec® PLUS występuje wtedy, gdy w ocenie preparatu pod mikroskopem świetlnym, stwierdza się charakterystyczne podwójne wybarwienie w przynajmniej jednej komórce nabłonka szyjki macicy. Cytoplazma barwi się na brązowo z powodu p16, a jądro komórkowe na ciemnoczerwono ponieważ obecne są p16 i Ki67. Dwubarwność komórki jest wskaźnikiem koekspresji p16/Ki-67 [Rycina 4].



Rycina 4. Dodatni odczyn CINItec® PLUS. W jednej komórce zachodzi podwójne czerwono-brązowe barwienie, co oznacza koekspresję p16/Ki67.

1.5.3. Rola testu CINItec® PLUS w skriningu pierwotnym - narzędzie diagnostyczne I rzutu.

Najważniejszą pracą, oceniającą użyteczność kliniczną testu immunocytochemicznego p16/Ki-67, było badanie PALMS (akronim od ang. *Primary, ASC-US, LSIL Marker Study*), którego końcowe wyniki opublikowano w 2013 roku⁷⁴.

Było to szeroko zakrojone wieloośrodkowe badanie prospektywne, prowadzone w pięciu europejskich krajach (Belgii, Francji, Niemczech, Włoszech i Hiszpanii). Badaniem objęto populację 27349 dorosłych kobiet, zgłaszających się na rutynowe badania przesiewowe w kierunku raka szyjki macicy. U wszystkich badanych kobiet użyto trzech narzędzi diagnostycznych: cytodiagnostyki pod postacią cytologii konwencjonalnej albo cienkowarstwowej na podłożu płynnym, testu immunocytochemicznego p16/Ki-67 (CINItec® PLUS) oraz testu HPV DNA (Hybrid Capture 2). Pacjentki, które uzyskały pozytywny wynik testu przesiewowego, czyli nieprawidłową cytologię i/lub dodatni wynik p16/Ki-67 i/lub dodatni test HPV, były

kierowane do drugiego etapu diagnostyki. U takich pacjentek wykonywano kolposkopię, z wyjątkiem kobiet poniżej 30 roku życia, u których jedyną nieprawidłowością był dodatni test HPV. W razie stwierdzenia podejrzanych zmian kolposkopowych, pobierano biopsję szyjki macicy. Potwierdzeniem rzeczywistej patologii szyjki macicy czyli stanu przednowotworowego, było rozpoznanie histopatologiczne co najmniej śródnabłonkowej neoplazji w stopniu umiarkowanym (CIN2+).

W badaniu PALMS porównano dokładność wszystkich trzech narzędzi skriningowych w wykrywaniu rzeczywistych stanów przedrakowych szyjki macicy (CIN2+)⁷⁴. Wykazano znamienne wyższą czułość testu immunocytochemicznego p16/Ki-67 w porównaniu z cytodiagnostyką (86,7% versus 68,5%; $p < 0,001$). Nie stwierdzono różnic w swoistości obu metod (odpowiednio 95,2% i 95,4%; $p = 0,15$). U kobiet, które ukończyły 30 lat, test DNA HPV osiągnął wyższą czułość niż CINtec® PLUS (93,3% versus 84,7%; $p = 0,03$), ale miał niższą swoistość (93,0% versus 96,2%; $p < 0,001$). Podobne wnioski uzyskano zawężając punkt końcowy badania do zmian bardziej zaawansowanych (CIN3+). W tej analizie test immunocytochemiczny wykazał czułość 87,4% i swoistość 94,8%⁷⁴.

1.5.4. Zastosowanie testu CINtec® PLUS w badaniach uzupełniających - narzędzie skriningowe II rzutu.

Aktualnie w wielu krajach, w tym również w Polsce⁷⁵, test immunocytochemiczny identyfikujący biomarkery p16/Ki-67 jest zalecany jako narzędzie skriningowe dodatkowe, doprecyzowujące wskazania do diagnostyki pogłębionej w kolposkopii, u pacjentek z niskiego stopnia nieprawidłowościami lub niejednoznacznym wynikiem badań przesiewowych.

W badaniach klinicznych potwierdzono jego skuteczność jako metody uzupełniającej w przypadku rozpoznania cytologicznych ASC-US oraz LSIL. Test CINtec® PLUS pozwala wytypować pacjentki, które są zagrożone występowaniem zmian śródnabłonkowych wysokiego stopnia i w związku z tym wymagają diagnostyki kolposkopowej^{76,77}.

Pierwsze wyniki opublikowano w 2011 roku na podstawie badania EEMAPS (akronim od ang. *European Equivocal or Mildly Abnormal Pap Cytology Study*). Czułość metody immunocytochemicznej w wykrywaniu zmian HSIL/CIN2+, w przypadku cytologii ASC-US wyniosła 92,2%, a dla LSIL 94,2%. Swoistość to odpowiednio 80,6%

dla ASC-US i 68,0% dla LSIL. W tej samej analizie test DNA HPV, jako narzędzie doprecyzowujące wskazania do kolposkopii, wykazywał podobną czułość wykrywania CIN2+ to jest 90,9% dla ASC-US i 96,4% dla LSIL, ale istotnie mniejszą swoistość wynoszącą 36,3% dla ASC-US i 19,2% dla LSIL⁷⁸.

W badaniu PALMS porównano też wartość diagnostyczną testów p16/Ki-67 oraz DNA HPV, w celu selekcji pacjentek z mniejszymi nieprawidłowościami cytologicznymi, które wymagają pogłębienia diagnostyki. W rezultacie stwierdzono, że w przewidywaniu zmian CIN2+ u pacjentek z ASC-US/LSIL, test immunocytochemiczny ma wyższą dodatnią wartość predykcyjną (PPV 16,3% dla ASC-US i 26,5% dla LSIL), w porównaniu z testem molekularnym identyfikującym DNA HPV (PPV 10,0% dla ASC-US i 18,6% dla LSIL)⁷⁹. Postawiono wniosek, że dwubarwny test p16/Ki-67 z dużą dokładnością wskazuje, które wyniki cytologii ASC-US/LSIL mogą być niedoszacowane i wymagają pogłębienia diagnostyki w kierunku HSIL. Dzięki temu może skutecznie redukować ilość niepotrzebnych kolposkopii u kobiet bez istotnych patologii szyjki macicy.

Po upowszechnieniu w wielu krajach modelu badań przesiewowych raka szyjki macicy opierającego się na pierwszorazowym teście molekularnym DNA HPV, zauważono potrzebę wyboru skutecznego badania dodatkowego, z uwagi na niesatysfakcjonującą swoistość testu wirusowego czyli dużą ilość wyników fałszywie dodatnich. Liczne badania potwierdziły przydatność testu CINtec® PLUS^{80,81,82,83,84}.

Przeprowadzono analizę retrospektywną subpopulacji 7727 kobiet powyżej 25 roku życia z badania ATHENA, u których z powodu dodatniego wyniku testu HPV wykonano kolposkopię i biopsję szyjki macicy. Stwierdzono, że dla takich kobiet lepszym badaniem II rzutu jest test p16/Ki-67, wykrywający CIN2+ z czułością 74,9%, aniżeli cytodiagnostyka charakteryzująca się niedostateczną czułością na poziomie 51,9%. Ponadto, jako najskuteczniejszy model badań przesiewowych, wykrywający z najwyższą czułością zmiany przednowotworowe wysokiego stopnia i raka szyjki macicy (CIN3+), uznano taki skrining, w którym wszystkie pacjentki HPV16(+) i/lub HPV18(+) są bezpośrednio kierowane na kolposkopię, a test CINtec® PLUS służy, jako narzędzie doprecyzowujące wskazania do etapu pogłębionej diagnostyki, u tych pacjentek, u których stwierdzono obecność innych 12 typów HR HPV⁸⁴.

1.5.5. Test CINtec® PLUS do monitorowania nawrotu HSIL po leczeniu.

Wśród kobiet leczonych z powodu zmian śródnabłonkowych wysokiego stopnia (HSIL), część niestety doświadcza nawrotu choroby. Częstość nawrotów po leczeniu jest szacowana na 5-15%, a większość z nich jest rozpoznawana w ciągu dwóch pierwszych lat po zabiegu.

Wśród dobrze udokumentowanych czynników ryzyka nawrotu są: wiek, stopień zaawansowania i rozległość zmiany, zajęcie marginesów w materiale histopatologicznym z zabiegu ekscyzyjnego szyjki macicy najczęściej metodą LEEP (ang. *loop electrosurgical excision procedure*), obecność HSIL w kanale szyjki macicy, przetrwałe zakażenie wysokoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego szczególnie HPV16, stany immunosupresji⁸⁵.

W praktyce klinicznej, do diagnostyki u pacjentek po leczeniu z powodu HSIL, najczęściej wykorzystuje się test połączony to jest wymaz cytologiczny oraz badanie molekularne DNA HPV.

Test immunocytochemiczny p16/Ki-67, był badany pod kątem użyteczności w monitorowaniu pacjentek po leczeniu stanów przednowotworowych szyjki macicy. Stwierdzono, że zastosowany samodzielnie test CINtec® PLUS ma niedostateczną czułość detekcji nawrotów HSIL wynoszącą 69,2%, przy dobrej swoistości sięgającej 90,4%. Najlepsze wyniki uzyskano dzięki zastosowaniu połączenia testu DNA HPV oraz testu p16/Ki-67 uzyskując czułość na poziomie 87,2%, porównywalną do wykorzystania podwójnej metody z testem DNA HPV i cytologią (89,7%), natomiast osiągnięto znacząco wyższą swoistość (74,2% versus 58,1%)⁸⁶.

2. Cele pracy.

Dzięki rozszerzanej na cały świat nowoczesnej strategii działań profilaktycznych, opierających się na szczepieniach populacyjnych przeciwko wirusom brodawczaka ludzkiego, realna staje się wizja całkowitej eliminacji raka szyjki macicy jako problemu zdrowia publicznego. Do czasu osiągnięcia optymalnego poziomu uodpornienia populacji ogólnoswiatowej, ważne jest nieustanne doskonalenie metod diagnostycznych oraz utrzymywanie efektywnych programów skriningowych, aby chronić kobiety nieszczepione przed zachorowaniem na inwazyjnego raka szyjki macicy.

2.1. Cel główny.

Zasadniczym celem pracy była ocena wartości diagnostycznej testu immunocytochemicznego identyfikującego koekspresję biomarkerów p16/Ki-67 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy.

2.2. Cele szczegółowe.

- 1) Porównanie wartości wykrywczych narzędzi skriningowych wykorzystywanych w badaniach przesiewowych w kierunku śródnabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy u kobiet z nieprawidłowym wynikiem oceny rozmazu cytologicznego.
Ocena wartości diagnostycznej następujących metod zastosowanych samodzielnie oraz w modelach połączonych:
 - a) testu molekularnego DNA HPV,
 - b) testu immunocytochemicznego p16/Ki-67,
 - c) cytodiagnostyki LBC wzbogaconej o immunocytochemiczne wykrywanie p16/Ki-67,
 - d) testu wirusowego DNA HPV w połączeniu z identyfikacją p16/Ki-67 w teście immunocytochemicznym.
- 2) Ocena użyteczności metody immunocytochemicznej do weryfikacji poprawności rozpoznań cytologicznych i wyników molekularnej analizy DNA HPV.
Sprawdzenie przydatności klinicznej testu p16/Ki-67 jako narzędzia doprecyzowującego wskazania do diagnostyki pogłębionej w przypadku niejednoznacznych wyników badań przesiewowych.

3. Materiał.

Badania prowadzono w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym (GPSK) Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy (PPSM) oraz Pododdziale Ginekologicznym I.

Rozpoczęcie badań poprzedzono uzyskaniem zgody Komisji Bioetycznej przy UMP (Uchwała nr 234/19 z dnia 07 lutego 2019 r.).

Rekrutacja pacjentek do części prospektywnej badania odbywała się w okresie od lutego 2019 do lutego 2021 roku. Spośród wszystkich kobiet, które w tym okresie zgłaszały się ze skierowaniem na konsultację do Poradni Patofizjologii Szyjki Macicy, jako ośrodka referencyjnego w diagnostyce i leczeniu stanów patologicznych szyjki macicy, do badania zakwalifikowano ostatecznie 93 kobiety (n=93).

Badano wyłącznie osoby pełnoletnie. Wiek kobiet uczestniczących w badaniu mieścił się w przedziale od 20 do 70 lat. Od wszystkich pacjentek uzyskano świadomą zgodę potwierdzoną własnoręcznym podpisem na specjalnie przygotowanym formularzu.

Tabela 2. Rozkład wieku populacji zrekrutowanej do badania.

Wiek	Liczba	%
≤29	26	27,96
30-39	33	35,48
40-49	17	18,28
≥50	17	18,28
RAZEM	93	100,00

Wszystkie pacjentki spełniały podstawowy warunek włączenia do badania, to znaczy posiadały udokumentowany nieprawidłowy wynik badań przesiewowych, czyli rozpoznanie cytologiczne wg TBS: ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, AGC, rak albo klinicznie podejrzewano u nich istnienie poważnej patologii szyjki macicy, pomimo braku nieprawidłowości w cytologii: NILM lub brak wyniku cytologii.

Tabela 3. Liczebność w grupach z poszczególnymi rozpoznaniem cytologicznymi wśród pacjentek zakwalifikowanych do badania.

LBC wg TBS	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	AGC	Rak	NILM	Brak cytologii	RAZEM
Liczba	22	20	20	16	0	0	12	3	93
%	23,7	21,5	21,5	17,2	0	0	12,9	3,2	100

Pozytywna rekrutacja do badania skutkowała pobraniem materiału do dalszych analiz laboratoryjnych. U wszystkich pacjentek pobrano wymaz z tarczy części pochwowej szyjki macicy i/lub sklepień pochwy na podłoże płynne. Tym sposobem pozyskano próbki do dalszych badań: powtórnego badania cytologicznego u tych pacjentek, u których wynik ambulatoryjny był stworzony w oparciu o metodę konwencjonalną, testu immunocytochemicznego (CINtec® PLUS) oraz badań molekularnych (test DNA HPV wykrywający 14 typów HR HPV z genotypowaniem 16 i 18). Następnie u każdej pacjentki wykonano ocenę kolposkopową i pobrano biopsję szyjki macicy do badania histopatologicznego.

Na podstawie końcowego rozpoznania patomorfologicznego kobiety uczestniczące w badaniu zostały przypisane odpowiednio do grupy badanej lub kontrolnej.

Pacjentki, u których potwierdzono histopatologicznie obecność patologii szyjki macicy, podlegały dalszej obserwacji. W przypadku istnienia wskazań do leczenia chirurgicznego, czyli w razie wykrycia raka szyjki macicy, CIN3/HSIL, CIN2/HSIL oraz CIN1/LSIL przy braku samoistnej regresji, rejestrowano ostateczne wyniki histopatologiczne z materiału pooperacyjnego, co służyło do dalszych analiz retrospektywnych.

4. Metoda.

4.1. Cytodiagnostyka.

Wymaz z tarczy i kanału szyjki macicy pobierano pod kontrolą wzroku, we wzierniku ginekologicznym typu Cusco, przy użyciu sterylnej, jednorazowej szczoteczki cytologicznej Cervex-Brush® z końcówką w kształcie wachlarza. Najdłuższe wypustki szczoteczki kierowano przez ujście zewnętrzne do kanału szyjki macicy na głębokość 1 cm, a następnie delikatnie przyciskając, obracano szczoteczkę pięciokrotnie wokół własnej osi zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Ta metoda umożliwiała pozyskanie złuszczonych komórek z tarczy części pochwowej oraz kanału szyjki macicy.

Pobrany materiał utrwalano na podłożu płynnym na bazie alkoholu SurePath™ produkcji Becton, Dickinson and Company. Szczoteczkę cytologiczną zanurzano w pojemniku BD SurePath™ Collection Vial, wypełnionym roztworem utrwalającym BD SurePath™ Preservative Fluid. Wachlarzową końcówkę szczoteczki odłączano od trzonka i pozostawiano wewnątrz pojemnika.

W kolejnym etapie testu BD SurePath™ Liquid-based Pap Test, zawieszinę poddawano automatycznej obróbce przy zastosowaniu systemu BD Totalys SlidePrep, dzięki czemu uzyskiwano cienkowarstwowy preparat cytologiczny, pozbawiony tła składającego się z komórek zapalnych, erytrocytów i śluzu. Proces ten przebiegał wieloetapowo i składał się z mieszania na wytrząsarce, wirowania w gradientach stężeń roztworu BD Density Reagent, przeniesienia osadu komórkowego do specjalnej komory na szkiełku podstawowym BD SurePath™ PreCoat, sedymentacji grawitacyjnej komórek, barwienia zmodyfikowaną metodą Papanicolaou i przemywaniu ksylenem. Gotowy preparat na koniec zamykano pod szkiełkiem nakrywkowym i poddawano dalszej analizie mikroskopowej.

Do oceny używano mikroskopu optycznego Axioskop 40 firmy Zeiss. Badanie przeprowadzali wykwalifikowani laboranci specjalizujący się w cytodiagnostyce medycznej. Wyniki LBC formułowano wg systemu Bethesda, a stwierdzone nieprawidłowości cytoonkologiczne weryfikował następnie lekarz patomorfolog.

4.2. Test immunocytochemiczny CINtec® PLUS.

Do badania immunocytochemicznego przy użyciu zestawu CINtec® PLUS Cytology Kit, wykorzystywano te same próbki cytologiczne, które uprzednio służyły do LBC. Materiał pobrany na podłoże płynne, po przetworzeniu we wzbogacone pelety komórkowe, utrwalano w płynie konserwującym SurePath™ Preservative Fluid. Tak zachowany materiał, przeznaczony do barwienia immunocytochemicznego, mógł być przechowywany w temperaturze pokojowej 15-30°C przez maksymalnie 4 tygodnie lub w lodówce w temperaturze 2-10°C przez nie więcej jak 6 miesięcy.

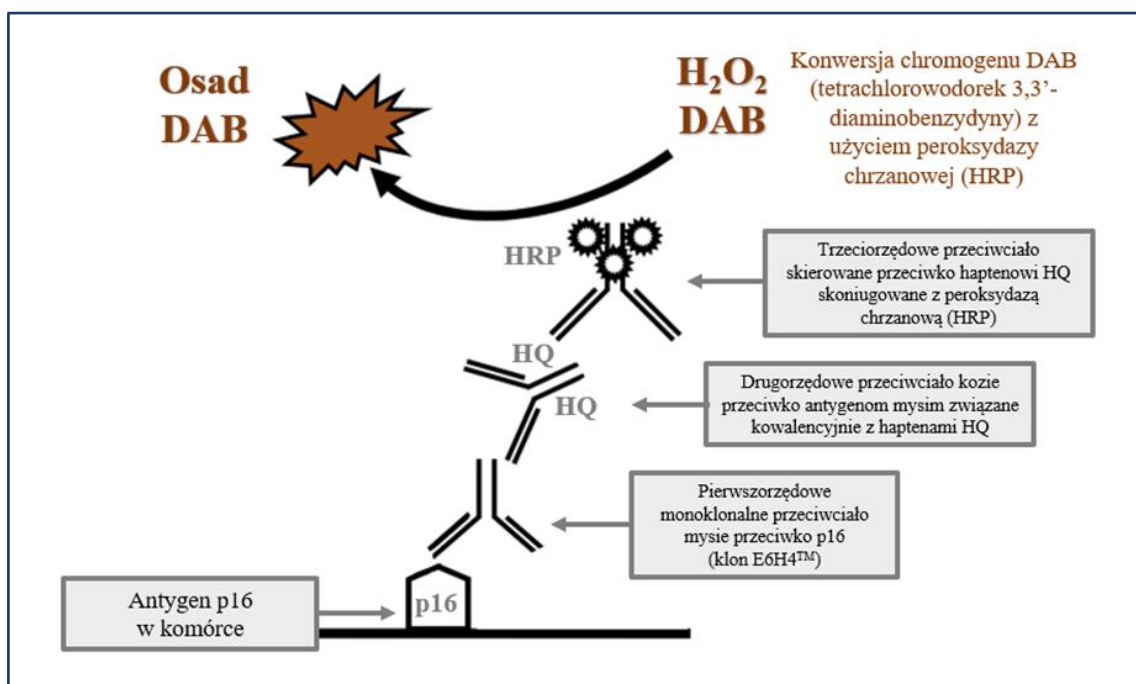
Barwienia immunocytochemiczne wykonywano w PPSM GPSK cyklicznie po odpowiednim przygotowaniu próbek BD SurePath™ z utrwalonego peletu komórkowego. Po zakończeniu obróbki wg instrukcji producenta, uzyskiwano w procesie sedimentacji cienkowarstwowy, wysuszony preparat, gotowy do dalszego barwienia.

Procedura barwienia przy użyciu zestawu CINtec® PLUS Cytology Kit była w pełni zautomatyzowana i przebiegała według protokołów zalecanych przez producenta. Wykorzystywano urządzenie VENTANA BenchMark z zestawem dedykowanych odczynników. Po wybarwieniu, dla ochrony przed zanikaniem chromogenów i w celu zachowania optymalnej czułości metody diagnostycznej, przeprowadzano dwuetapową procedurę zatapiania. Najpierw preparaty zakraplano wodnym środkiem do zatapiania CC/Mount™, a po jego wysuszeniu, nanoszono szkiełka nakrywkowe za pomocą trwałego środka do zatapiania na bazie ksylenu. Tak przygotowany preparat był gotowy do oceny pod mikroskopem świetlnym przez profesjonalistę, patomorfologa lub cytodiagnostę, z przeszkoleniem w zakresie interpretacji preparatów barwionych immunocytochemicznie zestawem CINtec® PLUS.

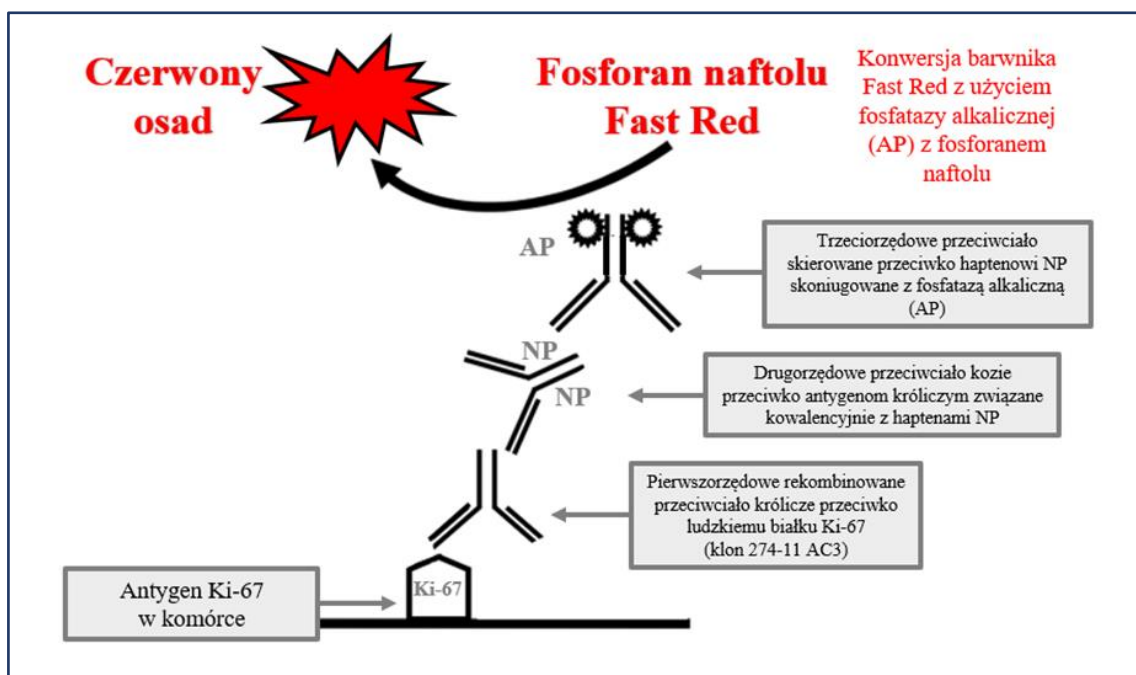
W celu potwierdzenia dodatniego odczynu CINtec® PLUS należało stwierdzić w badanym preparacie obecność co najmniej jednej komórki nabłonka szyjki macicy, która uległa charakterystycznemu podwójnemu wybarwieniu za sprawą koekspresji dwóch biomarkerów p16^{INK4a} i Ki-67. W zaburzonej komórce, na skutek przetrwałej onkogennej infekcji HPV, dochodzi do deregulacji cyklu komórkowego. W efekcie można stwierdzić jednoczesną nadprodukcję białka p16^{INK4a}, co objawia się brązowym zabarwieniem cytoplazmy, oraz silną ekspresję białka Ki-67, co skutkuje swoistym czerwonym zabarwieniem jądra komórkowego.

Oba biomarkery są wykrywane przy użyciu gotowej mieszaniny przeciwciał monoklonalnych. Są to monoklonalne przeciwciała mysie skierowane przeciwko

ludzkiemu białku p16^{INK4a} (klon E6H4TM) oraz pierwszorzędowe rekombinowane przeciwciało królicze skierowane przeciwko ludzkiemu białku Ki-67 (klon 274-11 AC3). Kolejne przeciwciała drugo- i trzeciorzędowe tworzą wspólnie złożone systemy detekcji. Reakcja barwna, powodująca powstawanie brązowego osadu w miejscu występowania antygenu p16^{INK4a}, polega na konwersji chromogenu DAB (tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny) z użyciem peroksydazy chrzanowej (HRP) [Rycina 5]. Czerwony osad w miejscu występowania antygenu Ki-67 powstaje w wyniku konwersji barwnika Fast Red z użyciem fosfatazy alkalicznej (AP) z fosforanem naftolu [Rycina 6].



Rycina 5. Detekcja ludzkiego białka p16^{INK4a}.



Rycina 6. Detekcja ludzkiego białka Ki-67.

