

5. STRESZCZENIE

WSTĘP

Rak szyjki macicy, zarówno na świecie jak i w Polsce, stanowi istotny problem kliniczny, także w zakresie zdrowia publicznego. Rozwój inwazyjnego raka szyjki macicy jest poprzedzony wieloletnim rozwojem dobrze zdefiniowanych stanów przedrakowych (prekursorów), które mogą być skutecznie wykrywane i leczone. Umożliwia to zmniejszenie zarówno zachorowalności jak i umieralności z powodu raka szyjki macicy, co odnotowano w wielu krajach na świecie dzięki wprowadzeniu badań przesiewowych. Współczynniki zachorowalności i umieralności w Polsce są wyższe niż w krajach Unii Europejskiej, które prowadzą dobrze zorganizowane programy badań profilaktycznych.

Do czynników ryzyka rozwoju raka szyjki macicy i jego prekursorów należą: wczesna inicjacja seksualna, liczne porody, ryzykowne zachowania seksualne kobiet i ich partnerów, stosowanie doustnej antykoncepcji, palenie tytoniu, zakażenie HIV. Jednak głównym i niezbędnym czynnikiem rozwoju raka szyjki macicy jest przetrwałe zakażenie onkogennym typem/typami wirusa brodawczaka ludzkiego (high risk human papillomavirus, HPV HR). Grupa HPV HR obejmuje genotypy: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 oraz 73. Uważa się, iż blisko 100% raków szyjki macicy jest związanych z zakażeniem HPV HR i wykazuje obecność DNA HPV różnych typów. Genotyp 16 stwierdzono w 58% przypadków zmian śród nabłonkowych dużego stopnia (CIN III) oraz w 63% przypadków inwazyjnego raka szyjki macicy. Stany przedrakowe szyjki macicy oraz wczesne postacie raka mogą być wykrywane metodą cytologii eksfoliatywnej, dostępnej na świecie od lat 40. XX wieku. W Polsce w programie profilaktyki raka szyjki macicy realizowanym od 2005 roku badania cytologiczne są dostępne dla kobiet w wieku 25-59 lat raz na 3 lata. Badania cytologiczne są także dostępne i dużo częściej wykonywane poza programem profilaktyki w ramach tzw. oportunistycznych badań przesiewowych na prośbę pacjentki lub inicjowanych przez ginekologów. Ocena rozmazów cytologicznych prowadzona jest wg systemu Bethesda. U kobiet z nieprawidłowym wynikiem cytologii wdraża się algorytmy postępowania obejmujące powtórzenie rozmazu, badanie kolposkopowe z weryfikacją histopatologiczną lub/ oraz wykonanie testu molekularnego na obecność HPV HR oraz kombinacje tych procedur. Obecnie w wielu krajach na świecie wdraża się lub już funkcjonują programy przesiewowe, oparte na testach HPV HR, jako samodzielne metody diagnostyczne lub w połączeniu

z badaniem cytologicznym w postaci tzw. kotestu. Według dostępnych danych literaturowych mają one wyższą czułość niż cytodiagnostyka, umożliwiając trafniejszą diagnostykę zmian śródnabłonkowych i w wyższym stopniu niż badanie cytologiczne zabezpieczają kobiety przed rozpoznaniem tzw. raków interwałowych czyli nowotworów diagnozowanych w interwale pomiędzy kolejnymi rundami badań po uzyskaniu ujemnego wyniku. Testy wykrywające zakażenie HPV HR są w Polsce dostępne komercyjnie w ofercie niektórych laboratoriów, a obecnie trwają prace nad włączeniem ich jako samodzielnych narzędzi diagnostycznych do programu profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy w Polsce. Przedmiotem niniejszego projektu jest określenie przydatności klinicznej komercyjnie dostępnych na polskim rynku testów HPV HR do stosowania w skryningu raka szyjki macicy poprzez ocenę ich wybranych parametrów i porównanie z parametrami certyfikowanego testu HPV BD Oncoclarity HPV Assay oraz parametrami cytodiagnostyki. Uzyskane wyniki badań mogą być przydatne w wyborze odpowiedniego schematu badań profilaktycznych w kierunku raka szyjki macicy w Polsce.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania realizowano w Klinice Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie oraz w Oddziale Położnictwa i Ginekologii z Pododdziałem Ginekologii Onkologicznej Szpitala Praskiego pw. Przemienienia Pańskiego w Warszawie w latach 2015-2020 po uzyskaniu zgód Komisji Bioetycznych nr 20/WIM/13 oraz KB/1236/20. Do badania włączono 98 pacjentek w przedziale wiekowym od 25 do 73 lat. Badania przeprowadzono u kobiet zakwalifikowanych do