4.3. Test molekularny DNA HPV.

Materiał do testu DNA HPV pobierano z szyjki macicy i sklepień pochwy przy użyciu jałowej szczoteczki Cervex-Brush®. Wymaz polegał na wprowadzeniu końcówki szczoteczki na głębokość 1 cm do kanału szyjki i lekkim dociśnięciu, przez co zasadnicza część wypustek pozostawała w kontakcie z tarczą szyjki macicy w rejonie strefy przekształceń, a następnie obrocie szczoteczką pięciokrotnie o 360° w prawo. Tak pobrany materiał umieszczano w pojemniku z podłożem płynnym Roche Cell Collection Medium. Po opłukaniu szczoteczki ze zgromadzonego materiału komórkowego poprzez energiczne przyciskanie jej do dna pojemnika i ruchy obrotowe, szczoteczkę następnie wyrzucano. Przygotowany materiał przechowywano w lodówce w temperaturze 2-8°C.

Identyfikacja wirusa brodawczaka ludzkiego przy użyciu technik molekularnych odbywała się w Pracowni Wirusologii Molekularnej PPSM GPSK. Test DNA HPV wykonywano na urządzeniu Cobas® 4800 HPV Test firmy Roche Diagnostics, w oparciu o technologię Real-Time PCR. Test ten umożliwiał wykrywanie DNA 14 wysokoonkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego. Oznaczano osobno genotypy HPV16 i HPV18 oraz obecność innych wirusów z grupy HR (ang. *high risk*), do których należały typy 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, i 68.

Test DNA HPV składał się z kilku etapów. Najpierw przygotowywano materiał z wykorzystaniem automatu cobas x 480. Próbkę zabezpieczoną w płynnym medium poddawano działaniu wysokiej temperatury. Dochodziło do lizy komórek, dzięki czemu uzyskiwano wolne kwasy nukleinowe, w tym ewentualne DNA wirusa brodawczaka ludzkiego. Pozyskane DNA oddzielano od pozostałych zanieczyszczeń dzięki absorpcji na magnetycznych cząstkach szkła. Kolejny etap przebiegał w analizatorze cobas z 480. Podczas denaturacji pod wpływem temperatury 95°C pękały wiązania wodorowe dsDNA i otrzymywano pojedyncze nici kwasów nukleinowych. Następnie, po obniżeniu temperatury do 45–60 °C, w procesie hybrydyzacji przyłączano startery komplementarne dla DNA określonych 14 typów wirusa HPV, zawarte w odczynniku Master Mix. Po ponownym podgrzaniu mieszaniny reakcyjnej do około 72 °C, dochodziło do aktywacji enzymu polimerazy DNA i jej przyłączania do kompleksów matrycy ze starterem, w efekcie powodując elongację czyli syntezę nici DNA. Dzięki temu uzyskiwano amplifikację pożądaných fragmentów wirusowego DNA. Cała reakcja ulegała wielokrotnemu powtórzeniu powodując geometryczny przyrost liczby zsintetyzowanych cząsteczek DNA. Detekcja uzyskiwanych produktów reakcji łańcuchowej polimerazy

zachodziła w czasie rzeczywistym przy użyciu sond znakowanych fluorescencyjnie. Uzyskiwano cztery różne reakcje barwne osobno dla sygnałów pochodzących od DNA HPV16, HPV18, łącznie od innych 12 typów HPV HR oraz dodatkowo od ludzkiego genu β -globiny, który ulegał analogicznym reakcjom, stanowiąc kontrolę całego procesu.

4.4. Kolposkopia.

Diagnostykę kolposkopową przeprowadzano w Poradni Patofizjologii Szyjki Macicy GPSK przy użyciu kolposkopu stereoskopowego model OCS 500 marki Olympus. Kolposkop wyposażono w aparat cyfrowy umożliwiający podgląd na monitorze, digitalizację i archiwizację uzyskiwanych obrazów w programie IRIS Ginekologia firmy Medicom.

Badanie kolposkopowe przeprowadzano zgodnie z obowiązującymi wówczas wytycznymi PTKiPSM oraz PTGiP. Dokonywano oględzin sromu, pochwy i szyjki macicy oraz oceniano typ strefy transformacji. Następnie, przy użyciu wbudowanego zielonego filtra, poszukiwano atypowych naczyń krwionośnych. W kolejnym etapie każdorazowo wykonywano próbę z 3-5% wodnym roztworem kwasu octowego a następnie próbę Schillera z wodnym roztworem jodu w jodku potasu.

Do opisu kolpogramów posługiwano się mianownictwem ustanowionym przez Międzynarodową Federację Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii (IFCPC 2011). Ponadto wykorzystywano ocenę punktową według skali Reida (RCI, *Reid Colposcopic Index*), uwzględniającą cztery parametry, takie jak kolor i granice zmiany po próbie z kwasem octowym, charakter naczyń krwionośnych oraz jodochwytność po próbie z płynem Lugola. W ocenie wg RCI zmiana mogła uzyskać od 0 do maksymalnie 8 punktów, przy czym za nieprawidłowy uznawano wynik ≥ 3 punkty [Tabela 4].

Tabela 4. Skala Reida.

Cecha kolposkopowa	Punktacja w skali Reida		
	O pkt.	1 pkt.	2 pkt.
Kolor	• subtelne półprzezroczyste zbielenie, • zbielenie występujące poza strefą przekształceń, • śnieżnobiałe zbielenie z połyskliwą powierzchnią	• pośrednie zbielenie, o szarobiałym odcieniu, świecące	• intensywne perłowobiałe zbielenie
Granice zmiany, ukształtowanie powierzchni	• granice zmiany postrzępione, • tzw. granice geograficzne, • niewyraźne odgraniczenie od otoczenia, • zmiany satelitarne wyraźnie oddzielone od nowej granicy międzynabłonkowej, • powierzchnia zmieniona przez brodawczaki lub kłykciny	• zmiany regularnego kształtu, • ostro odgraniczone od otoczenia	• zwinięte, złuszczone się brzegi zmiany, • zmiana o zróżnicowanym stopniu zbielenia
Naczynia krwionośne	• delikatne punkcikowanie i mozaika	• brak naczyń po próbie z kwasem octowym	• grube punkcikowanie i mozaika
Próba jodowa	• jednolicie brunatne zabarwienie zmiany, • zmiana jodonegatywna, która otrzymała ≤ 3 pkt za pozostałe cechy	• częściowy wychwyt jodu, obszar cętkowany	• obszar jodonegatywny, • zmiana jodopozytywna, która otrzymała ≥ 4 pkt za pozostałe cechy

4.5. Biopsja szyjki macicy.

U każdej pacjentki, po dokonaniu oceny kolposkopowej, pobierano wycinki z tarczy szyjki macicy do badania histopatologicznego. Używano kleszczyków biopsyjnych Tischler. Biopsję pobierano w sposób celowany z miejsc podejrzanych o śródnabłonkową neoplazję ($RCI \geq 3$ pkt.). W razie niewidocznienia zmian wykonywano losową biopsję tarczy szyjki macicy na godzinie 2, 4, 8 i 10, w miejscu nowego połączenia międzynabłonkowego. Wszystkie pacjentki poddano również diagnostycznemu łyżeczkowaniu kanału szyjki macicy przy użyciu skrobaczki ginekologicznej Recamier.

Uzyskany materiał tkankowy zatapiano w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny na 24-72 godziny. Tak utrwalone preparaty przekazywano do dalszej obróbki w Pracowni Patomorfologii GPSK, gdzie ostatecznie podlegały ocenie mikroskopowej przez lekarza specjalistę w patomorfologii.

Otrzymane wyniki histopatologiczne przyporządkowano do pięciu kategorii rozpoznania: bez zmian, CIN1/LSIL, CIN2/HSIL, CIN3/HSIL, rak.

4.6. Analiza statystyczna.

W obliczeniach statystycznych posługiwano się oprogramowaniem PQStat w wersji 1.8.2.

Dla każdego z ocenianych testów skonstruowano tabele kontyngencji 2x2 według określonego modelu, uwzględniającego uzyskane wyniki testu przesiewowego oraz ostateczne wyniki histopatologiczne [Tabela 5]. Na podstawie wiedzy, czy cecha wykrywana w teście diagnostycznym rzeczywiście występuje w teście potwierdzenia, wszystkie uzyskane wyniki przyporządkowano do jednej z czterech kategorii:

- TP - wyniki prawdziwie dodatnie (ang. *true positive*),
- FP - wyniki fałszywie dodatnie (ang. *false positive*),
- FN - wyniki fałszywie ujemne (ang. *false negative*),
- TN - wyniki prawdziwie ujemne (ang. *true negative*).

Tabela 5. Modelowa tabela kontyngencji 2x2.

Obserwowane licznosci		Wynik badania histopatologicznego („złoty standard”)	
		Dodatni (+)	Ujemny (-)
Wynik testu diagnostycznego	Dodatni (+)	TP	FP
	Ujemny (-)	FN	TN

Wykorzystując powyższe dane, wyliczono miary opisujące przydatność badanych testów w diagnostyce skriningowej:

- SENS - czułość (ang. *sensitivity*) oznaczająca zdolność testu do wykrywania rzeczywistych stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy,

$$SENS = \frac{TP}{TP + FN}$$

- SPEC - swoistość (ang. *specificity*) opisująca zdolność do prawidłowego identyfikowania osób zdrowych,

$$SPEC = \frac{TN}{FP + TN}$$

- PPV - wartość predykcyjna dodatnia (ang. *positive predictive value*), czyli prawdopodobieństwo diagnozy HSIL po uzyskaniu dodatniego wyniku testu skriningowego,

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}$$

- NPV - wartość predykcyjna ujemna (ang. *negative predictive value*), czyli prawdopodobieństwo, że badana osoba rzeczywiście nie ma HSIL, jeśli uzyskała ujemny wynik testu przesiewowego,

$$NPV = \frac{TN}{FN + TN}$$

- ACC - dokładność (ang. *accuracy*), czyli prawdopodobieństwo uzyskania poprawnej diagnozy przy użyciu wykorzystanej metody diagnostycznej.

$$ACC = \frac{TP + TN}{n}$$

Przedziały ufności dla SENS, SPEC, PPV, NPV, PREV i ACC budowano w oparciu o metodę Cloppera-Pearsona dla pojedynczej proporcji. Jako przedział ufności (CI, ang. *confidence interval*) ustanowiono 0,95.

Dla każdego testu wyliczono iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (LR+, ang. *likelihood ratio of positive test*), czyli iloraz szans, że wynik dodatni otrzyma osoba chora do szansy na uzyskanie tego wyniku przez osobę zdrową.

$$LR+ = \frac{SENS}{1 - SPEC} = \frac{TP(TP + FN)}{FP(FP + TN)}$$

Wyliczony iloraz wiarygodności wyniku ujemnego (LR-, ang. *likelihood ratio of negative test*), oznaczał iloraz szans, że osoba chora uzyska wynik ujemny do szansy otrzymania takiego wyniku przez osobę zdrową.

$$LR- = \frac{1 - SENS}{SPEC} = \frac{FN(TP + FN)}{TN(FP + TN)}$$

Przedziały ufności dla LR+ i LR- budowano w oparciu o błąd standardowy (SE, ang. *standard error of the estimate*).

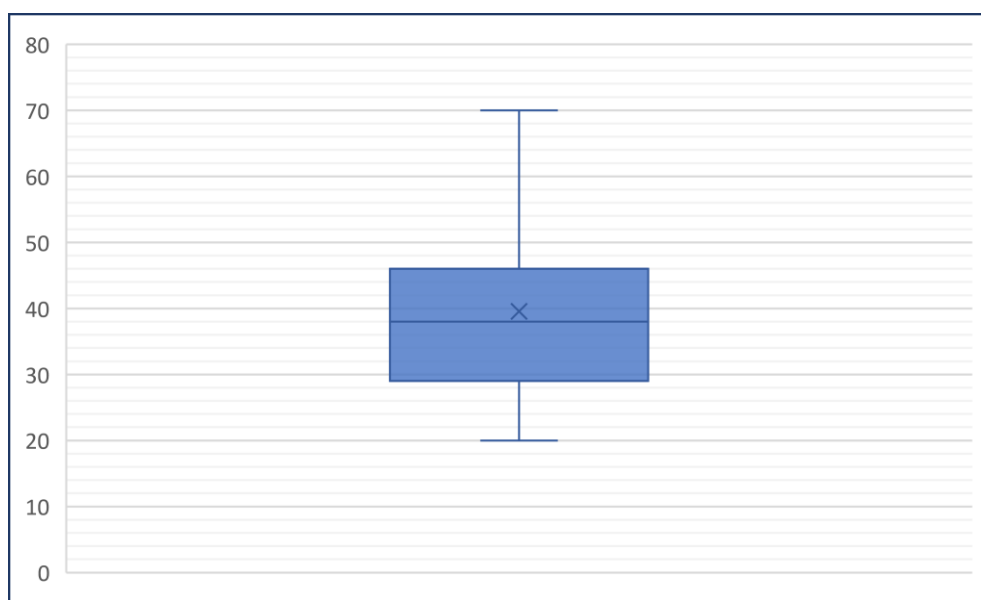
Za pomocą programu statystycznego skonstruowano następnie wykresy krzywych ROC (ang. *receiver operating characteristic curve*) dla ocenianych testów diagnostycznych. Jakość testów określono za pomocą pól pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*), obliczonych metodą DeLong'a.

Dla wszystkich obliczeń przyjęto poziom istotności statystycznej $\alpha=0,05$.

5. Wyniki.

5.1. Charakterystyka populacji.

Do badania zakwalifikowano łącznie 93 kobiety w wieku od 20 do 70 lat. Średnia wieku badanych kobiet wyniosła 39 lat, a mediana 37 lat [Wykres 5]. Dla celów dalszych obliczeń populację podzielono na dwie grupy wiekowe, z uwagi na odmienny naturalny przebieg zakażenia onkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego u kobiet przed i po ukończeniu 30 roku życia. Liczebność i udział procentowy obu grup wiekowych przedstawiono w tabeli [6].



Wykres 5. Rozkład wieku badanej populacji (wiek w latach, $n=93$).

Tabela 6. Liczebność populacji z podziałem na grupy wiekowe poniżej i powyżej 30 r.ż.

Wiek	Liczba (n)	Procent (%)
<30 r.ż.	26	28,0
≥30 r.ż.	67	72,0
Łącznie	93	100

Spośród zastosowanych metod diagnostycznych za badanie rozstrzygające uznano biopsję szyjki macicy. Na podstawie uzyskanych wyników histopatologicznych bioptatów szyjki macicy, kobiety przydzielono odpowiednio do grupy badanej lub grupy kontrolnej.

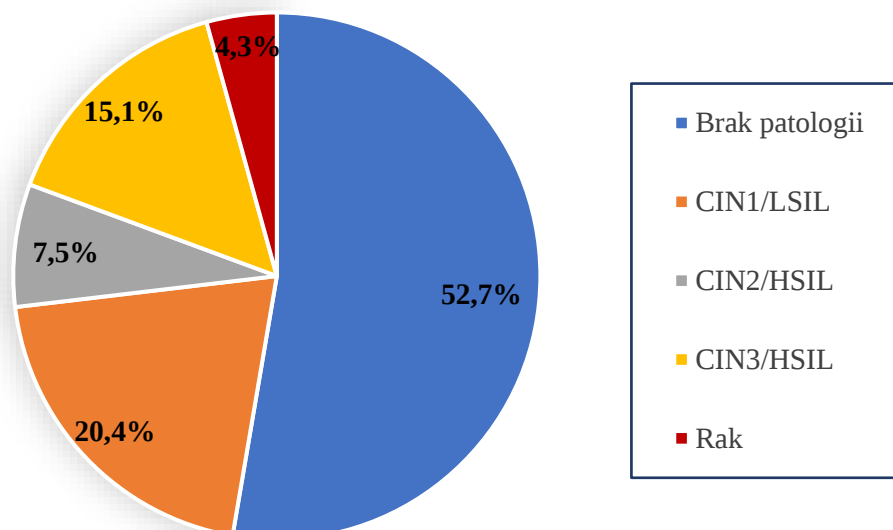
Do grupy badanej włączono pacjentki z potwierdzoną histopatologicznie śródnabłonkową neoplazją lub rakiem szyjki macicy, czyli 44 kobiety, które uzyskały wynik histopatologiczny CIN1/LSIL, CIN2/HSIL, CIN3/HSIL lub rak. Grupa badana stanowiła 47,3 procent (44/93).

Na grupę kontrolną składały się te kobiety, u których w ocenie patomorfologicznej nie stwierdzono patologii szyjki macicy. Prawidłowy wynik histopatologiczny (brak patologii) uzyskało 49 kobiet co stanowiło 52,7 procent wszystkich uczestniczek badania (49/93).

Liczebność i odsetki poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w populacji wszystkich kobiet zakwalifikowanych do badania zaprezentowano w tabeli [7] i na wykresie [6].

Tabela 7. Liczba i procent uzyskanych wyników histopatologicznych dla całej populacji.

Wynik histopatologiczny	Liczba (n)	Procent (%)
Brak patologii	49	52,7
CIN1/LSIL	19	20,4
CIN2/HSIL	7	7,5
CIN3/HSIL	14	15,1
Rak	4	4,3
Łącznie	93	100,0



Wykres 6. Rozkład procentowy uzyskanych wyników histopatologicznych dla całej populacji (n=93).

[Tabela 8] i [Tabela 9] przedstawiają dane dotyczące uzyskanych wyników histopatologicznych w zależności od wieku kobiet. Rozkład procentowy poszczególnych rozpoznaw w obu badanych subpopulacjach, to jest poniżej i po ukończeniu 30 roku życia, jest zbliżony. W wartościach bezwzględnych więcej przypadków ciężkich patologii szyjki macicy zdiagnozowano w starszej grupie wiekowej, ale było to efektem większej liczebności tej grupy. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji stopnia zaawansowania zmian histopatologicznych z wiekiem badanych kobiet.

Tabela 8. Uzyskane wyniki histopatologiczne z podziałem populacji na dwie grupy wiekowe (liczba oraz rozkład procentowy wyników w obrębie danej grupy wiekowej).

Hist-pat \ Wiek	<30 r.ż.		≥30 r.ż.	
	N	%	n	%
Brak patologii	14	53,9	35	52,2
CIN1/LSIL	4	15,4	15	22,4
CIN2/HSIL	2	7,7	5	7,5
CIN3/HSIL	5	19,2	9	13,4
Rak	1	3,8	3	4,5
Łącznie	26	100	67	100

Tabela 9. Uzyskane wyniki histopatologiczne z podziałem populacji na dwie grupy wiekowe (liczba oraz odsetek pacjentek w określonym wieku w obrębie poszczególnych rozpoznań histopatologicznych).

Hist-pat \ Wiek	<30 r.ż.		≥30 r.ż.		Łącznie	
	n	%	N	%	n	%
Brak patologii	14	28,6	35	71,4	49	100
CIN1/LSIL	4	21,1	15	78,9	19	100
CIN2/HSIL	2	28,6	5	71,4	7	100
CIN3/HSIL	5	35,7	9	64,3	14	100
Rak	1	25,0	3	75,0	4	100

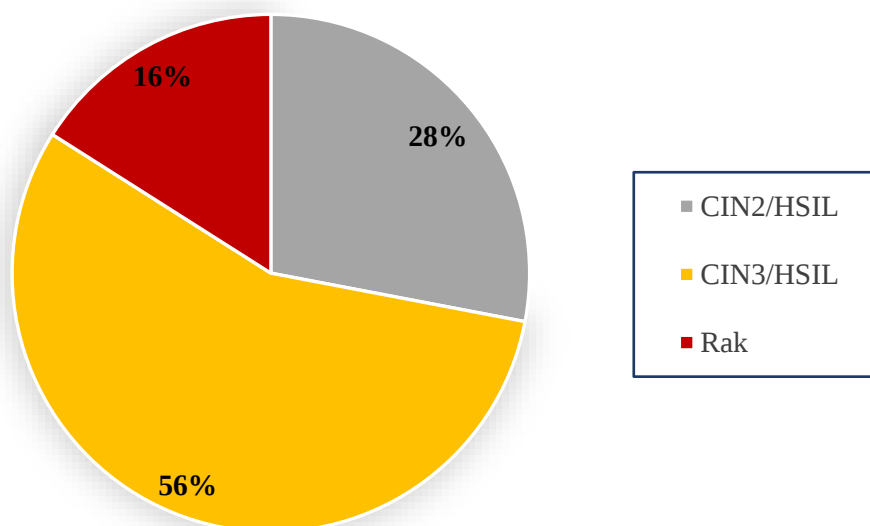
Z grupy badanej wyodrębniono ponadto pacjentki, które uzyskały wyniki histopatologiczne świadczące o istnieniu poważnej patologii szyjki macicy, czyli rzeczywistych stanów przednowotworowych CIN2/HSIL, CIN3/HSIL lub raka szyjki macicy. Na potrzeby pracy opisaną grupę nazywano CIN2+.

W grupie CIN2+ znalazło się 25 kobiet, co stanowiło 26,9 procent całej populacji (25/93). Najczęściej diagnozowano CIN3/HSIL, to jest łącznie 14 przypadków (14/25, 56%) z czego 9 wykryto w subpopulacji kobiet po 30 roku życia, a 5 w grupie poniżej 30 roku życia. Drugim w kolejności rozpoznaniem w grupie CIN2+ było CIN2/HSIL (7/25, 28%). Wykryto też cztery przypadki raka szyjki macicy (4/25, 16%). Rozpoznano 2 raki płaskonabłonkowe i 1 raka gruczołowego u kobiet w wieku odpowiednio 56, 65 i 63 lat oraz zdiagnozowano 1 rzadkiego raka kosmkowo-gruczołowego u młodej 28-letniej pacjentki.

Liczebność i odsetki poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w grupie CIN2+ zaprezentowano w tabeli [10] i na wykresie [7].

Tabela 10. Liczba i procent uzyskanych wyników histopatologicznych w grupie CIN2+.

Wynik histopatologiczny	Liczba (n)	Procent (%)
CIN2/HSIL	7	28
CIN3/HSIL	14	56
Rak	4	16
Łącznie	25	100



Wykres 7. Rozkład procentowy uzyskanych wyników histopatologicznych w grupie CIN2+ (n=25).

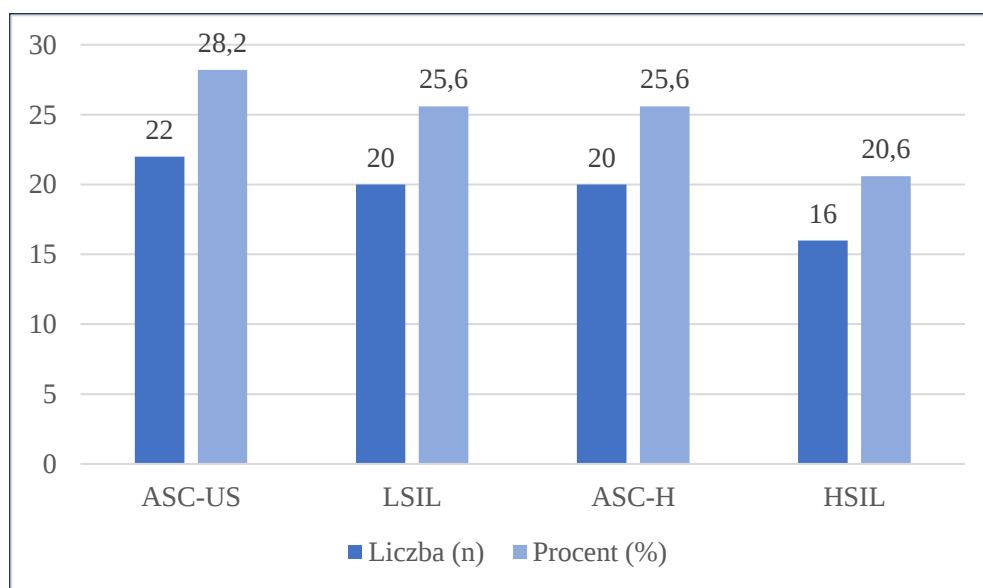
5.2. Wyniki poszczególnych narzędzi skriningowych.

Uczestniczki badania zostały poddane trzem testom przesiewowym w kierunku śródnabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy. Wykorzystano następujące narzędzia skriningowe: cytodiagnostykę (LBC), test immunocytochemiczny (p16/Ki-67) oraz test molekularny (DNA HPV).

5.2.1. Cytodiagnostyka (LBC).

Cytologię na podłożu płynnym wykonano u 90 kobiet. Pozostałe 3 pacjentki, u których brakowało danych dotyczących wyniku cytodiagnostyki, posiadały wyniki zewnętrzne, ale zdecydowano o ich wykluczeniu z analiz z powodu braku wiarygodnej walidacji. Opisane braki danych dotyczyły 3,2 procent całej populacji.

W obrębie populacji wszystkich kobiet włączonych do badania (n=93) stwierdzono 78 przypadków nieprawidłowości cytologicznych, co stanowiło 83,9 procent całości. U 12 kobiet wynik cytologii był prawidłowy określany jako NILM (12,9%), a w 3 przypadkach brakowało odpowiednich danych, co wytłumaczono powyżej. Wśród uzyskanych nieprawidłowych wyników znalazły się takie rozpoznania cytologiczne wg TBS jak ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL [Wykres 8]. W preparatach cytologicznych nie stwierdzono żadnego przypadku AGC lub raka.



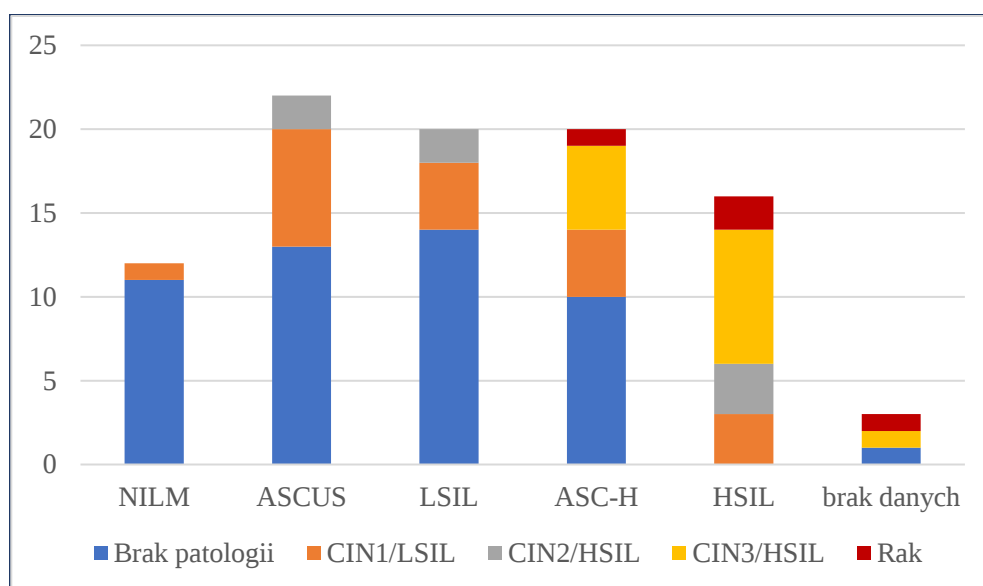
Wykres 8. Nieprawidłowe wyniki cytologii wg TBS (n=78).

W tabeli [11] i na wykresie [9] przedstawiono rezultaty analizy histopatologicznej wycinków szyjki macicy uzyskanych od wszystkich kobiet (n=93) z podziałem według wyników badań przesiewowych przy użyciu metody LBC.

W grupie CIN2+ wszystkie wykonane cytologie oceniono jako nieprawidłowe, a najczęstszym rozpoznaniem cytologicznym był HSIL (13/23; 56,5%), następnie ASC-H (6/23; 26,1%), a znacznie rzadziej LSIL (2/23; 8,7%) i ASC-US (2/23; 8,7%).

Tabela 11. Liczba poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w podgrupach utworzonych na podstawie przesiewowych wyników cytodiagnostyki.

Hist-pat \ LBC	NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	Brak danych	Łącznie
Brak patologii	11	13	14	10	0	1	49
CIN1/LSIL	1	7	4	4	3	0	19
CIN2/HSIL	0	2	2	0	3	0	7
CIN3/HSIL	0	0	0	5	8	1	14
Rak	0	0	0	1	2	1	4
Łącznie	12	22	20	20	16	3	93



Wykres 9. Rozkład uzyskanych wyników histopatologii w podgrupach cytologicznych.

5.2.2. Test DNA HPV.

Wszystkie kobiety zostały przebadane testem molekularnym na obecność DNA HPV. W badanej populacji dodatni wynik testu dla któregośkolwiek z 14 genotypów wirusa brodawczaka ludzkiego uzyskało 68 z 93 kobiet, co daje odsetek wyników dodatnich na poziomie 73,1 procent. Wyniki ujemne stwierdzono u pozostałych 25 z 93 kobiet (26,9%). Na uwagę zasługuje fakt, że u niektórych kobiet wykryto obecność więcej niż jednego wysokoonkogennego genotypu HPV. Najczęściej identyfikowano HPV HR, obecne u 42 z 93 kobiet, następnie HPV 16 (34/93), a najrzadziej HPV 18 (9/93) [Tabela 12].

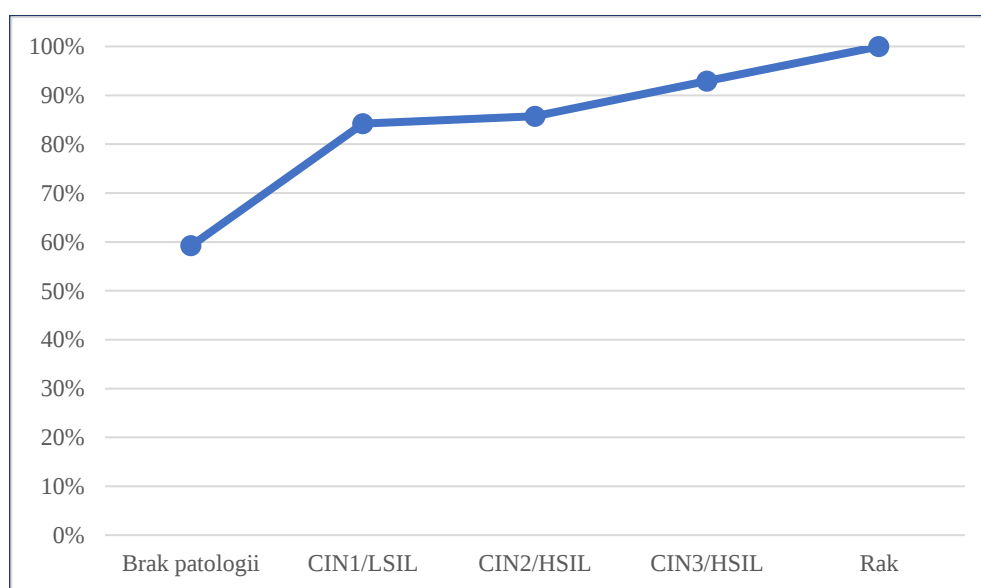
Tabela 12. Genotypy wirusa brodawczaka ludzkiego izolowane w teście molekularnym DNA HPV. Wyodrębniono podgrupy utworzone na podstawie ostatecznego rozpoznania histopatologicznego.

DNA HPV Hist-pat	HPV 16(+)	HPV 18(+)	HPV HR(+)
Brak patologii	11	3	19
CIN1/LSIL	6	2	11
CIN2/HSIL	5	0	2
CIN3/HSIL	10	2	9
Rak	2	2	1
Łącznie	34	9	42

Wraz z nasileniem zmian w badaniu histopatologicznym, zwiększał się udział dodatnich wyników testu DNA HPV [Tabela 13 i Wykres 10] . W grupie pacjentek CIN2+ zakażenie HPV stwierdzono u 92% badanych czyli u 23 z 25 kobiet. We wszystkich 4 przypadkach raków szyjki macicy potwierdzono testem molekularnym obecność DNA HPV.

Tabela 13. Liczba i odsetek poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w podgrupach utworzonych na podstawie przesiewowych wyników testu DNA HPV.

DNA HPV Hist-pat	DODATNI HPV(+)		UJEMNY HPV(-)	
	N	%	N	%
Brak patologii	29	59,2	20	40,8
CIN1/LSIL	16	84,2	3	15,8
CIN2/HSIL	6	85,7	1	14,3
CIN3/HSIL	13	92,9	1	7,1
Rak	4	100	0	0
Łącznie	68		25	



Wykres 10. Odsetek dodatnich wyników testu przesiewowego DNA HPV wraz ze wzrostem zaawansowania zmian histopatologicznych. Wykres obrazuje trend wzrastający.

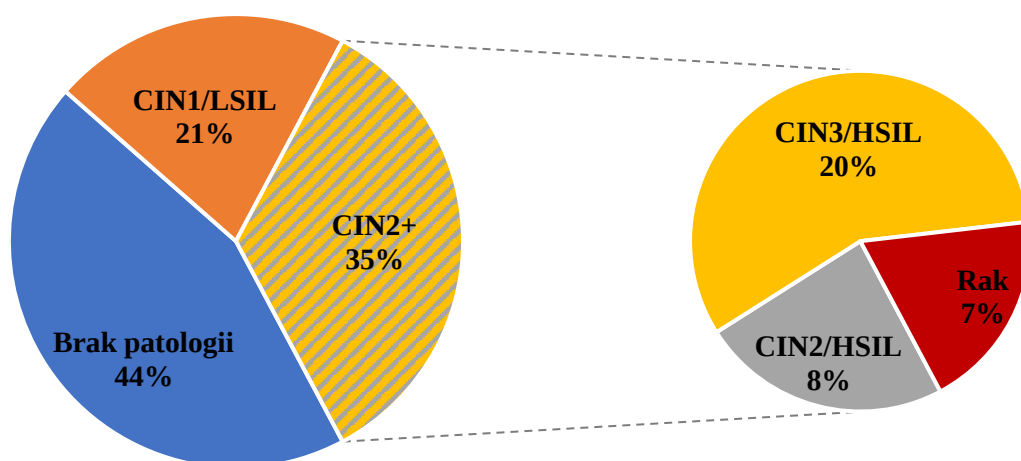
Do oceny korelacji między większą częstością dodatnich wyników testu molekularnego DNA HPV, a wzrastającym stopniem zaawansowania zmian histopatologicznych w biopsji szyjki macicy wykorzystano test chi-kwadrat dla trendu, który potwierdził istnienie takiej zależności z istotnością statystyczną $p=0,002$.

5.2.3. Test p16/Ki-67.

Ocena wartości diagnostycznej testu immunocytochemicznego, identyfikującego w wymazach z szyjki macicy współwystępowanie biomarkerów p16 i Ki-67, to główny cel, który powzięto w niniejszej pracy.

Test CINtec® PLUS wykonano u wszystkich 93 kobiet. Dodatni wynik uzyskało 61 z nich czyli 65,6 procent populacji. Badanie statystycznie częściej dawało wyniki pozytywne u młodszych kobiet. W grupie pacjentek <30 r.ż. test był dodatni u 80,8% z nich (21/26), a u kobiet ≥30 r.ż. dwubarwny odczyn stwierdzono u 59,7% badanych (40/67). Wśród wszystkich 61 pozytywnych wyników immunocytochemii, 21 (34,4%) przypadków odnotowano w młodszej, a 40 (65,6%) w starszej grupie wiekowej, przy czym starsza grupa wiekowa była niemal 2,6-krotnie liczniejsza.

Rozkład poszczególnych wyników biopsji szyjki macicy wśród pacjentek z dodatnim wynikiem immunocytochemii (n=61) przedstawiono na wykresie [11].



Wykres 11. Rozkład procentowy zmian histopatologicznych wśród kobiet z dodatnim odczynem CINtec® PLUS.

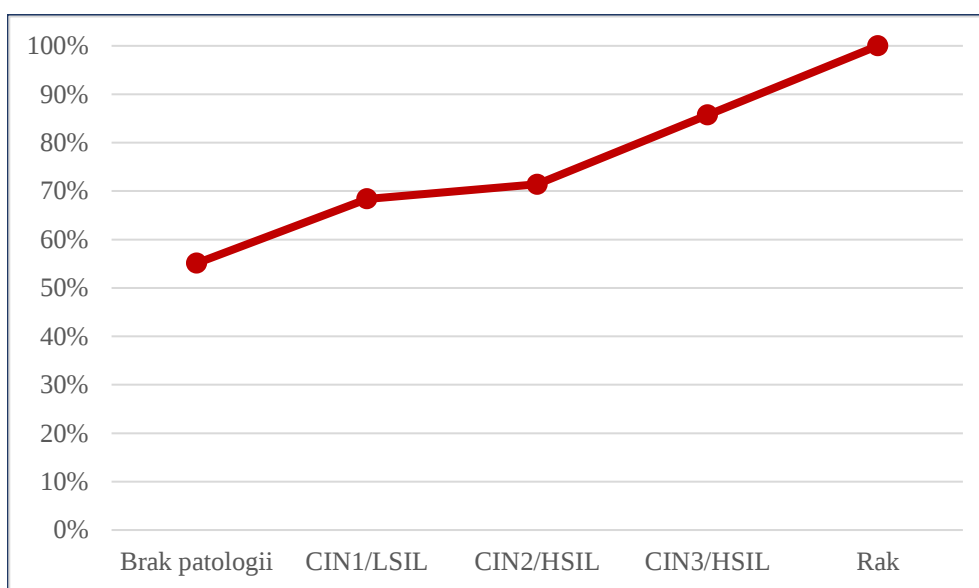
Zaobserwowano wzrastający udział dodatnich wyników testu p16/Ki-67 wraz z wyższym zaawansowaniem zmian histopatologicznych [Tabela 14, Wykres 12 i 13].

W grupie pacjentek CIN2+ (CIN2/HSIL, CIN3/HSIL, rak) dodatni odczyn CINtec® PLUS stwierdzono w 84% preparatów czyli u 21 z 25 kobiet, w tym u wszystkich pacjentek z rozpoznaniem nowotworu złośliwego szyjki macicy. Wśród kobiet bez stwierdzonych zmian patologicznych lub z mniejszymi nieprawidłowościami

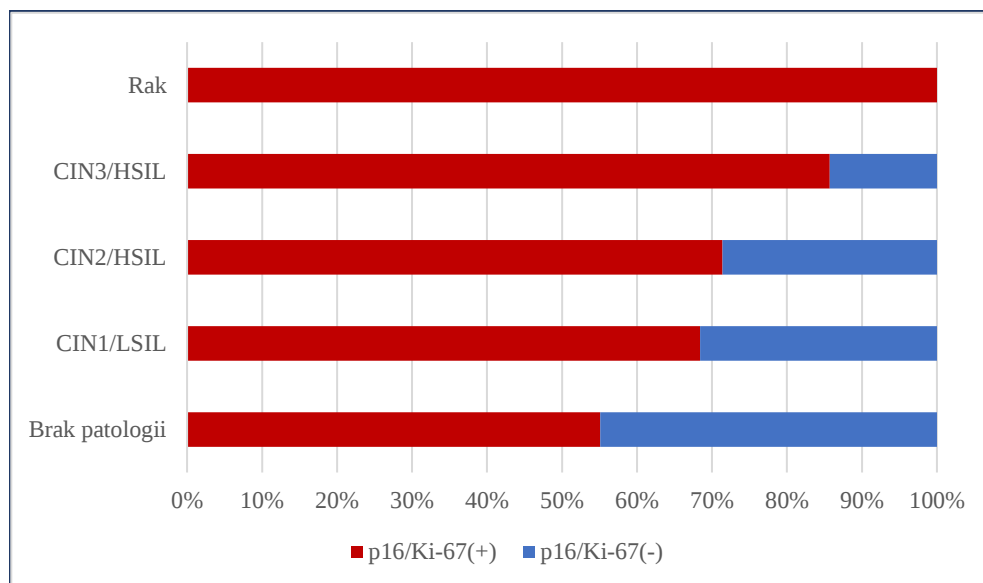
histopatologicznymi (CIN1/LSIL) odsetek dodatnich wyników testu immunocytochemicznego był niższy i wyniósł 58,8% (40/68).

Tabela 14. Liczba i procent poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w podgrupach utworzonych na podstawie wyników przesiewowych badań z użyciem testu p16/Ki-67.

Hist-pat \ p16/Ki-67	DODATNI p16/Ki-67(+)		UJEMNY p16/Ki-67(-)	
	N	%	N	%
Brak patologii	27	55,1	22	44,9
CIN1/LSIL	13	68,4	6	31,6
CIN2/HSIL	5	71,4	2	28,6
CIN3/HSIL	12	85,7	2	14,3
Rak	4	100	0	0
Łącznie	61		32	



Wykres 12. Odsetek dodatnich wyników testu przesiewowego p16/Ki-67 wraz ze wzrostem zaawansowania zmian histopatologicznych. Wykres obrazuje trend wzrastający.



Wykres 13. Udział procentowy dodatnich i ujemnych odczynów CINtec® PLUS w poszczególnych podgrupach histopatologicznych.

Za pomocą testu statystycznego chi-kwadrat dla trendu przeanalizowano zależność między większą częstością wykrywania dodatnich odczynów p16/Ki-67, a wzrastającym stopniem zaawansowania rozpoznawanej patologii szyjki macicy. Potwierdzono taką korelację, uzyskując istotność statystyczną mierzoną wartością $p=0,008$ (poziom istotności $\alpha=0,05$).

Parametry diagnostyczne metody immunocytochemicznej w wykrywaniu zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy obliczono osobno dla wybranych zmiennych.

Dla zmian CIN2+ w obrębie całej populacji ($n=93$), test CINtec® PLUS uzyskał następujące liczby poszczególnych wyników: ogółem 61 wyników pozytywnych, w tym 21 prawdziwie dodatnich oraz 40 fałszywie dodatnich, ogółem 32 wyniki negatywne, w tym 4 fałszywie ujemne oraz 28 prawdziwie ujemnych. Wobec tego wiarygodność diagnostyczna rozpoznań dla zmian CIN2+ została oszacowana następująco: czułość 84,0%, swoistość 41,2%, wartość predykcyjna dodatnia 34,4%, wartość predykcyjna ujemna 87,5%, iloraz wiarygodności wyniku dodatniego 1,43, iloraz wiarygodności wyniku ujemnego 0,39, dokładność testu 52,7%. Wielkość pola pod krzywą ROC (AUC) wyniosła 0,63 ($p=0,064$).

Po zaostreniu kryterium oceny ciężkiej patologii szyjki macicy do zmian CIN3+, dla całej populacji ($n=93$) wyliczono następujące parametry diagnostyczne testu

CINtec® PLUS: SENS 94,4%, SPEC 41,3%, PPV 27,9%, NPV 96,9%, LR(+)1,61, LR(-)0,13, ACC 51,6%. W analizie krzywej ROC wyliczono AUC równe 0,68 (z istotnością statystyczną $p=0,019$).

W tabeli [15] przedstawiono natomiast porównanie parametrów wiarygodności diagnostycznej testu p16/Ki-67 w wykrywaniu CIN2+ w zależności od wieku badanych pacjentek, osobno dla kobiet przed i po osiągnięciu 30 roku życia. Czulość metody była wyższa w młodszej grupie wiekowej, a swoistość i dokładność u kobiet po ukończeniu 30 roku życia.

Tabela 15. Wartość diagnostyczna testu p16/Ki-67 w wykrywaniu zmian CIN2+/HSIL w zależności od wieku badanych kobiet.

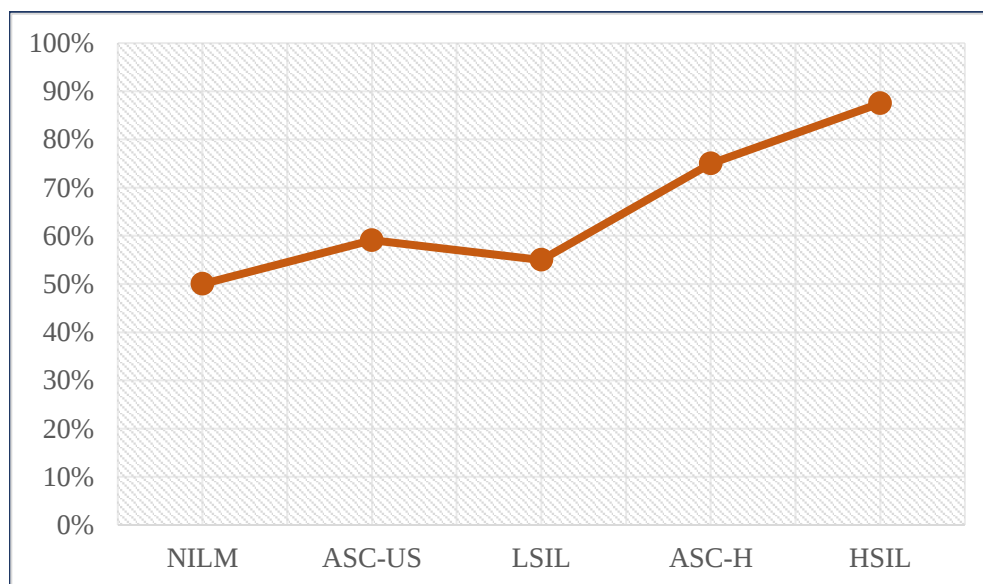
Parametr testu	Grupa wiekowa	
	<30r.ż.	≥30r.ż.
SENS %	100	76,4
SPEC %	27,8	46,0
PPV %	38,1	32,5
NPV %	100	85,2
LR+	1,38	1,42
LR-	0	0,51
ACC %	50,0	53,7

5.3. Analiza korelacji dodatnich wyników testu p16/Ki-67 z nieprawidłową cytologią oraz obecnością DNA HPV.

Wraz ze wzrastającymi nieprawidłowościami cytoonkologicznymi w LBC, obserwuje się częstsze występowanie dodatniego odczynu CINtec® PLUS. Podczas gdy dla wyników prawidłowych cytologii czyli NILM, test immunocytochemiczny był dodatni tylko w 50 procentach przypadków, to udział ten stopniowo rósł, osiągając aż 87,5 procent dodatnich wyników p16/Ki-67 u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym HSIL [Tabela 16, Wykres 14].

Tabela 16. Dodatnie odczyny CINtec® PLUS stwierdzane w poszczególnych podgrupach cytologicznych.

LBC p16/Ki-67(+)	NILM (n=12)	ASC-US (n=22)	LSIL (n=20)	ASC-H (n=20)	HSIL (n=16)	Brak danych (n=3)	Łącznie (n=93)
Liczba (n)	6	13	11	15	14	2	61
Procent (%)	50,0	59,1	55,0	75,0	87,5	66,7	65,6



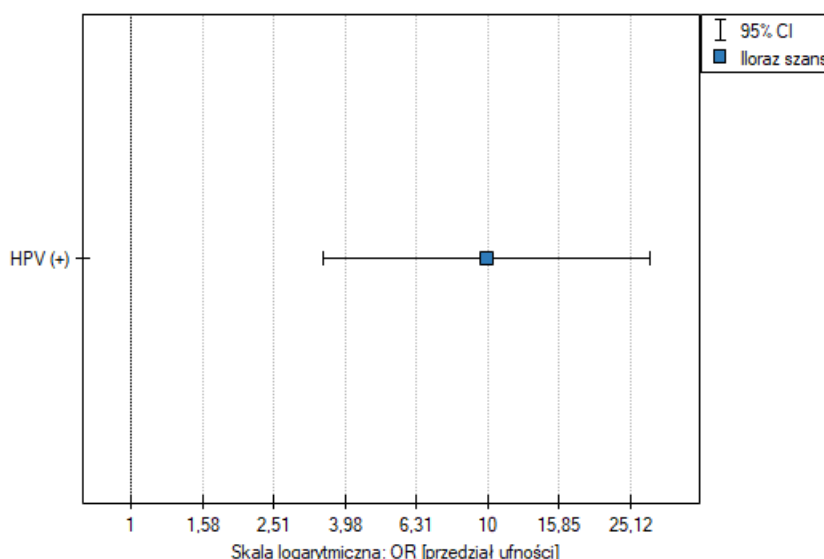
Wykres 14. Wzrastający stopień nasilenia dodatnich odczynów CINtec® PLUS wraz z rosnącymi nieprawidłowościami cytoonkologicznymi w LBC.

Podobnie stwierdza się częstsze współwystępowanie dodatnich wyników immunocytochemii i testu molekularnego [Tabela 17].

Tabela 17. Dodatnie odczyny CINtec® PLUS w zależności od statusu HPV w teście molekularnym identyfikującym DNA wirusa brodawczaka ludzkiego.

DNA HPV p16/Ki-67(+)	Dowolny HPV(+) (n=68)	Wszystkie HPV(-) (n=25)	Łącznie (n=93)
OGÓŁEM:			
Liczba (n)	54	7	61
Procent (%)	79,4	28,0	65,6
DLA HIST-PAT:			
Brak patologii	21/29	6/20	27/49
CIN1/LSIL	13/16	0/3	13/19
CIN2/HSIL	5/6	0/1	5/7
CIN3/HSIL	11/13	1/1	12/14
Rak	4/4	0/0	4/4

W celu wykazania korelacji dodatnich wyników testu CINtec® PLUS i testu molekularnego DNA HPV obliczono iloraz szans na wystąpienie jednocześnie obu zdarzeń. Szansa na to, że pacjentka z dodatnim wynikiem immunocytochemii będzie miała także dodatni wynik testu molekularnego jest 9,9 razy większa niż na to, że wynik testu DNA HPV u takiej pacjentki będzie ujemny. Jest to istotne statystycznie ($p < 0,0001$) [Wykres 15].



Wykres 15. Iloraz szans (OR) na wystąpienie jednocześnie dodatnich wyników obu testów czyli p16/Ki-67(+) oraz DNA HPV(+). OR=9,92 (95% CI 3,46-28,41).

5.4. Porównanie wartości diagnostycznej poszczególnych badań przesiewowych.

Na podstawie zgromadzonych danych, oceniono wartość diagnostyczną i użyteczność kliniczną różnych narzędzi skriningowych w badaniach przesiewowych w kierunku HSIL i raka szyjki macicy. Porównano następujące metody diagnostyczne: cytodiagnostykę (LBC), test immunocytochemiczny (p16/Ki-67), test molekularny (DNA HPV), a także połączenie testu immunocytochemicznego z cytologią oraz testu immunocytochemicznego z testem wirusowym DNA HPV.

Dzięki skonstruowanym tabelom kontyngencji, uzyskano wiedzę na temat liczności wyników prawdziwie dodatnich, fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych oraz prawdziwie ujemnych, otrzymywanych przy zastosowaniu poszczególnych metod diagnostycznych.

Następnie wszystkie opisane narzędzia diagnostyczne scharakteryzowano za pomocą parametrów: czułości, swoistości, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej, wskaźników wiarygodności wyniku dodatniego i ujemnego oraz dokładności.

Powyższych analiz dokonano osobno dla wybranych cech charakteryzujących badaną populację.

5.4.1. Ocena testów przesiewowych w wykrywaniu rzeczywistych patologii szyjki macicy dla zmian CIN2+.

W tabelach [18] i [19] zaprezentowano porównanie parametrów diagnostycznych pięciu modeli badań przesiewowych w wykrywaniu zmian CIN2+ (CIN2/HSIL, CIN3/HSIL, rak) dla całej populacji uczestniczącej w badaniu (n=93).

Tabela 18. Wyniki badań przesiewowych dla zmian histopatologicznych CIN2+.

Test diagn. Wyniki	CYTOLOGIA (wyniki dodatnie to: ASC-H, HSIL)	DNA HPV	p16/Ki-67	Połączenie testów: p16/Ki-67 i cytologia	Połączenie testów: p16/Ki-67 i DNA HPV
TP	23	23	21	25	24
FP	55	45	40	61	51
FN	0	2	4	0	1
TN	12	23	28	7	17
Łącznie	90	93	93	93	93

Tabela 19. Ocena wartości diagnostycznej poszczególnych narzędzi skriningowych w wykrywaniu CIN2+ (biopsja jako wartość referencyjna).

Test diagn. Parametr testu	CYTOLOGIA (wyniki dodatnie to: ASC-H, HSIL)	DNA HPV	p16/Ki-67	Połączenie testów: p16/Ki-67 i cytologia	Połączenie testów: p16/Ki-67 i DNA HPV
Czułość (SENS) % (95% CI)	100 (85,1-100)	92,0 (74,0-99,0)	84,0 (63,9-95,5)	100 (86,3-100)	96,0 (79,6-99,9)
Swoistość (SPEC) % (95% CI)	17,9 (9,6-29,2)	33,8 (22,8-46,3)	41,2 (29,4-53,8)	10,3 (4,2-20,1)	25,0 (15,3-37,0)
Wartości predykcyjne dodatnie (PPV) % (95% CI)	29,5 (19,7-40,9)	33,8 (22,8-46,3)	34,4 (22,7-47,7)	29,1 (19,8-39,9)	32,0 (21,7-43,8)
Wartości predykcyjne ujemne (NPV) % (95% CI)	100 (73,5-100)	92,0 (74,0-99,0)	87,5 (71,0-96,5)	100 (59,0-100)	94,4 (72,7-99,9)
Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (LR+)	1,22	1,39	1,43	1,11	1,28
Iloraz wiarygodności wyniku ujemnego (LR-)	0	0,24	0,39	0	0,16
Dokładność (ACC) % (95% CI)	38,9 (28,8-49,7)	49,5 (38,9-60,0)	52,7 (42,1-63,1)	34,4 (24,9-45,0)	44,1 (33,8-54,8)

W diagnostyce śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy, dla zaawansowania zmian co najmniej w stopniu umiarkowanym (CIN2+), wszystkie użyte testy przesiewowe charakteryzowały się wysoką czułością, dlatego były użyteczne jako pierwszorazowe narzędzia skriningowe.

Wśród pojedynczych testów czułość na poziomie 100% osiągnęła cytodiagnostyka. Ujemna wartość predykcyjna cytologii wyniosła również 100%. Wobec tego kobieta uzyskując wynik wymazu cytologicznego wolny od dużych nieprawidłowości cytoonkologicznych takich jak ASC-H lub HSIL, mogła być w 100% pewna, że nie ma zaawansowanej choroby szyjki macicy typu CIN2+.

Spośród badanych metod najslabszą czułość rzędu 84% uzyskał test immunocytochemiczny. W tym przypadku NPV wyniosła 87,5%, zatem tylko w takim odsetku ujemny wynik p16/Ki-67 dawał pewność o braku rzeczywistej patologii CIN2+. W analizowanej populacji test immunocytochemiczny pomylił się z diagnozą

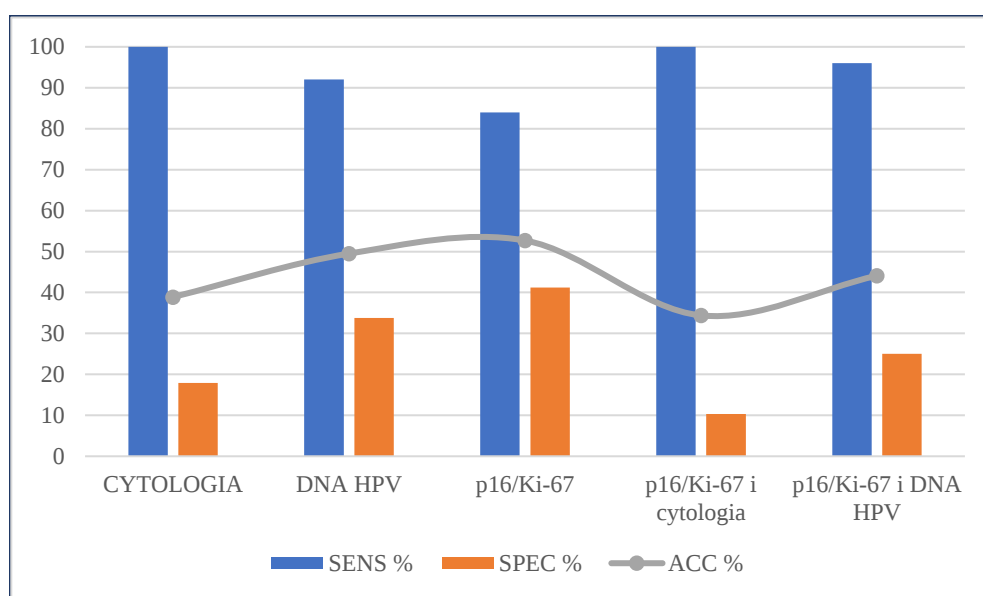
czterokrotnie, to znaczy u czterech kobiet preparat oceniono na negatywny dla koekspresji p16/Ki-67, podczas gdy pacjentki w rzeczywistości cierpiały na co najmniej umiarkowanego stopnia śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy. Wszystkie te chore należały do grupy wiekowej ≥ 30 r.ż.

Wszystkie metody charakteryzowały się niskimi parametrami swoistości, wobec czego generowały dużą liczbę wyników fałszywie dodatnich. Konsekwencją niskiej swoistości testów przesiewowych jest niepotrzebne narażenie kobiet na stres związany z koniecznością weryfikacji wyników na etapie diagnostyki pogłębionej. Oznacza to również dużą liczbę niepotrzebnie wykonywanych kolposkopii, co istotnie zwiększa koszt prowadzonych badań przesiewowych.

Najwyższą swoistością wynoszącą 41,2% cechował się test p16/Ki-67, a najniższą cytodiagnostyka (17,9%) oraz połączenie immunocytochemii i cytodiagnostyki (10,3%).

Test immunocytochemiczny uzyskał najwyższy wynik w ocenie dokładności (52,7%), w związku z czym dawał największe prawdopodobieństwo poprawnej diagnozy.

Porównanie czułości, swoistości i dokładności wszystkich metod diagnostycznych przedstawiono na wykresie [16].



Wykres 16. Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności testów wykorzystanych w badaniach przesiewowych dla zmian CIN2+.

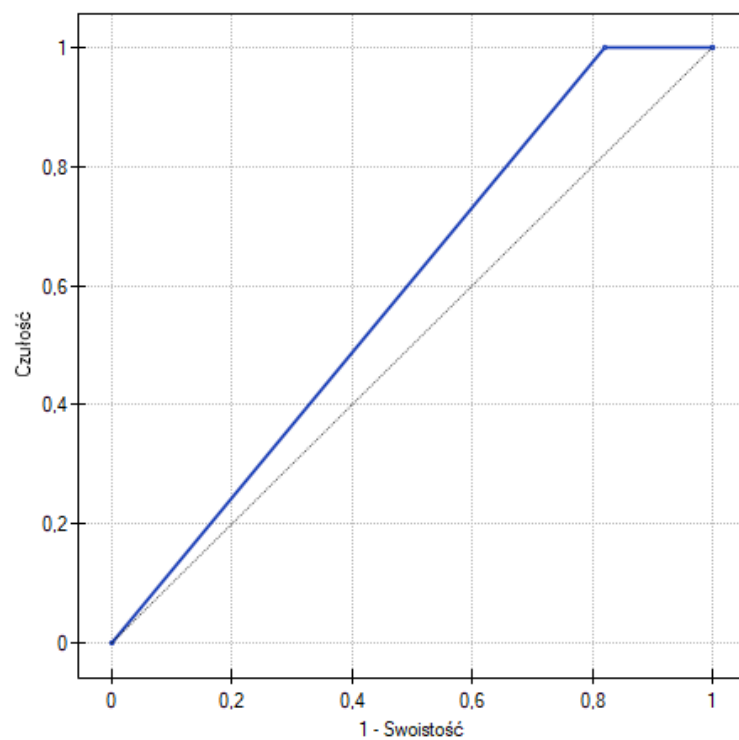
Na podstawie przeprowadzonych obliczeń stwierdzono, że zastosowanie na pierwszym etapie skriningu połączenia dwóch metod diagnostycznych, czyli użycie testu immunocytochemicznego łącznie z cytologią lub testem DNA HPV, nie przynosi

oczekiwanych korzyści. Dodanie testu p16/Ki-67 do cytologii nie zwiększyło już i tak maksymalnej czułości metody, a obniżyło jej swoistość i dokładność. Połączenie testu p16/Ki-67 z testem DNA HPV podniosło czułość wykrywania CIN2+, ale spowodowało istotne pogorszenie parametrów swoistości i dokładności.

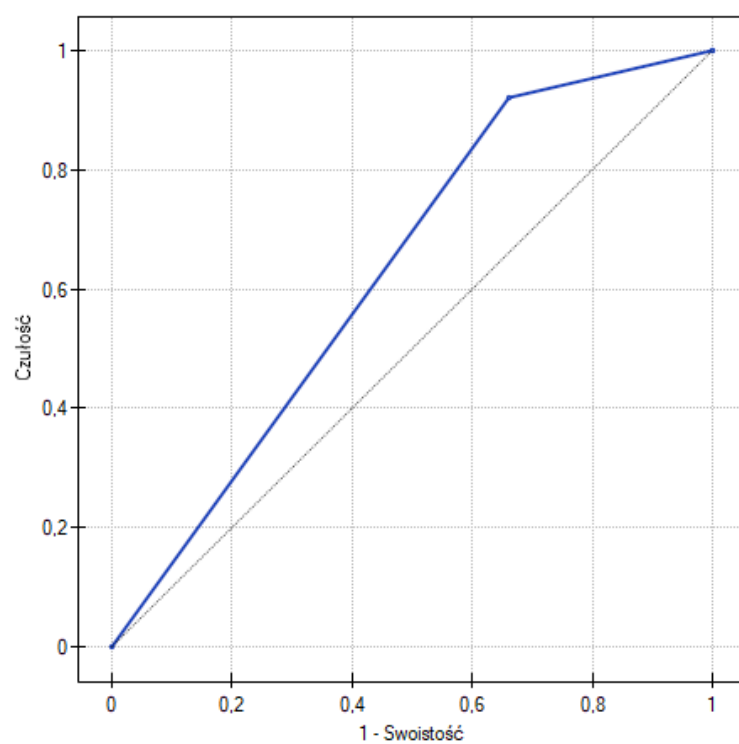
Do oceny jakości poszczególnych testów w wykrywaniu zmian CIN2+ wykreślono krzywe ROC oraz obliczono wartości pola pod krzywą (AUC) [Tabela 20, Wykresy 17, 18 i 19].

Tabela 20. Statystyka opisowa krzywych ROC modeli diagnostycznych w wykrywaniu zmian CIN2+.

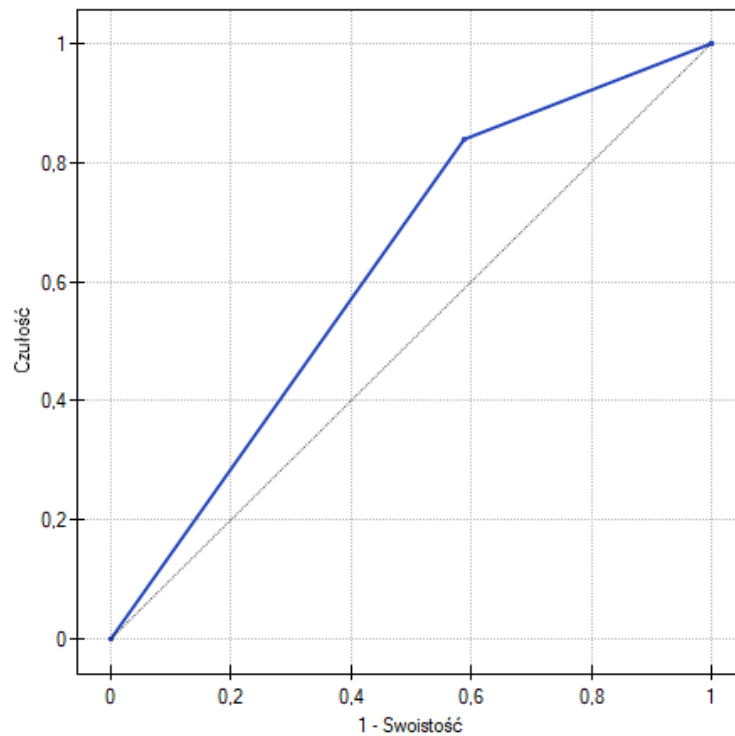
Test diagn. Parametr testu	CYTOLOGIA (wyniki dodatnie to: ASC-H, HSIL)	DNA HPV	p16/Ki-67	Połączenie testów: p16/Ki-67 i cytologia	Połączenie testów: p16/Ki-67 i DNA HPV
SENS %	100	92,0	84,0	100	96,0
SPEC %	17,9	33,8	41,2	10,3	25,0
AUC	0,590	0,629	0,626	0,551	0,605
SE(AUC)	0,024	0,040	0,048	0,019	0,033
-95% CI	0,543	0,551	0,532	0,515	0,540
+95% CI	0,636	0,708	0,720	0,588	0,670
Wartość p dwustronne	0,202	0,057	0,064	0,448	0,122
Poziom istotności	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05



Wykres 17. Krzywa ROC dla cytologii. $AUC = 0,59$ (95% CI 0,54-0,66).



Wykres 18. Krzywa ROC dla testu DNA HPV. $AUC = 0,63$ (95% CI 0,55-0,71).



Wykres 19. Krzywa ROC dla testu p16/Ki-67. AUC = 0,63 (95% CI 0,53-0,72).

5.4.2. Ocena testów przesiewowych w wykrywaniu rzeczywistych patologii szyjki macicy dla zmian CIN3+.

W kolejnej analizie podniesiono wartość progu odcięcia nieprawidłowych wyników histopatologicznych do zmian CIN3+ (CIN3/HSIL, rak) i ponownie porównano wartość diagnostyczną pięciu wybranych modeli badań przesiewowych [Tabela 21].

W wykrywaniu zmian CIN3+, wszystkie testy charakteryzowały się bardzo wysoką czułością, to jest 100% dla cytodiagnostyki i obu testów połączonych oraz 94,4% dla testów DNA HPV i p16/Ki-67.

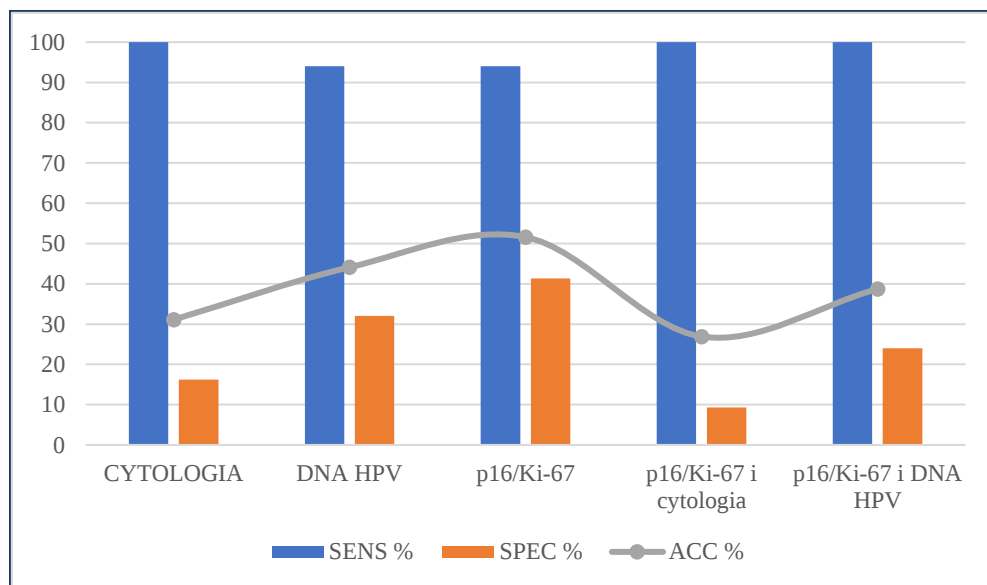
Jednocześnie wszystkie metody miały niedostateczną swoistość, najwyższą dla samodzielnego testu p16/Ki-67 (41,3%), a najniższą dla połączenia LBC i p16/Ki-67 (9,3%).

Największe prawdopodobieństwo uzyskania poprawnej diagnozy w odniesieniu do zmian CIN3+ uzyskano dzięki immunocytochemii, której dokładność sięgała 51,6%.

Tabela 21. Ocena wartości diagnostycznej poszczególnych narzędzi skriningowych w wykrywaniu CIN3+ (biopsja jako wartość referencyjna).

Test diagn. Parametr testu	CYTOLOGIA (wyniki dodatnie to: ASC-H, HSIL)	DNA HPV	p16/Ki-67	Połączenie testów: p16/Ki-67 i cytologia	Połączenie testów: p16/Ki-67 i DNA HPV
Czułość (SENS) % (95% CI)	100 (79,4-100)	94,4 (72,7-99,9)	94,4 (72,7-99,9)	100 (81,5-100)	100 (81,5-100)
Swoistość (SPEC) % (95% CI)	16,2 (8,7-26,6)	32,0 (21,7-43,8)	41,3 (30,1-53,3)	9,3 (3,8-18,3)	24,0 (14,9-35,3)
Wartości predykcyjne dodatnie (PPV) % (95% CI)	20,5 (12,2-31,2)	25,0 (15,3-37,0)	27,9 (17,1-40,8)	20,9 (12,9-31,0)	24,0 (14,9-35,3)
Wartości predykcyjne ujemne (NPV) % (95% CI)	100 (73,5-100)	96,0 (79,6-99,9)	96,9 (83,8-99,9)	100 (59,0-100)	100 (81,5-100)
Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (LR+)	1,19	1,39	1,61	1,10	1,32
Iloraz wiarygodności wyniku ujemnego (LR-)	0	0,17	0,13	0	0
Dokładność (ACC) % (95% CI)	31,1 (21,8-41,7)	44,1 (33,8-54,8)	51,6 (41,0-62,1)	26,9 (18,2-37,1)	38,7 (28,8-49,4)

Na wykresie [20] porównano czułości, swoistości i dokładności wszystkich narzędzi diagnostycznych w wykrywaniu zaawansowanych zmian przednowotworowych CIN3/HSIL i raka szyjki macicy.

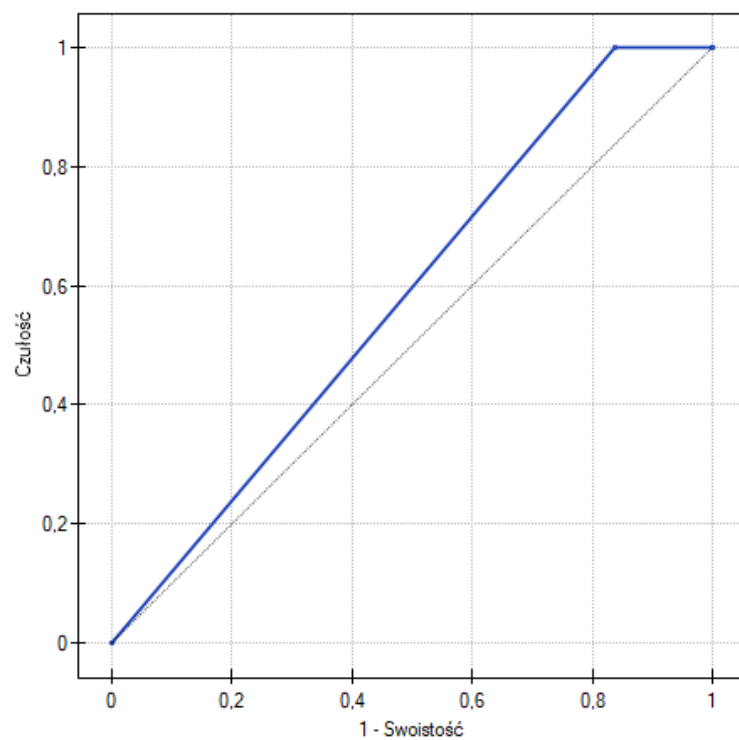


Wykres 20. Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności testów wykorzystanych w badaniach przesiewowych dla zmian CIN3+.

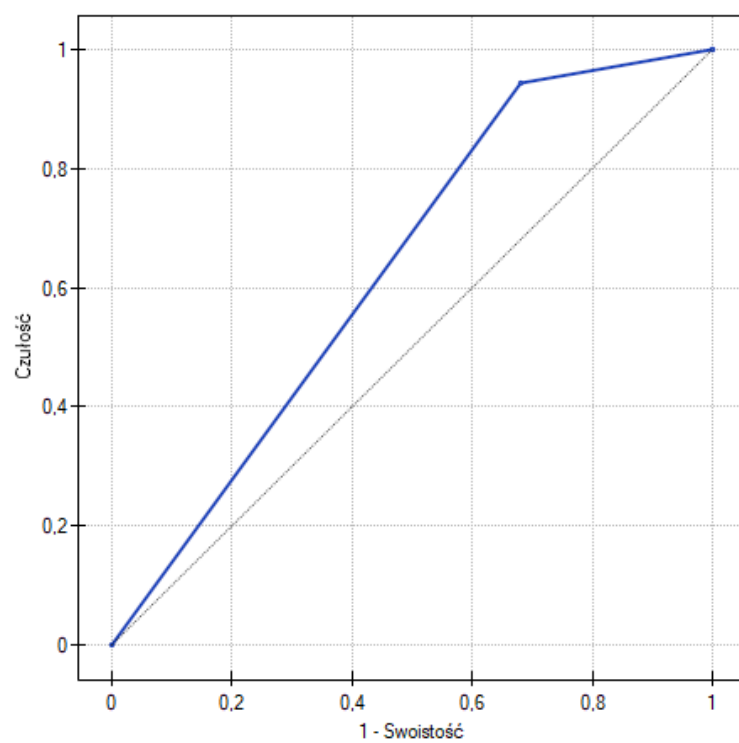
Jakość wykrywania CIN3+ za pomocą wybranego testu przedstawiono na wykresach krzywych ROC oraz obliczając wartości pola pod krzywą (AUC) [Tabela 22, Wykresy 21, 22 i 23].

Tabela 22. Statystyka opisowa krzywych ROC modeli diagnostycznych w wykrywaniu zmian CIN3+.

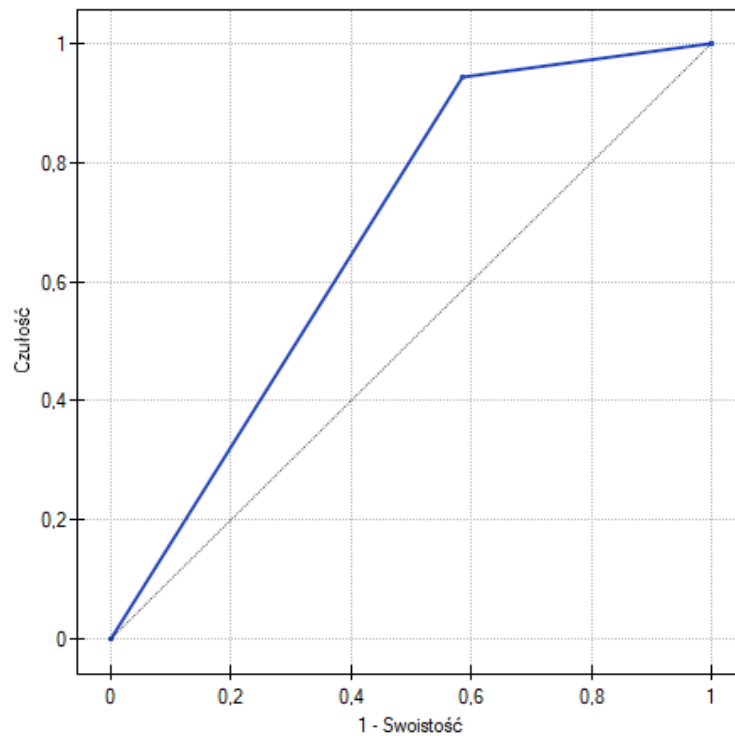
Test diagn. Parametr testu	CYTOLOGIA (wyniki dodatnie to: ASC-H, HSIL)	DNA HPV	p16/Ki-67	Połączenie testów: p16/Ki-67 i cytologia	Połączenie testów: p16/Ki-67 i DNA HPV
SENS %	100	94,4	94,4	100	100
SPEC %	16,2	32,0	41,3	9,3	24,0
AUC	0,581	0,632	0,679	0,547	0,620
SE(AUC)	0,022	0,039	0,040	0,017	0,025
-95% CI	0,539	0,556	0,601	0,514	0,571
+95% CI	0,623	0,708	0,757	0,580	0,669
Wartość p dwustronne	0,311	0,083	0,019	0,540	0,115
Poziom istotności	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05



Wykres 21. Krzywa ROC dla cytologii. $AUC = 0,58$ (95% CI 0,54-0,62).



Wykres 22. Krzywa ROC dla testu DNA HPV. $AUC = 0,63$ (95% CI 0,56-0,71).



Wykres 23. Krzywa ROC dla testu p16/Ki-67.

$AUC = 0,68$ (95% CI 0,60-0,76); $p=0,019$.

5.4.3. Porównanie wartości diagnostycznej testów skriningowych w poszczególnych grupach wiekowych.

Obliczono wiarygodność statystyczną poszczególnych metod diagnostycznych w wykrywaniu CIN2+, osobno dla kobiet w wieku poniżej 30 roku życia oraz po ukończeniu 30 roku życia. Wyniki zaprezentowano w tabeli [23].

W grupie młodszych kobiet, przed ukończeniem 30 roku życia wszystkie testy osiągnęły czułość 100%, czyli poprawnie identyfikowały stany patologiczne szyjki macicy o typie CIN2+. Wszystkie testy miały wartości predykcyjne ujemne równe 100%. W zestawieniu pozostałych parametrów najkorzystniej wypadł test wirusowy ze swoistością 33,3% i dokładnością 53,8%, a tuż za nim test immunocytochemiczny ze swoistością 27,8% i dokładnością 50,0%.

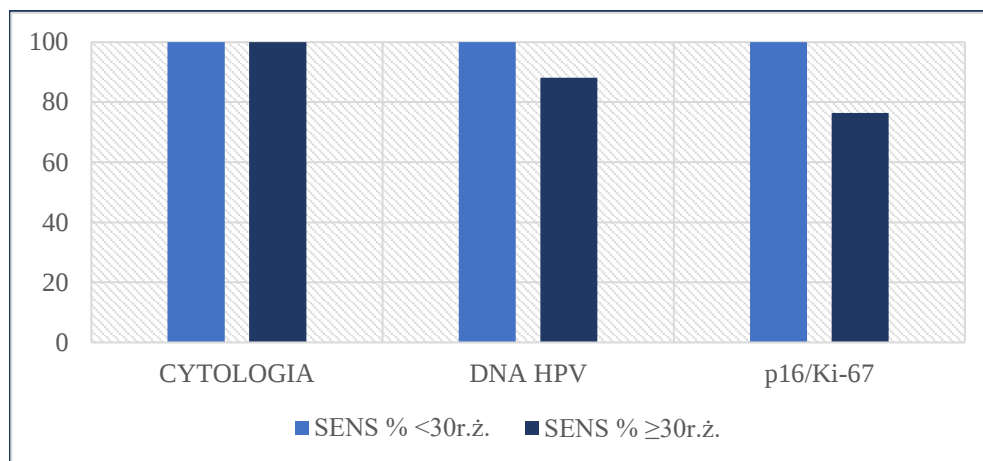
U kobiet w wieku powyżej 30 lat spośród pojedynczych metod diagnostycznych najmniej dokładna okazała się cytologia (ACC=36,9%), która mimo 100-procentowej czułości, miała bardzo niską swoistość 16,3%. Dla kontrastu najbardziej dokładny test immunocytochemiczny (ACC=53,7%), mimo najniższej czułości na poziomie 76,5%, uzyskał dobre parametry swoistości 46,0%. Należy jednak zauważyć, że test p16/Ki-67

dawał najwięcej wyników fałszywie ujemnych, czyli nie wykrył aż 4 przypadków choroby, narażając kobiety na brak lub opóźnienie diagnozy i potencjalnie gorsze wyniki leczenia.

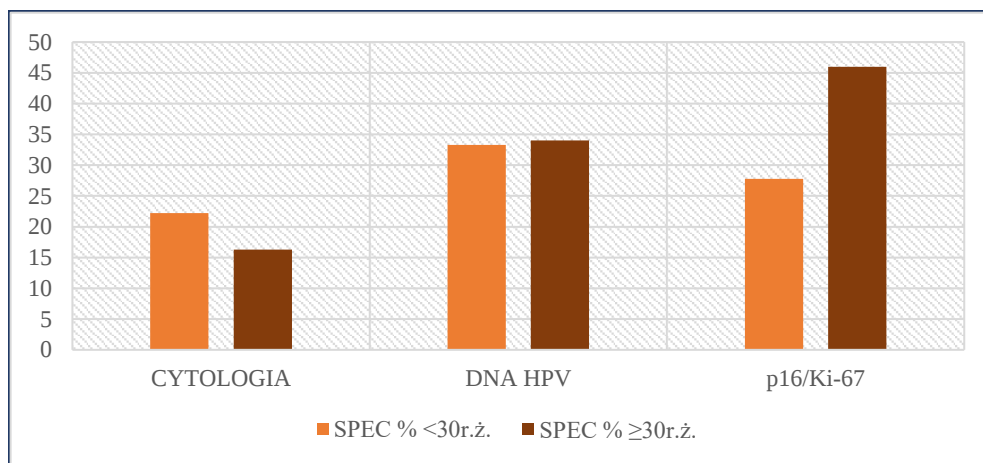
Tabela 23. Porównanie wartości diagnostycznej badań przesiewowych prowadzonych w grupach kobiet <30r.ż. i ≥30r.ż. (biopsja CIN2+ jako wartość referencyjna).

Test diagn. Parametr testu		CYTOLOGIA (wyniki dodatnie to: ASC-H, HSIL)	DNA HPV	p16/Ki-67	Połączenie testów: p16/Ki-67 i cytologia	Połączenie testów: p16/Ki-67 i DNA HPV
SENS %	<30r.ż.	100	100	100	100	100
	≥30r.ż.	100	88,2	76,4	100	94,1
SPEC %	<30r.ż.	22,2	33,3	27,8	5,6	11,1
	≥30r.ż.	16,3	34,0	46,0	12,0	30,0
PPV %	<30r.ż.	33,3	40,0	38,1	32,0	33,3
	≥30r.ż.	28,1	31,3	32,5	27,9	31,4
NPV %	<30r.ż.	100	100	100	100	100
	≥30r.ż.	100	89,5	85,2	100	93,8
LR+	<30r.ż.	1,29	1,50	1,38	1,06	1,13
	≥30r.ż.	1,20	1,34	1,42	1,14	1,34
LR-	<30r.ż.	0	0	0	0	0
	≥30r.ż.	0	0,35	0,51	0	0,20
ACC %	<30r.ż.	44,0	53,8	50,0	34,6	38,5
	≥30r.ż.	36,9	47,8	53,7	34,3	46,3

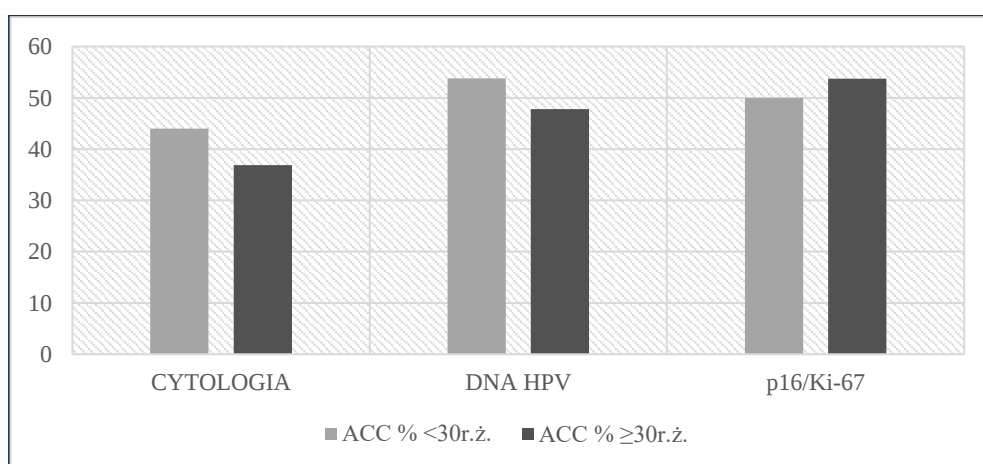
Na wykresach [24, 25 i 26] przedstawiono porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności pojedynczych narzędzi skriningowych w zależności od wieku pacjentek. Po osiągnięciu 30 roku życia obserwowano, najsilniej wyrażony dla testu p16/Ki-67, spadek wartości współczynnika czułości oraz wzrost wartości współczynnika swoistości.



Wykres 24. Porównanie czułości testów diagnostycznych w dwóch grupach wiekowych.



Wykres 25. Porównanie swoistości testów diagnostycznych w dwóch grupach wiekowych.



Wykres 26. Porównanie dokładności testów diagnostycznych w dwóch grupach wiekowych.

5.5. Ocena wartości diagnostycznej testu CINtec® PLUS jako narzędzia uzupełniającego diagnostykę pierwszorzętową.

Badano użyteczność testu immunocytochemicznego jako narzędzia doprecyzowującego wskazania do diagnostyki pogłębionej czyli kolposkopii w przypadku niejednoznacznych wyników badań przesiewowych.

W przypadku modelu skriningowego opierającego się na pierwotnej cytodiagnostyce, do wyników niejednoznacznych zaliczamy ASC-US i LSIL. W grupie 93 kobiet uczestniczących w badaniu wynik cytologii ASC-US uzyskało 23,7% kobiet (22/93) a LSIL 21,5% kobiet (20/93). W tej grupie (n=42) wykryto 4 przypadki poważnych nieprawidłowości histopatologicznych w biopsji szyjki macicy, wszystkie o typie CIN2/HSIL, a żadnego CIN3/HSIL i raka. W grupie kobiet z prawidłowym wynikiem cytologii NILM (n=12) nie stwierdzono żadnego przypadku CIN2+.

W przypadku diagnostyki molekularnej za jednoznaczne wskazania do kolposkopii uznaje się stwierdzenie obecności genotypów HPV16 i/lub HPV18, natomiast w razie wykrycia pozostałych 12 typów wysokoonkogennych, taki wynik jest traktowany jako niejednoznaczny. W badanym materiale odsetek wyników niejednoznacznych testu molekularnego wyniósł zatem 30,1% (28/93).

Wykazano, że zastosowanie dodatkowego narzędzia diagnostycznego pod postacią testu immunocytochemicznego, spowodowało wzrost zdolności wykrywczej metody LBC w przypadku niejednoznacznych rozpoznań cytologicznych [Tabela 24]. Jeżeli cytologia ASC-US i LSIL sama w sobie nie była rozstrzygająca, to dołożenie testu CINtec® PLUS pozwoliło wykryć w tej podgrupie cytologicznej (n=42) aż 50% pacjentek z CIN2+, które w przeciwnym wypadku uzyskałyby wyniki fałszywie ujemne.

Jeszcze wyraźniejszy efekt zaobserwowano w przypadku wykorzystania testu immunocytochemicznego do doprecyzowania wskazań do diagnostyki pogłębionej w przypadku wykrycia obecności DNA HPV HR (nie-16/nie-18) [Tabela 25].

W obu przypadkach uzupełnienie testu przesiewowego testem immunocytochemicznym w roli narzędzia drugorzutowego, spowodowało niestety obniżenie swoistości. W związku z tym duża liczba pacjentek uzyskała wyniki fałszywie dodatnie, co skutkowało skierowaniem ich na nieuzasadnione badanie kolposkopowe i zwiększeniem kosztochłonności skriningu.

Tabela 24. Porównanie zdolności wykrywczych samej cytodiagnostyki do cytodiagnostyki uzupełnionej oceną immunocytochemiczną w sytuacji wyników niejednoznacznych (ASC-US i LSIL).

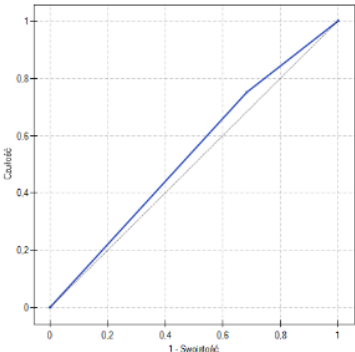
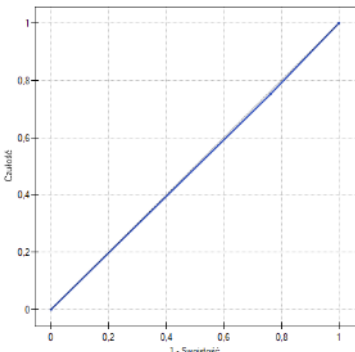
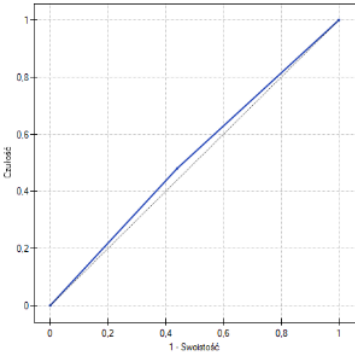
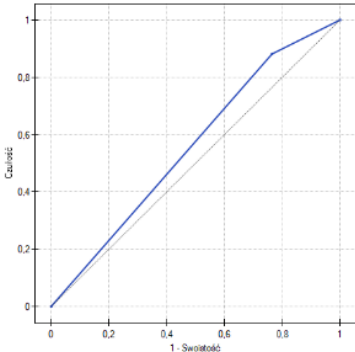
LBC ASC-US i LSIL (n=42)	LBC	LBC + CINtec® PLUS	
SENS % (95% CI)	25,0 (5,6-80,6)	50,0 (6,8-93,2)	↑
SPEC % (95% CI)	47,4 (31,0-64,2)	42,1 (26,3-59,2)	↓
AUC	0,533	0,493	↓
Wartość p	0,830	0,966	
Krzywa ROC			

Tabela 25. Porównanie zdolności wykrywczych testu DNA HPV do testu molekularnego uzupełnionego oceną immunocytochemiczną w sytuacji wyników niejednoznacznych (HPV HR pozytywny dla genotypów innych niż 16 i/lub 18).

HPV HR (nie-16/18) (n=28)	DNA HPV	DNA HPV + CINtec® PLUS	
SENS % (95% CI)	48,0 (27,8-68,7)	88,0 (68,8-97,5)	↑
SPEC % (95% CI)	55,9 (43,3-67,9)	23,5 (14,1-35,4)	↓
AUC	0,519	0,558	↑
Wartość p	0,775	0,396	
Krzywa ROC			

6. Dyskusja.

Ostatnie 15 lat było czasem przebudowy dotychczasowej struktury skriningu cytologicznego w procesie profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy. Znajomość biologii wirusa brodawczaka ludzkiego i wiedza o jego roli jako podstawowego czynnika ryzyka rozwoju nowotworu, wymusiła te zmiany. Obserwuje się stopniowe odchodzenie od cytodiagnostyki, traktowanej jako narzędzie skriningu pierwotnego, na rzecz innych metod diagnostycznych. Aktualnie uważa się, że pierwszorazowym testem przesiewowym powinno być badanie molekularne na obecność DNA HPV HR.

Zarówno nieprawidłowy cytoonkologicznie wynik oceny rozmazu cytologicznego, jak i pozytywny test molekularny identyfikujący DNA HPV HR, wymagają pogłębionej diagnostyki w kolposkopii. Jest to badanie subiektywne, obarczone możliwością błędu ludzkiego i kosztochłonne. Dotychczasowe próby automatyzacji diagnostyki pogłębionej takie jak spektrofotometria, fotodynamika czy optoelektronika nie zakończyły się sukcesem. Dodatkowo oba aktualnie stosowane narzędzia pierwszorazowe skriningu, czyli cytodiagnostyka i test molekularny identyfikujący DNA HPV HR, obarczone są niedoskonałościami wykrywczymi. Stąd pomysł, aby przed kwalifikacją do diagnostyki pogłębionej, kobiety z nieprawidłowym wynikiem testu pierwotnego poddane zostały diagnostyce doprecyzowującej wskazania do kolposkopii. Postulowanym testem doprecyzującym jest analiza immunocytochemiczna materiału komórkowego pobranego do badań cytologicznych lub molekularnych.

Podjęte w ramach niniejszej pracy badania zmierzają do określenia wartości diagnostycznych metod pierwszorazowych tak, aby wskazać tę najprecyzyjniej wykrywającą kobiety ze śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy wysokiego stopnia (HSIL). Po drugie, w ramach realizacji celów pracy, przeanalizowano wartość metody immunocytochemicznej użytej jako testu doprecyzowującego wskazania do kolposkopii.

Efektom tych badań ma być stworzenie podstaw nowej koncepcji skriningowej. Powinna się ona składać z pierwotnego narzędzia skriningowego o najwyższych parametrach wykrywczych oraz testu doprecyzowującego, który dodatkowo ograniczy skalę wyników fałszywie pozytywnych w pierwszorazowym przesiewie. W ostatecznym kształcie powinno to przynieść nowoczesny model badania profilaktycznego, skracający drogę pacjentki od wykrycia do rozpoznania i skutecznego leczenia patologii

identyfikowanej we wczesnym etapie rozwoju. Nie bez znaczenia jest tutaj redukcja kosztochłonności dotychczasowego, przestarzałego modelu skriningu.

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach do analizy włączono 93 kobiety z nieprawidłowym wynikiem oceny rozmazu cytologicznego lub klinicznym podejrzeniem występowania patologii szyjki macicy. Fakt ten spowodował, że czułość cytodiagnostyki uzyskana w toku prowadzonych badań była „sztucznie” zawyżona do 100%, czyli wartości niespotykanej w praktyce klinicznej. Błąd metodologiczny polegał na nierandomizowanym doborze pacjentek do grupy badanej, gdzie zdecydowana większość z nich miała nieprawidłowy wynik oceny rozmazu cytologicznego, a wśród diagnozowanych tylko 12 z 93 miało wynik prawidłowy określany jako NILM, przy jednoczesnym klinicznym podejrzeniu zmian szyjki macicy. Taki dobór grupy spowodował, że uzyskana czułość i swoistość cytodiagnostyki nie są wiarygodne. Pomimo tego warto zauważyć, że swoistość cytodiagnostyki oszacowana na 17,9% była najniższa w przeprowadzonych badaniach ze wszystkich analizowanych testów diagnostycznych. Metoda ta charakteryzowała się również najwyższym odsetkiem wyników fałszywie pozytywnych, czyli była nieefektywna pod kątem obserwowanej kosztochłonności. W dyskusji dla cytodiagnostyki wzięto pod uwagę głównie dokładność metody jak również PPV i NPV.

W przeprowadzonej analizie najczęstszym rozpoznaniem cytologicznym było ASC-US, które stwierdzono u 22 kobiet, co stanowiło 23,66% (22/93) całości. Liczebność grup z rozpoznaniem LSIL i ASC-H była analogiczna i wynosiła po 20 rozpoznań w każdej grupie, co stanowiło 21,5% (20/93). Najrzadziej formułowano cytoonkologiczne rozpoznanie HSIL, które dotyczyło 16 kobiet. Rozpoznanie to stanowiło 17,2% całości (16/93). Pacjentki z prawidłowym wynikiem oceny rozmazu cytologicznego stanowiły 12,9% całości (12/93).

Pomimo stosunkowo niskiej liczebności grupy badanej na rzecz niniejszej pracy, proporcje częstości poszczególnych nieprawidłowych rozpoznań cytoonkologicznych pozostają zgodne z doniesieniami z piśmiennictwa. W badaniach prowadzonych na dużych wielotysięcznych populacjach również stwierdzono, że najczęstszym nieprawidłowym rozpoznaniem cytologicznym jest ASC-US, a częstość pozostałych rozpoznań maleje wraz z zaawansowaniem zmian komórkowych, przyjmując odpowiednio kolejność LSIL, ASC-H, HSIL, rak. Według doniesień z brytyjskiego systemu służby zdrowia (NHS, *National Health Service*), udział procentowy poszczególnych nieprawidłowych rozpoznań cytologicznych przedstawia się

następująco: ASC-US 3,8%, LSIL 2,2%, HSIL 1,2%, rak 0,08%⁸⁷. Rozpoznanie AGC należy do najrzadziej formułowanych. Zachowanie proporcji poszczególnych wyników cytoonkologicznie nieprawidłowych typowych dla dużych populacji, czyni grupę badaną reprezentatywną dla potrzeb dalszych analiz.

Jak już wspomniano powyżej, nie wzięto pod uwagę czułości cytodiagnostyki z powodu doboru do grupy badanej prawie wyłącznie pacjentek z nieprawidłowymi wynikami oceny rozmazu cytologicznego. Tylko 12,9% (12/93) kobiet diagnozowano z rozpoznaniem cytologicznym NILM. W ocenie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki wzięto pod uwagę dokładność metody. Cytodiagnostyka charakteryzowała się najniższą wartością wskaźnika dokładności wykrywania zmian zarówno CIN2+/HSIL jak i CIN3+/HSIL w porównaniu do testu molekularnego i immunocytochemicznego. Dokładności metod wyniosły odpowiednio 38,9% dla cytologii, 49,5% dla testu molekularnego i 52,7% dla testu immunocytochemicznego w identyfikacji CIN2+/HSIL. Dla wykrywania CIN3+/HSIL wartości te przedstawiały się odpowiednio: 31,1%, 44,1%, 51,6%. Jest to zgodne z licznymi publikacjami porównującymi omawiane metody diagnostyczne⁸⁸.

W toku dalszych badań stwierdzono porównywalny rozkład liczebności dodatnich wyników badania immunocytochemicznego dla dwóch analizowanych rozpoznań cytoonkologicznych czyli ASC-US i LSIL. W grupie ASCUS na 22 pacjentki z tym rozpoznaniem 13 było p16/Ki-67 pozytywnych co stanowiło 59,1%. Podobny wynik uzyskano dla grupy kobiet z rozpoznaniem LSIL (11/20, 55%). Zgodność ta jest obserwowana również w innych badaniach. White i wsp. poddał diagnostyce immunocytochemicznej w kierunku koekspresji białek p16/Ki-67 oraz testowi molekularnemu DNA HPV grupę 1349 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US lub LSIL⁷⁷. Rozkład wyników pozytywnych dla p16/Ki-67 w zależności od kategorii rozpoznania cytologicznego nie różnił się istotnie dla ASC-US i LSIL, wynosząc odpowiednio 34,3% vs 28,6% ($p=0,189$).

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach określono, że 65,6% (61/93) kobiet miało pozytywny wynik testu immunocytochemicznego w kierunku p16/Ki-67. Zawężając obliczenia wyłącznie do kobiet z rozpoznaniem ASC-US i LSIL uzyskano ogólnie 25,8% (24/93) wyników pozytywnych dla testu immunocytochemicznego. W grupie pacjentek z ASC-US odsetek wyników p16/Ki-67 pozytywnych wyniósł 59,1% (13/22), a wśród kobiet z LSIL 55,0% (11/20). Ponownie, otrzymane w ramach niniejszej pracy wartości charakteryzujące odsetek pozytywnych

wyników p16/Ki-67 dla rozpoznania ASC-US i LSIL są porównywalne z dużym liczebnie badaniem White'a i wsp.

Analiza White'a i wsp. wykazała, że 62,2% badanych kobiet była pozytywna dla DNA HPV HR, a 30,4% pozytywna dla testu immunocytochemicznego. Odsetek kobiet DNA HPV HR pozytywnych uzyskany w ramach przeprowadzonych badań, był wyższy od wartości przedstawianych przez White'a i wsp. i wyniósł 73,1% (68/93).

Kolejnym parametrem opisującym reprezentatywność stosunkowo mało liczebnej grupy badanej, liczącej 93 kobiety, na potrzeby oceny metod diagnostycznych wykrywających patologie szyjki macicy, jest korelacja odsetka pozytywnie zweryfikowanych zmian CIN2+/HSIL i CIN3+/HSIL dla analizowanych rozpoznania cytologicznych ASC-US i LSIL. Wśród kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL histopatologicznie stwierdza się od 10-20% zmian klasyfikowanych jako CIN 2+ czyli HSIL⁸⁹. W Europie ryzyko obecności zmiany CIN3+/HSIL u kobiet z danym rozpoznaniem cytologicznym, które przekracza 10%, jest wskazaniem do kolposkopii. W Stanach Zjednoczonych jeśli ryzyko przekracza 5,2% to już zaleca się wykonanie kolposkopii^{90,91}. Badania przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy wykazały, że rozpoznanie cytologiczne ASC-US koreluje z rozpoznaniem histopatologicznym CIN2+/HSIL w 9,1%. Dla LSIL ta sama korelacja została opisana jako 10,0%. Można stwierdzić, że wyniki te korelują z oczekiwanymi proporcjami i wypełniają kryteria zarówno europejskie jak i amerykańskie, zalecające w takiej sytuacji algorytm diagnostyki pogłębionej oparty o kolposkopię.

Należy zaznaczyć, że korelacje uzyskane w ramach przeprowadzonych badań, dotyczące ryzyka obecności zmian CIN2+/HSIL dla kobiet z LSIL są identyczne jak wyniki uzyskane przez Ratnama i wsp.⁹² Badanie tego autora dotyczyło populacji 600 kobiet w wieku 19-76 lat z rozpoznaniem cytologicznym LSIL. W badaniu Ratnama i wsp. rozpoznano CIN2+/HSIL u 9% kobiet z 600 badanych kolposkopowo z rozpoznaniem cytologicznym LSIL (54/600). Charakterystyczne jest, że w grupie kobiet powyżej 30 roku życia, odsetek pacjentek z HSIL był niższy niż w całej badanej populacji 600 kobiet i wynosił 6,2% (24/386). Tymczasem w ramach badań przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy uzyskano 10-procentowy udział zmian CIN2+/HSIL rozpoznanych histopatologicznie dla kobiet z cytologią LSIL. U Ratnama i wsp. grupę 600 kobiet poddano algorytmowi polegającemu na wykonaniu u każdej pacjentki testu immunocytochemicznego na obecność p16 i Ki-67 oraz testu molekularnego na 13 typów HPV HR. U każdej badanej wykonano kolposkopię z biopsją weryfikującą pobraną z

szyjki macicy z miejsc podejrzanych. Uzyskano 44,3% (266/600) wyników pozytywnych dla testu immunocytochemicznego. Dla porównania test molekularny wykazał obecność wirusa brodawczaka ludzkiego u 55,2% badanych (331/600).

W ramach niniejszej pracy również przeprowadzono analizę immunocytochemiczną i molekularną dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL. Odsetek kobiet z pozytywnym wynikiem testu p16/Ki-67 dla rozpoznania ASC-US wyniósł 59,1%, a dla LSIL 55,0%. Test molekularny identyfikował DNA HPV HR u 18/22 (81,8%) kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, 11/20 (55,0%) kobiet z LSIL, 17/20 (85,0%) z ASC-H oraz 14/16 (87,5%) kobiet z HSIL. Po weryfikacji histopatologicznej materiału uzyskanego z biopsji, u kobiet w grupie badanej (n=44) wśród tych p16/Ki-67 pozytywnych, dla 13 kobiet rozpoznano CIN1/LSIL p16/Ki-67(+), co stanowiło 29,5%, a CIN2+/HSIL p16/Ki-67(+) przypisano 21 pacjentkom, co stanowiło 47,7% całości grupy badanej. Należy zarazem zaznaczyć, że 6 pacjentek zweryfikowanych patomorfologicznie jako CIN1/LSIL było p16/Ki-67 negatywne, co stanowiło 13,6% całości grupy badanej. Do zmian CIN2+/HSIL p16/Ki-67 negatywnych zakwalifikowano 4 badane przypadki, co stanowiło 9,1% analizowanej grupy.

W badaniach opublikowanych przez Tjalma przedstawiono zestawienie czułości i specyficzności dla cytodiagnostyki, metody immunocytochemicznej oraz testu molekularnego w identyfikacji zmian CIN2+/HSIL w skriningu prowadzonym od 2016 roku w Belgii dla kobiet w wieku 25-65 lat⁹³. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że czułość metody immunocytochemicznej była statystycznie znacząco wyższa niż cytodiagnostyki. Zarazem cytodiagnostyka odznaczała się nieistotnie wyższą wartością swoistości. Uzyskana w ramach niniejszej pracy wysoka wartość czułości cytodiagnostyki jest obarczona wadą metodologiczną w doborze grupy badanej, o czym wspomniano powyżej. Natomiast czułość metody immunocytochemicznej w wykrywaniu zmian CIN2+/HSIL wyniosła 84,0% przy swoistości 41,2%. Dokładność metody oszacowano na 52,7%. Analogicznie dla wartości czułości i swoistości testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR wyniosły odpowiednio: 92,0% i 33,8% przy dokładności 49,5%.

W badaniu Tjalma i wsp. czułość identyfikacji zmian CIN2+/HSIL wyniosła 95,8% zarówno dla testu immunocytochemicznego jak i molekularnego. Specyficzność była różna dla analizowanych metod i wyniosła odpowiednio 55,0% dla testu immunocytochemicznego i 50,5% dla testu molekularnego ($p=0,503$). Można stwierdzić, że zarówno przeprowadzone badania własne jak i publikacja Tjalma i wsp. wskazują na

bardzo wysoką czułość metody immunocytochemicznej i molekularnej w identyfikacji zmian CIN2+ przy niedostatecznej swoistości.

Publikowana czułość i specyficzność testu CINtec® PLUS dla kobiet z ASC-US i LSIL w celu identyfikacji zmian HSIL jest zróżnicowana. W porównaniu do testu DNA HPV HR, CINtec® PLUS charakteryzuje się przeważnie znacząco niższą czułością i nieistotnie statystycznie wyższą specyficznością. W badaniu Ratnam i wsp. wykazano, że dla identyfikacji zmian CIN2+/HSIL, czułość CINtec® PLUS wyniosła 81,5% versus 94,4% dla testu molekularnego. Podobne wyniki uzyskiwano niezależnie od wieku badanych. Tak samo badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy pokazały wyższą czułość testu molekularnego w porównaniu do metody immunocytochemicznej.

Zbliżone pod kątem zarysowanych powyżej tendencji są wyniki meta-analizy dokonanej przez Peeters i wsp., która dotyczyła dokładności wykorzystania testu immunocytochemicznego na obecność p16, połączenia p16 i Ki-67 oraz testu molekularnego w identyfikacji zmian HSIL CIN2+/CIN3+⁸⁸. Analiza objęła 1504 publikacje, których źródłem były MEDLINE i EMBASE. Prace publikowane były między styczniem 2012 roku a październikiem 2017 roku. Meta-analiza wykazała, że dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US zastosowanie tylko barwienia immunocytochemicznego na obecność p16 w cytoplazmie komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego pozwoliła na wykrycie zmian CIN2+/HSIL z czułością o 13% niższą i swoistością o 60% wyższą niż test molekularny. Włączenie do diagnostyki podwójnego barwienia, czyli jednoczesowej immunocytochemicznej identyfikacji p16 i Ki-67, pokazało znacząco niższą czułość wykrywania CIN2+/HSIL metodą immunocytochemii niż przy użyciu testu molekularnego. Test podwójny p16/Ki-67 był zarazem o 65% bardziej swoisty niż identyfikacja DNA HPV HR w procesie wykrywania CIN2+/HSIL. Analogiczne rezultaty ukazujące niższą czułość metody immunocytochemicznej w stosunku do testu molekularnego dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US wykazała meta-analiza przeprowadzona przez Roelens i wsp.⁹⁴

Meta-analiza Peeters pokazała zarazem, że nawet jeśli zestawia się ze sobą dwa badania nakierowane technologicznie na wykrywanie wyłącznie efektów przetrwałego zakażenia HPV HR połączonego z inkorporacją materiału genetycznego wirusa do genomu gospodarza, czyli porówna się badanie immunocytochemiczne i test Aptima wykrywający transkrypty HPV (test mRNA HPV), barwienie na p16 cechuje się wciąż niższą wartością czułości niż metoda biologii molekularnej. Dzieje się tak, pomimo że Aptima identyfikuje tylko pięć genotypów wysokoonkogennych HPV obdarzonych

najwyższym potencjałem karcinogennym. Analogicznie do uprzednio cytowanych autorów, również Peeters wykazała w tym zestawieniu wyższą wartość swoistości w wykrywaniu CIN2+/HSIL dla testu immunocytochemicznego w porównaniu do identyfikacji transkryptów HPV⁸⁸. W podsumowaniu autorka wskazuje na niedostateczną czułość testu p16/Ki-67 w procesie przesiewowej identyfikacji zmian CIN 2+/HSIL u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.

Peeters oszacowała wartości diagnostyczne dla testu immunocytochemicznego i molekularnego oddzielnie dla kobiet z LSIL. Podobnie jak dla ASC-US, tak i dla LSIL czułość podwójnego barwienia immunocytochemicznego była niższa w porównaniu do testu molekularnego w procesie wykrywania zmian CIN2+/HSIL. Różnica wynosiła 14%, czyli była nieznacznie wyższa niż dla kobiet z ASC-US. Swoistość natomiast była dwukrotnie wyższa dla testu immunocytochemicznego niż molekularnego. Czułość identyfikacji CIN3+/HSIL za pomocą testu immunocytochemicznego była również niższa od wartości charakteryzujących test molekularny. Różnica ta nie była istotna statystycznie. Swoistość dla identyfikacji CIN3+/HSIL przedstawiała się analogicznie jak dla CIN2+/HSIL.

Przyjęte na potrzeby niniejszej pracy założenie identyfikacji zmian CIN3+/HSIL, wykazało odmienne wartości diagnostyczne w porównaniu do tych osiąganych przy wykrywaniu zmian CIN2+/HSIL. Dla CIN3+/HSIL wartość czułości była równa dla obu metod diagnostycznych i wyniosła 94,4%. Swoistość metody immunocytochemicznej oszacowano na 41,3% a dokładność na 51,6%. Metoda molekularnej identyfikacji DNA HPV HR uzyskała 32,0% swoistość i 44,1% dokładność. Należy podkreślić, że przy analogicznej czułości i zbliżonej swoistości porównanie obu metod użytych do wykrywania zmian CIN3+/HSIL wykazuje przewagę w dokładności metody na rzecz testu immunocytochemicznego.

Wyniki uzyskane przez Peeters i wsp. są zgodne z wnioskami z meta-analizy dokonanej przez Roelens i wsp. W tej publikacji autorzy potwierdzili, że użycie techniki immunocytochemicznej identyfikacji biomarkera p16 do wykrywania zmian CIN3+/HSIL, jest obdarzone niższą czułością i wyższą swoistością w porównaniu do diagnostyki molekularnej DNA HPV⁹⁴. Podobne wyniki uzyskał Tjalma i wsp. w cytowanej powyżej publikacji poświęconej analizie wartości diagnostycznej cytodiagnostyki, immunocytochemii i badań molekularnych w skriningu kobiet mieszkających w Belgii. Również tam u pacjentek skierowanych do etapu pogłębionego z powodu nieprawidłowego rozpoznania cytologicznego ASC-US i LSIL, badanie

immunocytochemiczne okazało się mniej czułe i bardziej swoiste niż test molekularny⁹³. Warto zaznaczyć, że dobór grupy badanej dokonany przez Tjalma i wsp. był analogiczny do metody przyjętej na potrzeby niniejszej pracy, a uzyskane wyniki są zbliżone.

White i wsp. dokonali prospektywnego badania 1349 kobiet z rozpoznaniem cytologicznymi ASC-US i LSIL, wykonując test molekularny i barwienie immunocytochemiczne na obecność p16 i Ki-67⁷⁷. Celem projektu było oszacowanie wartości wykrywczych w diagnostyce zmian CIN2+/HSIL. Również to badanie wykazało wyższą czułość identyfikacji CIN2+/HSIL dla testu molekularnego, wynoszącą 95,8%, w porównaniu do immunocytochemicznego ze wskaźnikiem czułości na poziomie 79,2%. Swoistość metody immunocytochemicznej była wyższa niż molekularnej, odpowiednio 75,2% vs 40,4%.

Według badań przeprowadzonych przez White'a, kobiety poniżej 30 roku życia uzyskują pozytywne wyniki testu immunocytochemicznego statystycznie częściej w porównaniu do populacji kobiet powyżej 30 roku życia. Proporcja p16/Ki-67 pozytywnych pacjentek z rozpoznaniem cytologicznymi ASC-US lub LSIL w zależności od tej cezurę wiekowej wynosiła 36,0% vs 28,6% ($p=0,029$). Badania własne wykazały porównywalny odsetek immunocytochemicznie pozytywnych zmian CIN2+/HSIL dla rozpoznania cytologicznych ASC-US i LSIL. White i wsp. oszacowali dokładność modelu skринingu raka szyjki macicy, opartego na zestawieniu dwóch testów, których wyniki stanowią wskazanie do diagnostyki pogłębionej. Kombinacja testu molekularnego i immunocytochemicznego pozwala na dość precyzyjne oszacowanie ryzyka wykrycia zmian CIN3/HSIL. Ryzyko to wynosi 15,6% w sytuacji pozytywnego testu molekularnego i wzrasta do 27% przy wykorzystaniu obu metod jednocześnie, to jest w sytuacji uzyskania pozytywnego wyniku testu na obecność DNA HPV HR i pozytywnego barwienia na p16 i Ki-67.

Koncepcję połączenia dwóch testów, celem sprawdzenia ich sumarycznej wartości diagnostycznej w badaniach przesiewowych, oceniono również w ramach niniejszej pracy. W obliczeniach wykorzystano modele połączone składające się z cytodiagnostyki i testu immunocytochemicznego oraz połączenie metody immunocytochemicznej z testem molekularnym identyfikującym DNA HPV HR. Pierwszy algorytm nie zmienił wskaźnika czułości, która i tak wynosiła 100% dla cytodiagnostyki użytej jako samodzielnego testu. Natomiast takie połączenie dwóch metod diagnostycznych nie spowodowało poprawy swoistości, która osiągnęła wartość 10,3%. Pozytywna wartość predykcyjna wyniosła 29,1%, negatywna 100%. Dokładność

modelu połączonego złożonego z cytodiagnostyki i immunocytochemii oszacowano na 34,4%. Interesująco wypadło połączenie metody molekularnej i immunocytochemicznej w identyfikacji CIN2+/HSIL. Czułość oszacowano na 96,0%, a swoistość 25,0%. Pozytywna wartość predykcyjna wyniosła 32,0%, a negatywna 94,4%. Dokładność takiego modelu złożonego z testu DNA HPV i p16/Ki-67 oszacowano na 44,1%, co jest wynikiem znacznie wyższym niż w przypadku wykorzystania cytodiagnostyki z immunocytochemią.

Biorąc pod uwagę wszystkie koncepcje badawcze oceniane w niniejszej pracy do wykrywania CIN2+/HSIL należy podkreślić, że najwyższą dokładność oszacowano dla metody immunocytochemicznej. Wartość ta równa 52,7% przekraczała dokładność cytodiagnostyki 38,9%, testu molekularnego 49,5%, testu cytologiczno-immunocytochemicznego 34,4% i molekularno-immunocytochemicznego 44,1%.

Wykonano również obliczenia analogicznych parametrów przy przyjęciu za cel diagnostyki zmiany bardziej zaawansowane CIN3+/HSIL. Również dla takich założeń najwyższa wartość dokładności badania charakteryzowała metodę immunocytochemiczną i wyniosła 51,6%, co jednak jest wynikiem nieco gorszym niż w przypadku wykrywania zmian CIN2+/HSIL. Równie ważnym jest fakt, że porównanie wartości NPV i PPV dla metody immunocytochemicznej użytej samodzielnie lub w zestawieniu z cytologią lub testem molekularnym nie zmieniało w sposób wyraźny wartości tych parametrów.

Według meta-analizy Peeters i wsp. test immunocytochemiczny charakteryzuje się większą przydatnością dla wykrywania zmian CIN3+/HSIL u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL. Pozytywna wartość predykcyjna dla wykrywania CIN3+/HSIL u kobiet z LSIL przekracza 10%, a negatywna wartość predykcyjna nie przekracza 1%⁸⁸.

Wielu autorów zwraca uwagę na rolę wieku badanych kobiet, który może mieć wpływ na uzyskane wyniki i przydatność określonych metod. Zgodnie z wiedzą o biologii wirusa brodawczaka ludzkiego, ważną cezurą wiekową jest 30 rok życia. Przyjmuje się, że kobiety młodsze niż 30-letnie są najczęściej zakażone HPV HR w sposób incydentalny. Cechą zakażeń incydentalnych jest wysoki odsetek samoistnych remisji. Po 30 roku życia wzrasta częstość zakażeń przetrwałych i ryzyko rozwoju stanu przedrakowego szyjki macicy. W badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy, populację kobiet poniżej 30 roku życia cechowała wyższa czułość i niższa swoistość wykrywania CIN2+/HSIL, aniżeli w populacji kobiet starszych, po ukończeniu 30 roku życia, gdzie obniżeniu czułości diagnostyki towarzyszyła wyższa swoistość.

Takie korelacje stwierdzono również analizując osobno parametry testu immunocytochemicznego. Należy podkreślić, że uwzględniając przynależność do grup wiekowych, czułość testu molekularnego względem testu immunocytochemicznego w wykrywaniu CIN2+/HSIL, była równa dla populacji poniżej 30 roku życia i wyższa dla kobiet starszych niż 30-letnie. Połączenie obu narzędzi diagnostycznych w testy podwójne powodowało dramatyczny spadek swoistości przy prawie niezmienionej czułości, czyli nadal maksymalnej w grupie kobiet młodszych i wyższej o zaledwie 5,9% u kobiet powyżej 30 roku życia.

Podobne badania przeprowadził Ratnam i wsp. Dla kobiet w wieku poniżej 30 roku życia czułość identyfikacji zmian CIN2+/HSIL wyniosła 70% dla testu CINtec[®] PLUS vs 93,3% dla testu molekularnego. W grupie ogólnej, bez podziału wiekowego, w badaniu Ratnama i wsp.⁹², gdzie przebadano w sumie 600 kobiet w przedziale wieku od 19-76 lat, czułość testu CINtec[®] PLUS w identyfikacji HSIL była wysoka, ale jej wartość ustępowała parametrom czułości testu molekularnego. Sytuacja powtarzała się dla grupy kobiet młodych, poniżej 30 roku życia, gdzie czułość testu molekularnego przewyższała znacznie czułość CINtec[®] PLUS w identyfikacji HSIL. Charakterystyczne jest, że oba testy diagnostyczne wykazywały identyczną czułość identyfikacji CIN2+/HSIL dla populacji kobiet powyżej 30 roku życia. Czułość ta była bardzo wysoka i wynosiła 95,8%. Jeżeli stosując dawną terminologię patomorfologiczną jako cel badania uwzględnimy wyłącznie śródnabłonkową neoplazję wysokiego stopnia czyli CIN3 bez względu na wiek badanych kobiet, to w badaniu Ratnam i wsp. czułość detekcji zaawansowanego stanu przednowotworowego dla obu testów wahała się między 97 a 100%.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy dla testu immunocytochemicznego czułość identyfikacji CIN2+/HSIL uległa spadkowi ze 100% do 76% w grupie kobiet starszych niż 30 rok życia. Podobna tendencja również wystąpiła dla testu molekularnego, ale obniżenie parametru czułości w grupie starszych kobiet nie było aż tak wyraźne. Wartości zmieniły się ze 100% do 88%. Ten zauważalny wpływ wieku badanych na wartości diagnostyczne analizowanych testów sugeruje pewne ograniczenia w użyciu klinicznym CINtec[®] PLUS, preferując kobiety poniżej 30 roku życia. Natomiast test molekularny według wyników Ratnama i wsp. jest przydatny klinicznie bez ograniczeń wiekowych.

Konieczności wprowadzenia takiej cezurę wiekowej dla diagnostyki przy użyciu testu CINtec[®] PLUS nie potwierdza analiza par CINtec[®] PLUS/test molekularny dokonana testem MacNemara, którego wyniki opisują jednakową, wysoką czułość obu

testów jako badań doprecyzowujących wskazania do kolposkopii u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL, bez ograniczeń wiekowych. Wy tłumaczenie opisanej przez Ratnama obniżonej czułości CINtec[®] PLUS dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL poniżej 30 roku życia jako metody wykrywającej CIN2+/HSIL, może wynikać z naturalnego potencjału do samoistnej regresji tych zmian. Szacuje się, że 80% zmian CIN1/LSIL u młodych kobiet poniżej 30 roku życia ulega samoistnej regresji w trakcie 12-24 miesięcznej obserwacji. Podobne zjawisko o nieco mniejszej skali dotyczy również zmian CIN2+/HSIL. Zarówno Ratnam jak i Solomon szacują skalę potencjalnej regresji zmian LSIL na odpowiednio 48,9% po około 8 miesiącach i 41,9% po około 2 miesiącach obserwacji⁹⁵. Znajomość zjawiska naturalnej regresji zmian wywołanych incydentalnym zakażeniem HPV jest o tyle ważna, że na przykład w kanadyjskim systemie skriningowym średni czas oczekiwania kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL, DNA HPV HR (+) wynosi 8 miesięcy. Według cytowanych powyżej autorów jest to czas najzupełniej wystarczający do zaistnienia samoistnej regresji u 80% kobiet ze zmianami patomorfologicznymi LSIL i dla niemałej części zmian HSIL. W takiej sytuacji jest zrozumiałe, że zjawisko samoistnej regresji zmian przednowotworowych wywołanych przez infekcję wirusową, jakie zachodzi u kobiet już zakwalifikowanych do diagnostyki pogłębionej, wpływa znacząco na zwiększoną liczbę fałszywie pozytywnych wskazań do diagnostyki pogłębionej. Dodatkowo należy podkreślić niskie ryzyko progresji ocenione na 8,6% w trakcie 8 miesięcy obserwacji w badaniu Ratnama i 7,8% w trakcie 2 miesięcy obserwacji dokonanej przez Solomon⁹⁵. Podobnie niskie ryzyko progresji zmian LSIL wykazał Trope. Autor ten ocenił skalę ryzyka progresji zmian LSIL w ciągu 7 miesięcy obserwacji na 7,8%⁹⁶.

Test immunocytochemiczny może nie wykrywać zmian CIN2+/HSIL, które są w trakcie trwania samoistnej regresji. Komórki normalizują swoją morfologię i funkcje biologiczne. Zanika ekspresja p16 i Ki-67. Natomiast wysoka czułość testu molekularnego dla tych zmian obowiązuje zarówno dla CIN2+/HSIL będących na drodze progresji oraz tych stabilnych w procesie karcinogenezy. Ta wysoka czułość obowiązuje także dla zmian w trakcie regresji dopóki obecna jest infekcja wirusowa.

W podsumowaniu wyników uzyskanych przez Ratnama należy podkreślić, że pomimo ograniczonej przydatności metody immunocytochemicznej do wykrywania zmian CIN2+/HSIL u kobiet z LSIL poniżej 30 roku życia, to wciąż metoda ta charakteryzuje się znacznie wyższą czułością niż tradycyjna cytodiagnostyka^{71,74}.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy czułość testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR była wysoka w obu badanych grupach, to jest 100% dla kobiet do 30 roku życia i 88,2% dla kobiet starszych niż 30 rok życia. Wielką zdobyczą technologiczną w ramach testu molekularnego jest możliwość genotypowania HPV16 i HPV18. Znaczenie informacji o obecności tych dwóch wysokoonkogennych typów wirusa należy połączyć z wiedzą o ich roli w powstawaniu blisko 70% raków szyjki macicy na świecie^{97,98}. Zależność potwierdziły szeroko zakrojone badania prowadzone w trakcie prób klinicznych nad szczepionką dwu- i czterowalentną skierowaną przeciwko onkogennym i nieonkogennym typom HPV. Teoretycznie, pozytywne genotypowanie tylko HPV16 i HPV18 powinno pozwolić wykryć około 70% zmian HSIL. W praktyce jednak etiopatogeneza CIN3/HSIL nie w pełni pokrywa się z etiopatogenezą raków inwazyjnych szyjki macicy w kontekście identyfikowanych typów HPV. Według metaanalizy dokonanej przez Arbyna i wsp., opartej na analizie 5000 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL diagnozowanych w 24 ośrodkach, średnie ryzyko rozwoju CIN3/HSIL u kobiet HPV16/18 pozytywnych wynosi 19%⁹⁹. Ta sama meta-analiza wykazuje również tylko 5% ryzyko rozwoju CIN3/HSIL u kobiet zakażonych innymi niż HPV16/18 typami wirusa brodawczaka ludzkiego. Co ciekawe badanie Arbyna i wsp. wykazało, że detekcja CIN2+/HSIL oparta na identyfikacji DNA HPV16/18 jest obdarzona wyższą czułością i niższą specyficznością niż analogiczna diagnostyka CIN2+/HSIL oparta o identyfikację innych onkogennych typów HPV HR. Według Arbyna i wsp. czułość wykrywania CIN2+/HSIL oparta o genotypowanie dwóch typów HPV16 i HPV18 wyniosła 55,5%. Dla porównania w badaniu Ratnama i wsp. obecność DNA HPV16/18 została potwierdzona dla 28,1% (93/331) kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL niezależnie od wieku i 29,1% kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL u kobiet w wieku równym lub wyższym niż 30 rok życia⁹². Oparcie diagnostyki zmian CIN2+/HSIL o test molekularny prowadzi według wyników Ratnama i wsp. do zdiagnozowania u 49% badanych kobiet z LSIL zmian CIN2+/HSIL (25/51) niezależnie od wieku. Czułość tej diagnostyki oceniono na 46,3%. Wartości wskaźników czułości znacząco rosły w sytuacji zawężenia grupy diagnozowanych kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL do tych, które ukończyły 30 rok życia. Czułość wykrycia CIN2+/HSIL przy przyjęciu takich założeń wzrasta z 46,3% do 58,3%. Specyficzność wykrywania CIN2+/HSIL w zależności od omówionej powyżej cezurę wiekowej wyniosła odpowiednio 84,7% <30 r.ż. i 83,8% ≥30 r.ż. Metaanaliza Arbyna i wsp. określiła ogólnie specyficzność wykrywania CIN2+/HSIL na

76,3% w populacji 5000 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL bez podziału na grupy wiekowe.

Reasumując wyniki cytowanych badań, wprowadzenie genotypowania tylko HPV16/18 w procesie wykrywania CIN2+/HSIL daje w efekcie spadek czułości wykrywania śródnabłonkowej neoplazji w porównaniu do użycia szerokiego testu na liczne wirusy onkogenne. Wnioski te potwierdza badanie Ratnama i wsp. oraz meta-analiza Arbyna i wsp. Bazując na tych wnioskach zalecenia amerykańskie sugerują natychmiastową kolposkopię u kobiet DNA HPV16/18 pozytywnych. Jednak biorąc pod uwagę rolę testu „szerokiego” na co najmniej 13 onkogennych typów HPV, przy jego pozytywnym wyniku zaleca się powtórny wymaz cytologiczny w krótkim okresie czasu od poprzedniego badania¹⁰⁰. Ratnam i wsp. ocenił rozpowszechnienie zakażenia HPV HR na 55,2% badanej populacji 600 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL. Jest to wynik zbliżony do wartości opisywanych przez Solomon i wsp., który ocenił rozpowszechnienie HPV u kobiet z LSIL na 76%^{92,95}.

W badaniu Ratnama i wsp. dokonano ponownie rozdziału badanej populacji według kryterium wieku. Rozpowszechnienie HPV HR u kobiet powyżej 30 roku życia Ratnam wraz zespołem ocenili na 50,6%. Redukcja rozpowszechnienia HPV postępująca wraz z wiekiem, opisywana przez wielu autorów, jest podstawową przyczyną wg Ratnama i wsp., która nie pozwoliła na wykazanie statystycznie znacząco wyższej swoistości testu immunocytochemicznego nad testem molekularnym. Taką wyższą swoistość immunocytochemii względem testu molekularnego opisują liczni autorzy^{71,74,79,88,101}. W publikacji Ratnama i wsp. mamy opisaną nieistotną statystycznie wyższą swoistość testu immunocytochemicznego w wykrywaniu rzeczywistych stanów przednowotworowych szyjki macicy u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL.

Test molekularny jest rekomendowany w wielu krajach jako pierwotne narzędzie diagnostyczne w wykrywaniu HSIL u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL. Jego przydatność kliniczna wzrasta w sytuacji, gdy użyta technologia umożliwia genotypowanie. Aktualne zalecenia wskazują, że populacja docelowa dla testu HPV, jako metody selekcjonującej pacjentki ze wskazaniami do kolposkopii to kobiety w wieku równym lub wyższym niż 30 rok życia. Badania Ratnama i wsp. wskazały, że założenia użycia testu molekularnego do doprecyzowania wskazań do kolposkopii są słuszne. W tej publikacji oszacowano, że wśród kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL w wieku równym lub wyższym niż 30 lat 30% jest HPV pozytywnych. Tylko ta grupa pacjentek zyskuje doprecyzowane wskazanie do wykonania kolposkopii, czyli kwalifikację do

etapu pogłębionej diagnostyki. Dla około 70% kobiet z rozpoznaniem cytologicznym LSIL, ale negatywnym wynikiem testu molekularnego DNA HPV, nie ma potrzeby kierowania na kolposkopię. Te 70% populacji kobiet po 30 roku życia z rozpoznaniem cytologicznym LSIL, ale DNA HPV negatywnych, gdyby nie wiedza płynąca z testu molekularnego, byłyby źródłem wyników fałszywie pozytywnych i podlegały nieuzasadnionej diagnostyce kolposkopowej. Wykonanie kolposkopii w tej grupie pacjentek obniżyłoby znacząco kosztowoefektywność prowadzonej procedury diagnostycznej, a systemowo całego skriningu populacyjnego. Według Ratnama i wsp. zastosowanie testu molekularnego wraz z genotypowaniem HPV16/18 doprowadziłoby do redukcji liczby niepotrzebnych kolposkopii o 85% u kobiet z LSIL przy braku obecności DNA HPV typu 16 lub 18. Fakt ten potwierdzają również inni autorzy¹⁰².

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy spośród wszystkich kobiet z pozytywnym wynikiem testu immunocytochemicznego na p16/Ki-67, których było 61, 20 miało potwierdzoną obecność DNA HPV 16 (32,8% pacjentek z grupy CINtec® PLUS pozytywnych), 3 pacjentki DNA HPV 18 (4,9%) i jedna była pozytywna dla obu wirusów (1,6%). W sumie, aż 39,3% badanych kobiet HPV 16 i/lub HPV 18 pozytywnych miało również dodatni wynik testu immunocytochemicznego. Kolejne 29,5% pacjentek p16/Ki-67 pozytywnych miało również wykryte DNA HPV HR innych typów onkogennych poza 16 i 18. Wyniki te pokazują, że nie można oprzeć procesu wykrywania śródnamionkowej neoplazji wyłącznie o genotypowanie HPV16/18. Obserwacje te są zgodne z najnowszymi danymi o efektywności szczepień populacyjnych przeciwko HPV 16, 18, 6, 11 realizowanych w krajach o ponad 70-procentowym objęciu populacji docelowej. Mowa tutaj o Australii i Nowej Zelandii¹⁰³. W ramach efektu uzyskania odporności populacyjnej przeciwko HPV 16 i 18 w grupie zaszczepionych przed inicjacją płciową, oczekiwano 70% spadku zakażeń przetrwałych wywołanych tymi typami wirusa, a co ma z tym związek obniżeniu o podobny odsetek częstości występowania zmian CIN2+/HSIL. Aktualne dane z Nowej Zelandii informują natomiast tylko o 22% redukcji w statystykach zmian CIN2+/HSIL u kobiet powyżej 30 roku życia zaszczepionych przeciwko HPV 16/18.

W dalszym toku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy dokonano analizy ewentualnej obecności DNA HPV u kobiet z ujemnym wynikiem testu immunocytochemicznego. Dla pacjentek z potwierdzonym DNA HPV 16 i/lub 18, tylko u dwóch badanych kobiet test immunocytochemiczny był ujemny. Natomiast przy identyfikacji innych typów HPV HR, aż dla 10 badanych pacjentek CINtec® PLUS był

negatywny. Daje to w sumie 37,6% kobiet pozytywnych w teście molekularnym identyfikującym DNA HPV HR, ale negatywnych w barwieniu immunocytochemicznym na p16/Ki-67. Wy tłumaczenie tych wyników polega prawdopodobnie na istnieniu zjawiska incydentalnego zakażenia HPV, które poprzez fakt braku inkorporacji materiału genetycznego wirusa brodawczaka ludzkiego do genomu gospodarza, nie przekłada się na obecność i immuno-detekcję białek markerowych p16 i Ki-67 w przeprowadzonych testach. W sumie 68,8% kobiet CINtec® PLUS pozytywnych miało równocześnie wykryte DNA HPV. Zestawienie korelacji pozytywnych wyników testu molekularnego identyfikującego DNA HPV z dodatnimi wynikami badania immunocytochemicznego wraz z analizą łącznego występowania wyników ujemnych obu testów daje bardzo interesujące wyniki. W ramach wykonanych badań opierając się na ilorazie szans oceniających prawdopodobieństwo zaistnienia obu analogicznych wyników u tej samej pacjentki uzyskano ścisłą zależność statystyczną. Na tej podstawie można ocenić, że szansa na to, że pacjentka pozytywna w teście CINtec® PLUS będzie również pozytywna w teście wirusowym, jest 9,9 razy większa niż to, że taka sama pacjentka będzie DNA HPV negatywna ($p < 0,0001$).

W podsumowaniu porównania dwóch wiodących na świecie metod diagnostycznych drugiego rzutu, służących doprecyzowaniu wskazań do kolposkopii u kobiet z nieprawidłowym wynikiem cytologii, należy wskazać, która z nich jest bardziej wartościowa w praktyce klinicznej. W efekcie badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zbadano czułość testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR oraz metody immunocytochemicznej p16/Ki-67 dla kobiet do 30 roku życia i powyżej tego wieku. Wykazano, że czułość identyfikacji CIN2+/HSIL dla grupy do 30 roku życia jest wysoka, porównywalna dla testu molekularnego i badania immunocytochemicznego. Jest to całkowicie zgodne z wnioskami sformułowanymi przez Ratnama i wsp. Zbliżone wyniki przyniosło badanie PALMS, w którym jednak czułość testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR jest nieznacznie wyższa w porównaniu do metody immunocytochemicznej⁷⁴. Podobne zestawienie dla kobiet powyżej 30 roku życia wykazuje niższe wartości czułości obu metod wykrywających zmiany CIN2+/HSIL w porównaniu do wcześniej omówionej populacji kobiet młodszych. Skala redukcji wartości czułości jest niższa dla testu molekularnego DNA HPV HR (ze 100% do 88,2%) niż dla metody immunocytochemicznej (ze 100% do 76,4%). Tę prawidłowość potwierdza badanie PALMS, gdzie redukcja czułości dla metody molekularnej DNA HPV HR (z 97,4% do 95,6%) jest również niższa niż dla immunocytochemicznej

identyfikacji p16/Ki-67 (z 93,3% do 87,8%). Badanie Ikenberga i wsp. wykazuje niższe wartości czułości dla kobiet ≥ 30 r.ż. dla obu metod, co jest zgodne z wnioskami płynącymi z pracy Ratnama i wsp. oraz badań własnych.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że obie analizowane metody redukują skutecznie liczbę wyników fałszywie dodatnich i tym samym liczbę generowanych wskazań do kolposkopii, ale większą przydatność w warunkach klinicznych wykazuje test molekularny identyfikujący DNA HPV HR. Należy zaznaczyć, że niewątpliwy wpływ na różnice w efektywności obu metod ma fakt, że badanie molekularne DNA HPV HR jest metodą całkowicie zautomatyzowaną, natomiast test immunocytochemiczny jest obciążony subiektywną oceną barwnych efektów reakcji dokonywaną przez człowieka. W wyborze metody doprecyzowującej wskazania do badania kolposkopowego znaczenie będzie miała również kosztochłonność obu procedur diagnostycznych.

Wraz z wprowadzeniem szczepień populacyjnych przeciwko HPV HR w krajach o wysokim stopniu rozwoju cywilizacyjnego i gospodarczego, gdzie funkcjonuje również systemowy skrining cytologiczny pojawiła się potrzeba przebudowy całego programu profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy. Szczepienia populacyjne będą nieuchronnie prowadzić do obniżania się współczynników zachorowalności i umieralności na raka szyjki macicy. Szacuje się, że powszechna obecność w profilaktyce pierwotnej trzech szczepionek dwu-, cztero- i dziewięciowalentnej stosowanych populacyjnie, doprowadzi do 75-90% redukcji występowania nowotworów HPV-zależnych. Wraz z nowoczesną formą profilaktyki pierwotnej, potrzebą chwili staje się uruchomienie równie nowoczesnej propozycji profilaktyki wtórnej, doprecyzowującej wskazania do etapu pogłębionego diagnostyki u kobiet HPV pozytywnych, zarówno tych szczepionych jak i nieszczepionych. Taką propozycją jest użycie jako pierwotnego narzędzia skringowego testu molekularnego na obecność 14 onkogennych typów HPV, a następnie testu wtórnego, drugorzutowego, pod postacią podwójnego barwienia immunocytochemicznego na obecność biomarkerów p16 i Ki-67. Pierwszy etap, czyli test molekularny identyfikujący wirusa brodawczaka ludzkiego, niesie ze sobą znaczące podwyższenie czułości w porównaniu do klasycznej, a nawet płynnej cytodiagnostyki, ale jest zarazem źródłem wielu wyników fałszywie pozytywnych. Drugi etap, czyli badanie immunocytochemiczne p16/Ki-67, ma zniwelować największe wady testu molekularnego, czyli podwyższyć swoistość całego etapu profilaktycznego.

Mówiąc językiem praktycznym połączenie testu molekularnego i podwójnego barwienia immunocytochemicznego ma doprecyzować maksymalnie wskazania do etapu

pogłębionej profilaktyki czyli do kolposkopii. Efektywność takiej propozycji nowej konstrukcji badań przesiewowych raka szyjki macicy jest bezdyskusyjna. Tjalma i wsp. twierdzą, że oparcie badań przesiewowych o takie złożenia projektowe, prowadzi hipotetycznie do obniżenia zachorowalności na raka o 36% i umieralności o 40% w grupie wiekowej między 25 a 65 rokiem życia. Prowadzony w Belgii skrining, gdzie jako pierwszy test używa się identyfikacji molekularnej DNA HPV, a w drugim etapie wykorzystuje metodę podwójnego barwienia immunocytochemicznego, powoduje spadek zachorowalności o 30% i umieralności też o 30% w grupie wiekowej 30-65 lat⁹³. Biorąc pod uwagę, że taki model skriningu prowadzi do wykluczenia podstawowych wad profilaktyki opartej wyłącznie o cytodiagnostykę, czyli wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych, oszczędności w ramach prowadzonej profilaktyki wtórnej raka szyjki macicy, są widoczne zarówno na etapie pierwotnym czyli z wykorzystaniem testu molekularnego i następowym czyli doprecyzowującym wskazania do diagnostyki pogłębionej przy użyciu testu immunocytochemicznego.

W tle tych modyfikacji programów profilaktycznych wczesnego wykrywania wysokiego stopnia zmian śródnabłonkowych i raka szyjki macicy, leży niebagatelna kwestia kosztochłonności całego procesu. W celu jego oszacowania bierze się pod uwagę nie tylko „surowe” koszty prowadzenia programu, takie jak opłata za logistykę, badania laboratoryjne, kolposkopię i ocenę patomorfologiczną wraz z kosztami opieki lekarskiej świadczonej w trakcie kolejnych wizyt. Kosztochłonność profilaktyki powinna być również uzupełniona o ocenę wydatków budżetowych na leczenie wykrytych i rozpoznanych nowotworów oraz ewentualne koszty socjalne i społeczne prowadzenia samej terapii i jej niepowodzeń. Według cytowanego Tjalma i wsp. zastąpienie w pierwotnym narzędziu skriningowym cytologii konwencjonalnej lub płynnej testem molekularnym, 5-krotnie obniża ryzyko zgonu na raka szyjki macicy w populacji objętej skriningiem. Wiele opracowań analizujących model skriningu oparty o test molekularny jako pierwotne narzędzie skriningowe potwierdza opłacalność takiej koncepcji^{93,104,105,106}. W dokonanej symulacji kosztochłonności skriningu w modelu HPV/p16/Ki-67 na przykładzie Belgii, pozwoliłoby to na coroczne oszczędzenie 5,3 miliona euro dla populacji 25-65 lat i 5 milionów euro dla populacji 30-65 lat⁹³. Należy przyjąć zasadę, że odejście od cytodiagnostyki konwencjonalnej na rzecz nowego modelu skriningu zaprezentowanego powyżej, pozwoli na redukcję wydatków o 1/5.

Podkreślenia wymaga też kwestia wieku w momencie rozpoczęcia skriningu. Jest to o tyle ważne, że w populacji kobiet do 30 roku życia przytłaczająca większość bywa

zakażona HPV. Taka obserwacja dotyczy nawet 80% kobiet w tej grupie wiekowej. W przeważającej większości są to zakażenia incydentalne, nieistotne dla realizacji celów prowadzonej profilaktyki i wczesnego wykrywania HSIL. Dzieje się tak z powodu braku zmian komórkowych, niskiego ryzyka inkorporacji wirusa do genomu gospodarza oraz niskiego ryzyka progresji zmian do rzeczywistych stanów przednowotworowych i raka szyjki macicy. Większość tych zakażeń u młodych kobiet ulega samoistnej regresji w czasie 12-24 miesięcy bez podejmowania jakichkolwiek działań terapeutycznych. Skalę samoistnej regresji szacuje się na 80%. Nakierowanie skriningu HPV/p16/Ki67 na tę grupę wiekową jest błędem i powoduje lawinowy wzrost kosztów diagnostyki, bez przekładania się na współczynniki zachorowalności i umieralności. Stąd wciąż toczy się dyskusja nad optymalnym wiekiem rozpoczęcia skriningu, który jest różny nawet w sąsiadujących ze sobą krajach UE. Przykładowo we Włoszech i Holandii skrining raka szyjki macicy startuje odpowiednio w 21 i 30 roku życia, a kończy się odpowiednio w 60 i 65 roku życia. Natomiast w Niemczech rutynowe badania cytologiczne rozpoczynają się już u dwudziestolatek i dodatkowo nie ma wieku zakończenia badań przesiewowych, czyli skrining raka szyjki macicy jest prowadzony dożywotnio¹⁰⁷.

Niewątpliwie era cytodiagnostyki jako pierwotnego narzędzia diagnostycznego w procesie profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy dobiega końca. Przyszłość badań populacyjnych będzie oparta w pierwszym rzędzie o testy molekularne DNA HPV HR z następowym wykorzystaniem identyfikacji biomarkerów p16/Ki-67 w teście immunocytochemicznym celem doprecyzowania wskazań do kolposkopii.

7. Wnioski.

1. Analiza porównawcza wartości wykrywczych testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR oraz testu immunocytochemicznego p16/Ki-67 wskazuje na satysfakcjonującą czułość i niedostateczną swoistość obu metod użytych jako pierwotne narzędzie skringowe w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.
2. Niedostateczna swoistość zarówno testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR, jak i metody immunocytochemicznej p16/Ki-67, użytych w skringu jako pierwotne narzędzia diagnostyczne, generuje wysoki odsetek wyników fałszywie dodatnich.
3. Test immunocytochemiczny charakteryzuje się najwyższą dokładnością wykrywania zarówno zmian CIN2+/HSIL jak i CIN3+/HSIL w porównaniu do wszystkich analizowanych metod diagnostycznych stosowanych aktualnie w skringu raka szyjki macicy.
4. Wysoka dokładność testu immunocytochemicznego kwalifikuje go jako metodę drugorzutowego doprecyzowania wskazań do kolposkopii u kobiet z nieprawidłowym cytoonkologicznie wynikiem oceny rozmazu cytologicznego lub pozytywnym wynikiem testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR, szczególnie w przypadkach niejednoznacznych diagnostycznie, czyli przy mniejszych nieprawidłowościach cytologicznych ASC-US i LSIL lub obecności DNA HPV HR genotypów innych niż 16/18.

8. Streszczenie.

Wprowadzenie: Rak szyjki macicy jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych u kobiet na całym świecie. Podążając za statystykami, w 2020 roku przybyło 604 127 nowych rozpoznań i 341 831 zgonów z powodu raka szyjki macicy. Dwie trzecie spośród wszystkich przypadków jest stwierdzanych w krajach o niskim poziomie rozwoju gospodarczego. Niemniej, za sprawą programów profilaktycznych, do których należą szczepienia populacyjne przeciwko wirusom brodawczaka ludzkiego oraz badania przesiewowe, rak szyjki macicy jest uznawany za jeden z nielicznych nowotworów, którym można skutecznie zapobiegać. Jednym z kluczowych celów WHO na kolejne lata jest doprowadzenie globalnie do eliminacji raka szyjki macicy z problemów zdrowia publicznego. Wciąż jednak niedostatecznie wiele krajów wprowadziło szczepienia przeciwko HPV do kalendarzy szczepień obowiązkowych. Dopóki nie zostanie osiągnięty optymalny poziom wyszczepienia populacyjnego, bardzo istotne jest stałe doskonalenie programów skriningowych, aby skutecznie i efektywnie kosztowo wykrywać i leczyć stany przednowotworowe szyjki macicy na wczesnych etapach zaawansowania.

Cele: Zasadniczym celem pracy była ocena wartości diagnostycznej testu immunocytochemicznego identyfikującego koekspresję biomarkerów p16/Ki-67 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji i raka szyjki macicy.

Material i metody: Do badania zakwalifikowano 93 kobiety w wieku od 20 do 70 lat, wszystkie posiadające nieprawidłowy wynik cytologii lub kliniczne podejrzenie istotnej patologii szyjki macicy. U każdej pacjentki wykonano następujące testy diagnostyczne: cytologię na podłożu płynnym (LBC), test molekularny identyfikujący DNA wirusa brodawczaka ludzkiego (test DNA HPV) oraz test immunocytochemiczny wykrywający biomarkery p16 i Ki-67 (test p16/Ki-67, CINtec® PLUS). Metodą rozstrzygającą, decydującą o przydziale pacjentek odpowiednio do grupy badanej i kontrolnej, była ocena histopatologiczna wycinków szyjki macicy pobranych w sposób celowany w kolposkopii.

Wyniki: Wszystkie narzędzia diagnostyczne porównywane w ramach tej pracy charakteryzowały się wysoką czułością, lecz niską swoistością w wykrywaniu

śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy w stopniu co najmniej umiarkowanym (CIN2+/HSIL).

Spośród wszystkich kobiet uczestniczących w badaniu u 65,6% (61/93) stwierdzono dodatni odczyn immunocytochemiczny na p16/Ki-67. W procesie wykrywania CIN2+ test immunocytochemiczny p16/Ki-67 wykazał czułość 84,0%, swoistość 41,2%, dodatnią wartość predykcyjną 34,4%, ujemną wartość predykcyjną 87,5%, iloraz wiarygodności wyniku dodatniego 1,43 i ujemnego 0,39.

Dokładność testu immunocytochemicznego była najwyższa spośród badanych metod (CINtec® PLUS 52,7% versus LBC 38,9%, test DNA HPV 49,5%).

Dodatkowo porównano w badaniach przesiewowych pojedyncze narzędzia diagnostyczne oraz modele połączone: cytodiagnostykę uzupełnioną metodą immunocytochemiczną oraz test DNA HPV łącznie z dwubarwnym testem p16/Ki-67. Oceniona wartość diagnostyczna modeli połączonych skринingu była niesatysfakcjonująca.

W populacji kobiet poniżej 30 roku życia test immunocytochemiczny odznaczał się wyższą czułością i niższą swoistością w porównaniu do kobiet po ukończeniu 30 roku życia (SENS 100% vs 76,4%, SPEC 27,8% vs 46,0%).

Test p16/Ki-67, jako narzędzie wtórne, zwiększał wykrywalność CIN2+ wśród kobiet z mniejszymi nieprawidłowościami cytologicznymi jak ASC-US i LSIL (SENS LBC samodzielnie 25,0% vs LBC w połączeniu z CINtec® PLUS 50,0%) oraz u kobiet z dodatnim wynikiem testu DNA HPV dla innych wysokoonkogennych typów niż HPV 16/18 (SENS HR-HPV samodzielnie 48,0% vs HR-HPV w połączeniu z CINtec® PLUS 88,0%).

Wnioski: Analiza porównawcza testu molekularnego identyfikującego DNA HPV HR oraz testu immunocytochemicznego p16/Ki-67 wskazuje na satysfakcjonującą czułość i niedostateczną swoistość obu metod użytych jako pierwotne narzędzie skринingu w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Ta niska swoistość generuje dużą ilość wyników fałszywie dodatnich w badaniach przesiewowych. Metoda immunocytochemicznej detekcji p16/Ki-67 charakteryzuje się najwyższą dokładnością wykrywania CIN2+, wobec czego może stanowić użyteczne narzędzie drugorzutowe skринingu, jako narzędzie doprecyzowujące wskazania do etapu pogłębionego, powodujące redukcję ilości niepotrzebnie wykonywanych kolposkopii.

9. Abstract.

Assessment of the diagnostic value of p16/Ki67 immunocytochemistry for HSIL detection and verification of abnormal results of Pap smears and positive HPV testing.

Introduction: Cervical cancer is one of the most common malignancies in women worldwide. According to the statistics, there were 604 127 new cases and 341 831 deaths due to cervical cancer in 2020. Two-thirds of them occurred in the least developed countries. However, thanks to screening programmes and HPV vaccinations, cervical cancer is the most preventable of all female cancers. There is even the global strategy from the World Health Organization to eliminate the disease as a public health problem. As long as the global population is not fully protected to HPV infection, and a lot of countries still had not introduced the HPV vaccine into their national immunization schedules, we need to improve a high-quality and cost-effective cervical cancer screening to provide early detection and treatment of the premalignant lesions.

Aim: The goal of this study was to analyze the diagnostic value of p16/Ki-67 immunocytochemical staining in the detection of high-grade squamous intraepithelial lesions.

Material and methods: A total of 93 women, aged 20 to 70 years, mostly with abnormal results of the Pap smear or clinical suspicion of substantial cervical lesions were enrolled in this study. All of them were tested with LBC, DNA HR-HPV test and p16/Ki-67 dual-stained cytology (CINtec® PLUS). Colposcopy-guided biopsy results of CIN2+/HSIL were used as clinical endpoints.

Results: All diagnostic methods compared in this study demonstrated high sensitivity but low specificity for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse.

65,6 percent of examined women (61/93) had positive evaluation of the p16/Ki-67 test. For CIN2+ detection the sensitivity of p16/Ki-67 dual staining was 84,0%, specificity 41,2%, positive predictive value 34,4%, negative predictive value 87,5%, positive likelihood ratio 1,43, negative likelihood ratio 0,39.

The accuracy of CINtec® PLUS was the highest from all of the methods used in this study (for the p16/Ki-67 immunocytochemistry the level was 52,7% versus LBC 38,9%, HPV test 49,5%).

We also compared single tests and co-testing LBC with p16/Ki-67 or HPV test with p16/Ki-67, and the results of the combined methods were unsatisfactory.

In the population of young adults under 30, p16/Ki-67 dual staining had higher sensitivity and lower specificity then in older women ≥ 30 years of age (SENS 100% vs 76,4%, SPEC 27,8% vs 46,0%).

p16/Ki-67 increased the detection of CIN2+ in the triage of women with minor abnormalities in cytology like ASC-US and LSIL (SENS LBC 25,0% vs LBC with CINtec® PLUS 50,0%) and in the triage of women HPV-positive for other high-risk genotypes than 16/18 (SENS HR-HPV 48,0% vs HR-HPV with CINtec® PLUS 88,0%).

Conclusion: Comparision of the molecular identification of HPV DNA and immunocytochemical detection of biomarkers p16 and Ki-67 provide high sensitivity but dissapointing specificity of both methods in the screening of cervical intraepithelial neoplasia or cancer. This low specificity generates high amount of false positive results of the primary screening. p16/Ki-67 immunocytochemistry characterized by highest accuracy in the detection of CIN2+ is an usefull tool in the second stage of screening to reduce colposcopy referrals and avoid excessive diagnosis and treatment.

10. Spis tabel, wykresów i rycin.

10.1. Tabele.

<i>Tabela 1. Porównanie zmian w nazewnictwie stanów przednowotworowych raka szyjki macicy (według WHO).....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 2. Rozkład wieku populacji zrekrutowanej do badania.</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 3. Liczebność w grupach z poszczególnymi rozpoznaniem cytologicznymi wśród pacjentek zakwalifikowanych do badania.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4. Skala Reida.</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 5. Modelowa tabela kontyngencji 2x2.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 6. Liczebność populacji z podziałem na grupy wiekowe poniżej i powyżej 30 r.ż.</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 7. Liczba i procent uzyskanych wyników histopatologicznych dla całej populacji.</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 8. Uzyskane wyniki histopatologiczne z podziałem populacji na dwie grupy wiekowe (liczba oraz rozkład procentowy wyników w obrębie danej grupy wiekowej). 61</i>	
<i>Tabela 9. Uzyskane wyniki histopatologiczne z podziałem populacji na dwie grupy wiekowe (liczba oraz odsetek pacjentek w określonym wieku w obrębie poszczególnych rozpoznań histopatologicznych).</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 10. Liczba i procent uzyskanych wyników histopatologicznych w grupie CIN2+.</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 11. Liczba poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w podgrupach utworzonych na podstawie przesiewowych wyników cytodiagnostyki.</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 12. Genotypy wirusa brodawczaka ludzkiego izolowane w teście molekularnym DNA HPV. Wyodrębniono podgrupy utworzone na podstawie ostatecznego rozpoznania histopatologicznego.</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 13. Liczba i odsetek poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w podgrupach utworzonych na podstawie przesiewowych wyników testu DNA HPV.</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 14. Liczba i procent poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w podgrupach utworzonych na podstawie wyników przesiewowych badań z użyciem testu p16/Ki-67.</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 15. Wartość diagnostyczna testu p16/Ki-67 w wykrywaniu zmian CIN2+/HSIL w zależności od wieku badanych kobiet.</i>	<i>71</i>

<i>Tabela 16. Dodatnie odczyny CINtec® PLUS stwierdzane w poszczególnych podgrupach cytologicznych.</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 17. Dodatnie odczyny CINtec® PLUS w zależności od statusu HPV w teście molekularnym identyfikującym DNA wirusa brodawczaka ludzkiego.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 18. Wyniki badań przesiewowych dla zmian histopatologicznych CIN2+.</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 19. Ocena wartości diagnostycznej poszczególnych narzędzi skriningowych w wykrywaniu CIN2+ (biopsja jako wartość referencyjna).....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 20. Statystyka opisowa krzywych ROC modeli diagnostycznych w wykrywaniu zmian CIN2+.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 21. Ocena wartości diagnostycznej poszczególnych narzędzi skriningowych w wykrywaniu CIN3+ (biopsja jako wartość referencyjna).....</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 22. Statystyka opisowa krzywych ROC modeli diagnostycznych w wykrywaniu zmian CIN3+.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 23. Porównanie wartości diagnostycznej badań przesiewowych prowadzonych w grupach kobiet <30r.ż. i ≥30r.ż. (biopsja CIN2+ jako wartość referencyjna).....</i>	<i>84</i>
<i>Tabela 24. Porównanie zdolności wykrywczych samej cytodiagnostyki do cytodiagnostyki uzupełnionej oceną immunocytochemiczną w sytuacji wyników niejednoznacznych (ASC-US i LSIL).</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 25. Porównanie zdolności wykrywczych testu DNA HPV do testu molekularnego uzupełnionego oceną immunocytochemiczną w sytuacji wyników niejednoznacznych (HPV HR pozytywny dla genotypów innych niż 16 i/lub 18).</i>	<i>87</i>

10.2. Wykresy.

<i>Wykres 1. Globalna zachorowalność na nowotwory złośliwe u kobiet w 2020 roku (źródło danych: GLOBOCAN 2020).</i>	<i>7</i>
<i>Wykres 2. Zapadalność i umieralność z powodu 15 najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet na świecie w 2020 roku z podziałem na kraje o wysokim/bardzo wysokim oraz niskim/średnim wskaźniku rozwoju społecznego (źródło danych: GLOBOCAN 2020).</i>	<i>9</i>
<i>Wykres 3. Zapadalność i umieralność na raka szyjki macicy na świecie w 2020 roku z podziałem na rejony geograficzne (źródło danych: GLOBOCAN 2020).</i>	<i>11</i>
<i>Wykres 4. Szacowana zapadalność i umieralność na raka szyjki macicy w 27 krajach Unii Europejskiej w 2020 roku (źródło danych: ECIS).</i>	<i>12</i>

<i>Wykres 5. Rozkład wieku badanej populacji (wiek w latach, n=93).</i>	59
<i>Wykres 6. Rozkład procentowy uzyskanych wyników histopatologicznych dla całej populacji (n=93).</i>	61
<i>Wykres 7. Rozkład procentowy uzyskanych wyników histopatologicznych w grupie CIN2+ (n=25).</i>	63
<i>Wykres 8. Nieprawidłowe wyniki cytologii wg TBS (n=78).</i>	64
<i>Wykres 9. Rozkład uzyskanych wyników histopatologii w podgrupach cytologicznych.</i>	65
<i>Wykres 10. Odsetek dodatnich wyników testu przesiewowego DNA HPV wraz ze wzrostem zaawansowania zmian histopatologicznych. Wykres obrazuje trend wzrastający.</i>	67
<i>Wykres 11. Rozkład procentowy zmian histopatologicznych wśród kobiet z dodatnim odczynem CINtec® PLUS.</i>	68
<i>Wykres 12. Odsetek dodatnich wyników testu przesiewowego p16/Ki-67 wraz ze wzrostem zaawansowania zmian histopatologicznych. Wykres obrazuje trend wzrastający.</i>	69
<i>Wykres 13. Udział procentowy dodatnich i ujemnych odczynów CINtec® PLUS w poszczególnych podgrupach histopatologicznych.</i>	70
<i>Wykres 14. Wzrastający stopień nasilenia dodatnich odczynów CINtec® PLUS wraz z rosnącymi nieprawidłowościami cytoonkologicznymi w LBC.</i>	72
<i>Wykres 15. Iloraz szans (OR) na wystąpienie jednocześnie dodatnich wyników obu testów czyli p16/Ki-67(+) oraz DNA HPV(+). OR=9,92 (95% CI 3,46-28,41).</i>	73
<i>Wykres 16. Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności testów wykorzystanych w badaniach przesiewowych dla zmian CIN2+.</i>	76
<i>Wykres 17. Krzywa ROC dla cytologii. AUC = 0,59 (95% CI 0,54-0,66).</i>	78
<i>Wykres 18. Krzywa ROC dla testu DNA HPV. AUC = 0,63 (95% CI 0,55-0,71).</i>	78
<i>Wykres 19. Krzywa ROC dla testu p16/Ki-67. AUC = 0,63 (95% CI 0,53-0,72).</i>	79
<i>Wykres 20. Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności testów wykorzystanych w badaniach przesiewowych dla zmian CIN3+.</i>	81
<i>Wykres 21. Krzywa ROC dla cytologii. AUC = 0,58 (95% CI 0,54-0,62).</i>	82
<i>Wykres 22. Krzywa ROC dla testu DNA HPV. AUC = 0,63 (95% CI 0,56-0,71).</i>	82
<i>Wykres 23. Krzywa ROC dla testu p16/Ki-67.</i>	83

<i>Wykres 24. Porównanie czułości testów diagnostycznych w dwóch grupach wiekowych.</i>	85
<i>Wykres 25. Porównanie swoistości testów diagnostycznych w dwóch grupach wiekowych.</i>	85
<i>Wykres 26. Porównanie dokładności testów diagnostycznych w dwóch grupach wiekowych.</i>	85

10.3. Ryciny.

<i>Rycina 1. Molekularne i komórkowe procesy zaangażowane w kancerogenezę na podłożu infekcji wysokoonkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego - opis w tekście (utworzono na podstawie: World Cancer Report, IARC, 2020).</i>	20
<i>Rycina 2. Historia naturalna raka szyjki macicy. Procenty odzwierciedlają dane szacunkowe dotyczące konsekwencji zakażenia HPV w ciągu życia kobiety, w przypadku braku działań profilaktycznych czyli szczepień ochronnych i badań przesiewowych oraz wczesnego leczenia zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy (utworzono na podstawie: P. Sasieni, Cancer Research, Wielka Brytania).</i>	21
<i>Rycina 3. Patomechanizm odpowiedzialny za nadekspresję p16 w komórce w odpowiedzi na działanie onkoproteiny E7 wirusa brodawczaka ludzkiego (objaśnienie w tekście).</i>	40
<i>Rycina 4. Dodatni odczyn CIntec® PLUS. W jednej komórce zachodzi podwójne czerwono-brązowe barwienie, co oznacza koekspresję p16/Ki67.</i>	42
<i>Rycina 5. Detekcja ludzkiego białka p16^{INK4a}.</i>	51
<i>Rycina 6. Detekcja ludzkiego białka Ki-67.</i>	52

11. Piśmiennictwo.

- ¹ Wild, C. P., Weiderpass, E., Stewart B. W., editors (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <http://publications.iarc.fr/586>. Licencja: CC BY-NC-ND 3.0 IGO. Dostęp z dnia: 21/03/2020.
- ² Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249. doi: 10.3322/caac.21660
- ³ De Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*, 141(4), 664–670. doi:10.1002/ijc.30716
- ⁴ International Monetary Fund. (2020). *World Economic Outlook: A Long and Difficult Ascent*. Washington, DC, October.
- ⁵ Jansen, E. E. L., Zielonke, N., Gini, A., Anttila, A., Segnan, N., Vokó, Z., ... Priaulx, J. (2020). Effect of organised cervical cancer screening on cervical cancer mortality in Europe: a systematic review. *European Journal of Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2019.12.013
- ⁶ ECIS - European Cancer Information System. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu> Dostęp z dnia: 03/07/2021 © European Union, 2021
- ⁷ Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., ... Estève, J. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet*, 391(10125), 1023–1075. doi:10.1016/s0140-6736(17)33326-3
- ⁸ Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021, Human Papillomavirus (HPV) Infection. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/hpv.htm> Dostęp z dnia: 26/07/2021.
- ⁹ Olusola, P., Banerjee, H. N., Philley, J. V., & Dasgupta, S. (2019). Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*, 8(6), 622. doi:10.3390/cells8060622
- ¹⁰ A call to action to eliminate cervical cancer globally. <https://www.uicc.org/news/a%C2%A0call-action-eliminate-cervical-cancer-globally> Dostęp z dnia: 11/03/2021
- ¹¹ Cervical Cancer: An NCD We Can Overcome. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/cervical-cancer-an-ncd-we-can-overcome> Dostęp z dnia: 11/03/2021
- ¹² Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva: World Health Organization; 2020. Licencja: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Dostęp z dnia: 21/03/2021.

-
- ¹³ Szymonowicz, K. A., Chen, J. (2020). Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biology & Medicine*, 17(4), 864-878. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370
- ¹⁴ Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. doi:10.1016/s2214-109x(16)30143-7
- ¹⁵ Clifford, G. M., Smith, J. S., Aguado, T., & Franceschi, S. (2003). Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 89(1), 101–105. doi:10.1038/sj.bjc.6601024
- ¹⁶ Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., ... Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12–19. doi:10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f
- ¹⁷ Zur Hausen, H. (2001). Oncogenic DNA viruses. *Oncogene*, 20(54), 7820–7823. doi:10.1038/sj.onc.1204958
- ¹⁸ Zur Hausen, H. (1994). Molecular Pathogenesis of Cancer of the Cervix and Its Causation by Specific Human Papillomavirus Types. *Human Pathogenic Papillomaviruses*, 131–156. doi:10.1007/978-3-642-78487-3_8
- ¹⁹ Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17. doi:10.1128/cmr.16.1.1-17.2003
- ²⁰ List of classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, IARC Monographs. https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Classifications_by_cancer_site.pdf Dostęp z dnia: 26/03/2021.
- ²¹ Jach, R., Galarowicz, B., Huras, H., Pawlik, D., Basta, T., Streb, J., Wolski, H., Ludwin, A., Ludwin, I. (2014). Vertical transmission of HPV in pregnancy. A prospective clinical study of HPV-positive pregnant women. *Transmisja wertykalna HPV w ciąży. Prospektywne badanie kliniczne HPV-dodatnich ciężarnych. Ginekologia Polska*, 85, 672-676. PMID: 25322538
- ²² Wardak, S. (2016). Wirus brodawczaka ludzkiego (Human Papilloma Virus - HPV) a rak szyjki macicy. *Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 1(68), 73-84.
- ²³ Wiciński, M., Leis, K., Malinowski, B., Węclewicz, M. M., Grześk, E., Grześk, G. (2018) *PAPILLOMAWIRUSY: HPV JAKO CZYNNIK ETIOLOGICZNY NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI. Postępy Mikrobiologii*, 57(1), 33–40. <http://www.pm.microbiology.pl> DOI: 10.21307/PM-2018.57.1.033
- ²⁴ Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55–F70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- ²⁵ Hickman, E. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(1), 60–66. doi:10.1016/s0959-437x(01)00265-9
- ²⁶ Shafi, M., & Nazeer, S. (n.d.). Natural history of cervical carcinoma, HPV, and vaccination. *Colposcopy*, 11–15. doi:10.1017/cbo9781139136433.006

-
- ²⁷ Kędzia, W., Karowicz-Bilińska, A., Spaczyński, M. (2012). *Nowotwory szyjki macicy. Praktyczna Ginekologia Onkologiczna*. ISBN: 978-83-934859-0-1
- ²⁸ Franco, E. L., Duarte-Franco, D., Ferenczy, A. (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal*, 164, 1017-1025.
- ²⁹ Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C. (2001). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 315-318.
- ³⁰ Malarewicz, A., Florczak, K. (2006). *Zmiany w komórkach nabłonkowych. Cytologia fazowo-kontrastowa w diagnostyce ginekologicznej*. ISBN: 978-83-60679-01-2
- ³¹ Kędzia, H., Kędzia, W. (2010). *Nowotwory narządów płciowych kobiety. Diagnostyka patomorfologiczna. Postępowanie kliniczne*. ISBN: 978-83-604-6691-9
- ³² Darragh, T. M., Colgan, T. J., Cox, J. T., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., ... Wilbur, D. C. (2012). The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 16(3), 205–242. doi:10.1097/lgt.0b013e31825c31dd
- ³³ Global Action Plan for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases 2013–2020. Geneva: World Health Organization; 2013. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/94384> Dostęp z dnia: 02/10/2020.
- ³⁴ Joura, E. A., Giuliano, A. R., Iversen, O.-E., Bouchard, C., Mao, C., Mehlsen, J., ... Luxembourg, A. (2015). A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *New England Journal of Medicine*, 372(8), 711–723. doi:10.1056/nejmoa1405044
- ³⁵ Bruni, L., Diaz, M., Barrionuevo-Rosas, L., Herrero, R., Bray, F., Bosch, F. X., ... Castellsagué, X. (2016). Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *The Lancet Global Health*, 4(7), e453–e463. doi:10.1016/s2214-109x(16)30099-7
- ³⁶ Wilson, J. M. G., Jungner, G. (1968). Principles and practice of screening for disease. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37650>
- ³⁷ Lalkhen, A. G., & McCluskey, A. (2008). Clinical tests: sensitivity and specificity. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 8(6), 221–223. doi:10.1093/bjaceaccp/mkn041
- ³⁸ Michalas, S. P. (2000). The Pap test: George N. Papanicolaou (1883–1962). *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 90(2), 135–138. doi:10.1016/s0301-2115(00)00260-8
- ³⁹ Shaw, P. A. (2000). The History of Cervical Screening I: The Pap. Test. *Journal SOGC*, 22(2), 110–114. doi:10.1016/s0849-5831(16)31416-1
- ⁴⁰ TAMBOURET, R. H. (2013). The Evolution of the Papanicolaou Smear. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 56(1), 3–9. doi:10.1097/grf.0b013e318282b982
- ⁴¹ The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. (1989). *JAMA*, 262(7), 931-4. PMID: 2754794.

-
- ⁴² Solomon, D. (2002). The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*, 287(16), 2114. doi:10.1001/jama.287.16.2114
- ⁴³ Gibb, R. K., Martens, M. G. (2011). The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 4(1), S2-S11. PMID: 21617785
- ⁴⁴ LEE, K., ASHFAQ, R., BIRDSONG, G., CORKILL, M., MCINTOSH, K., & INHORN, S. (1997). Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin-layer system for cervical cancer screening. *Obstetrics & Gynecology*, 90(2), 278–284. doi:10.1016/s0029-7844(97)00228-7
- ⁴⁵ Hoste, G., Vossaert, K., & Poppe, W. A. J. (2013). The Clinical Role of HPV Testing in Primary and Secondary Cervical Cancer Screening. *Obstetrics and Gynecology International*, 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/610373
- ⁴⁶ Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. (2012). *Obstetrics & Gynecology*, 120(5), 1222-38. doi: 10.1097/aog.0b013e318277c92a
- ⁴⁷ Bouchard-Fortier, G., Hajifathalian, K., McKnight, M. D., Zacharias, D. G., & Gonzalez-Gonzalez, L. A. (2013). Co-testing for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer compared with cytology alone: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Public Health*, 36(1), 46–55. doi:10.1093/pubmed/fdt057
- ⁴⁸ Abraham, J., Stenger, M. (2014). Cobas HPV test for first-line screening for cervical cancer. *The Journal of Community and Supportive Oncology*, 12(5), 156-157. doi: 10.12788/jcso.0039
- ⁴⁹ Schlichte, M., & Guidry, J. (2015). Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines. *Journal of Clinical Medicine*, 4(5), 918-932. doi:10.3390/jcm4050918
- ⁵⁰ Wright, T. C., Stoler, M. H., Behrens, C. M., Sharma, A., Zhang, G., & Wright, T. L. (2015). Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecologic Oncology*, 136(2), 189–197. doi:10.1016/j.ygyno.2014.11.076
- ⁵¹ Goodman, A. (2015). HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ*, 350(jun30 1), h2372–h2372. doi:10.1136/bmj.h2372
- ⁵² Ogilvie, G., Nakisige, C., Huh, W. K., Mehrotra, R., Franco, E. L., & Jeronimo, J. (2017). Optimizing secondary prevention of cervical cancer: Recent advances and future challenges. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 138, 15–19. doi:10.1002/ijgo.12187
- ⁵³ Arrossi, S., Thouyaret, L., Laudi, R., Marín, O., Ramírez, J., Paolino, M., ... Campanera, A. (2015). Implementation of HPV-testing for cervical cancer screening in programmatic contexts: The Jujuy demonstration project in Argentina. *International Journal of Cancer*, 137(7), 1709–1718. doi:10.1002/ijc.29530
- ⁵⁴ Sitarz, K., Szostek, S. (2019). Food and Drug Administration - approved molecular methods for detecting human papillomavirus infection. *Ginekologia Polska*. 90, 104-108.
- ⁵⁵ Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. doi:10.1097/coh.0b013e32833ed177

-
- ⁵⁶ Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2011). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, 130(8), 1715–1725. doi:10.1002/ijc.27316
- ⁵⁷ Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., & Peters, G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 859–867. doi:10.1128/mcb.16.3.859
- ⁵⁸ Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. doi:10.1007/s00412-018-0659-8
- ⁵⁹ Silva, D. C., Gonçalves, A. K., Cobucci, R. N., Mendonça, R. C., Lima, P. H., & Cavalcanti, G. (2017). Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. *Pathology - Research and Practice*, 213(7), 723–729. doi:10.1016/j.prp.2017.03.003
- ⁶⁰ Valenti, G., Vitale, S. G., Tropea, A., Biondi, A., & Laganà, A. S. (2017). Tumor markers of uterine cervical cancer: a new scenario to guide surgical practice? *Updates in Surgery*, 69(4), 441–449. doi:10.1007/s13304-017-0491-3
- ⁶¹ De Freitas, A. C., Coimbra, E. C., & Leitão, M. da C. G. (2014). Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(2), 91–103. doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.004
- ⁶² Fang, J., Zhang, H., & Jin, S. (2014). Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumor Biology*, 35(6), 5083–5093. doi:10.1007/s13277-014-1737-z
- ⁶³ Kremer, W. W., Steenbergen, R. D. M., Heideman, D. A. M., Kenter, G. G., & Meijer, C. J. L. M. (2020). The use of host cell DNA methylation analysis in the detection and management of women with advanced cervical intraepithelial neoplasia: a review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. doi:10.1111/1471-0528.16395
- ⁶⁴ Fusco, E., Padula, F., Mancini, E., Cavaliere, A., Grubisic, G. (2008). History of colposcopy: a brief biography of Hinselmann. *Journal of Prenatal Medicine*, 2(2), 19–23. PMID: 22439022
- ⁶⁵ Shafi, M., & Nazeer, S. (n.d.). Basic principles of colposcopy. *Colposcopy*, 1–6. doi:10.1017/cbo9781139136433.004
- ⁶⁶ Shafi, M., & Nazeer, S. (n.d.). The normal cervix and colposcopic appearance. *Colposcopy*, 7–10. doi:10.1017/cbo9781139136433.005
- ⁶⁷ KOLPOSKOPIA 2020: POLSKA NOMENKLATURA KOLPOSKOPOWA w oparciu o mianownictwo IFCPC 2011 Podsumowanie Konsensusu Ekspertów Rekomendacje Grupy Ekspertów PTGiP oraz PTKiPSM. <http://sekcjahpvptgip.pl/rekomendacje/> Dostęp z dnia: 01/02/2021.
- ⁶⁸ KOLPOSKOPIA 2020: PROTOKOŁY KOLPOSKOPOWE Podsumowanie Konsensu Ekspertów Rekomendacje PTKiPSM oraz PTGiP. <http://sekcjahpvptgip.pl/rekomendacje/> Dostęp z dnia: 01/02/2021.

-
- ⁶⁹ Leeson, S. (2014). Advances in colposcopy: new technologies to challenge current practice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 182, 140–145. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.09.016
- ⁷⁰ Khan, M. J., Werner, C. L., Darragh, T. M., Guido, R. S., Mathews, C., Moscicki, A.-B., ... Huh, W. K. (2017). ASCCP Colposcopy Standards. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 21(4), 223–229. doi:10.1097/lgt.0000000000000338
- ⁷¹ Tjalma, W. A. A. (2017). Diagnostic performance of dual-staining cytology for cervical cancer screening: A systematic literature review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 210, 275–280. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.01.009
- ⁷² Yu, L., Fei, L., Liu, X., Pi, X., Wang, L., & Chen, S. (2019). Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *Journal of Cancer*, 10(12), 2654–2660. doi:10.7150/jca.32743
- ⁷³ CINtec® PLUS - informacje o produkcji firmy Roche Diagnostics. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/tests/cintec-plus.html> Dostęp z dnia: 25/03/2021
- ⁷⁴ Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., ... Angeloni, C. (2013). Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(20), 1550–1557. doi:10.1093/jnci/djt235
- ⁷⁵ Nasierowska-Guttmejer, A., Kędzia, W., Rokita, W., et al. (2016). Polish recommendations regarding diagnostics and treatment of cervical squamous intraepithelial lesions according to the CAP/ASCCP guidelines. *Ginekologia Polska*, 87(9), 670–676. doi: 10.5603/GP.2016.0066
- ⁷⁶ Uijterwaal, M. H., Witte, B. I., Van Kemenade, F. J., Rijkaart, D., Ridder, R., Berkhof, J., ... Meijer, C. J. L. M. (2014). Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. *British Journal of Cancer*, 110(6), 1579–1586. doi:10.1038/bjc.2014.34
- ⁷⁷ White, C., Bakhtiet, S., Bates, M., Keegan, H., Pilkington, L., Ruttle, C., ... Martin, C. M. (2016). Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*, 27(4), 269–276. doi:10.1111/cyt.12317
- ⁷⁸ Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology*, 119(3), 158–166. doi:10.1002/cncy.20140
- ⁷⁹ Bergeron, C., Ikenberg, H., Sideri, M., Denton, K., Bogers, J., ... Schmidt, D. (2015). Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathology*, 123(6), 373–381. doi:10.1002/cncy.21542
- ⁸⁰ Uijterwaal, M. H., Polman, N. J., Witte, B. I., van Kemenade, F. J., Rijkaart, D., Berkhof, J., ... Meijer, C. J. L. M. (2014). Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and longitudinal data. *International Journal of Cancer*, 136(10), 2361–2368. doi:10.1002/ijc.29290

-
- ⁸¹ Wentzensen, N., Fetterman, B., Castle, P. E., Schiffman, M., Wood, S. N., Stiemerling, E., ... Kinney, W. (2015). p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(12), djv257. doi:10.1093/jnci/djv257
- ⁸² Luttmer, R., Dijkstra, M. G., Snijders, P. J. F., Berkhof, J., van Kemenade, F. J., Rozendaal, L., ... Meijer, C. J. L. M. (2016). p16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. *Modern Pathology*, 29(8), 870–878. doi:10.1038/modpathol.2016.80
- ⁸³ Ebisch, R. M., van der Horst, J., Hermsen, M., Rijstenberg, L. L., Vedder, J. E., Bulten, J., ... Siebers, A. G. (2017). Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Modern Pathology*, 30(7), 1021–1031. doi:10.1038/modpathol.2017.16
- ⁸⁴ Wright, T. C., Behrens, C. M., Ranger-Moore, J., Rehm, S., Sharma, A., Stoler, M. H., & Ridder, R. (2017). Triage HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecologic Oncology*, 144(1), 51–56. doi:10.1016/j.ygyno.2016.10.031
- ⁸⁵ Arbyn, M., Redman, C. W. E., Verdoodt, F., Kyrgiou, M., Tzafetas, M., Ghaem-Maghamsi, S., ... Moss, E. L. (2017). Incomplete excision of cervical precancer as a predictor of treatment failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 18(12), 1665–1679. doi:10.1016/s1470-2045(17)30700-3
- ⁸⁶ Polman, N. J., Uijterwaal, M. H., Witte, B. I., Berkhof, J., van Kemenade, F. J., Spruijt, J. W. M., ... Meijer, C. J. L. M. (2016). Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *International Journal of Cancer*, 140(2), 423–430. doi:10.1002/ijc.30449
- ⁸⁷ Cervical Screening Programme, England - 2019-20 [NS]. <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/cervical-screening-annual/england---2019-20/cervical-cytology> Dostęp z dnia: 08/11/2021.
- ⁸⁸ Peeters, E., Wentzensen, N., Bergeron, C., & Arbyn, M. (2019). Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathology*, 127(3), 169-180. doi: 10.1002/cncy.22103.
- ⁸⁹ Cuzick, J., Thomas Cox, J., Zhang, G., Einstein, M. H., Stoler, M., Trupin, S., & Behrens, C. M. (2012). Human papillomavirus testing for triage of women with low-grade squamous intraepithelial lesions. *International Journal of Cancer*, 132(4), 959–966. doi:10.1002/ijc.27723
- ⁹⁰ Castle, P. E., Sideri, M., Jeronimo, J., Solomon, D., & Schiffman, M. (2007). Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197(4), 356.e1–356.e6. doi:10.1016/j.ajog.2007.07.049
- ⁹¹ Arbyn, M., Roelens, J., Martin-Hirsch, P., Leeson, S., & Wentzensen, N. (2011). Use of HC2 to triage women with borderline and mild dyskaryosis in the UK. *British Journal of Cancer*, 105(7), 877–880. doi:10.1038/bjc.2011.351
- ⁹² Ratnam, S., Jang, D., Gilbert, L., Alaghehbandan, R., Schell, M., Needle, R., ... Chernesky, M. (2020). CINtec PLUS and cobas HPV testing for triaging canadian women

referred to colposcopy with a history of low grade squamous intraepithelial lesion: Baseline findings. *Papillomavirus Research*, 100206. doi:10.1016/j.pvr.2020.100206

⁹³ Tjalma, W. A. A., Kim, E., & Vandeweyer, K. (2017). *The impact on women's health and the cervical cancer screening budget of primary HPV screening with dual-stain cytology triage in Belgium*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 212, 171–181. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.01.010

⁹⁴ Roelens, J., Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., Wentzensen, N., Bergeron, C., & Arbyn, M. (2012). p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities. *Cancer Cytopathology*, 120(5), 294–307. doi:10.1002/cncy.21205

⁹⁵ Solomon, D., Schiffman, M., & Tarone, R. (2001). *Comparison of Three Management Strategies for Patients With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial*. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 293–299. doi:10.1093/jnci/93.4.293

⁹⁶ Tropé, A., Sjøborg, K. D., Nygård, M., Røysland, K., Campbell, S., Alfsen, G. C., & Jonassen, C. M. (2012). *Cytology and Human Papillomavirus Testing 6 to 12 Months after ASCUS or LSIL Cytology in Organized Screening To Predict High-Grade Cervical Neoplasia between Screening Rounds*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 1927–1935. doi:10.1128/jcm.00265-12

⁹⁷ Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., ... Meijer, C. J. L. M. (2003). *Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527. doi:10.1056/nejmoa021641

⁹⁸ Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., ... Schiffman, M. (2005). *The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(14), 1072–1079. doi:10.1093/jnci/dji187

⁹⁹ Arbyn, M., Xu, L., Verdoodt, F., Cuzick, J., Szarewski, A., Belinson, J. L., ... Khan, M. J. (2016). *Genotyping for Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Women With Minor Cervical Lesions*. *Annals of Internal Medicine*, 166(2), 118. doi:10.7326/m15-2735

¹⁰⁰ Huh, W. K., Ault, K. A., Chelmow, D., Davey, D. D., Goulart, R. A., Garcia, F. A. R., ... Einstein, M. H. (2015). *Use of Primary High-Risk Human Papillomavirus Testing for Cervical Cancer Screening*. *Obstetrics & Gynecology*, 125(2), 330–337. doi:10.1097/aog.0000000000000669

¹⁰¹ Sun, H., Shen, K., & Cao, D. (2019). *Progress in immunocytochemical staining for cervical cancer screening*. *Cancer Management and Research*, Volume 11, 1817–1827. doi:10.2147/cmar.s195349

¹⁰² Alaghebandan, R., Fontaine, D., Bentley, J., Escott, N., Ghatage, P., Lear, A., ... Ratnam, S. (2013). *Performance of proex c and prepect hpv-proofer e6/e7 mrna tests in comparison with the hybrid capture 2 hpv dna test for triaging ascus and lsil cytology*. *Diagnostic Cytopathology*, 41(9), 767–775. doi:10.1002/dc.22944

-
- ¹⁰³ Innes, C., Williman, J., Simcock, B., ... Sykes, P. (2020). Impact of human vaccination on rates of abnormal cervical cytology and histology in young New Zealand women. *New Zealand Medical Journal*, Volume 133 No 1508, 72-84.
- ¹⁰⁴ De Kok, I. M. C. M., van Rosmalen, J., Dillner, J., Arbyn, M., Sasieni, P., Iftner, T., & van Ballegooijen, M. (2012). Primary screening for human papillomavirus compared with cytology screening for cervical cancer in European settings: cost effectiveness analysis based on a Dutch microsimulation model. *BMJ*, 344(mar05 1), e670–e670. doi:10.1136/bmj.e670
- ¹⁰⁵ Petry, K. U., Breugelmans, J. G., Benard, S., ... Hillemanns, P. (2008). Cost of screening and treatment of cervical dyskaryosis in Germany. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 29, (4), 345-349.
- ¹⁰⁶ Petry, K. U., Schmidt, D., Scherbring, S., Luyten, A., Reinecke-Lüthge, A., Bergeron, C., ... Ridder, R. (2011). Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 505–509. doi:10.1016/j.ygyno.2011.02.033
- ¹⁰⁷ Petry, K. U., Barth, C., Wasem, J., & Neumann, A. (2017). A model to evaluate the costs and clinical effectiveness of human papilloma virus screening compared with annual papanicolaou cytology in Germany. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 212, 132–139. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.03.029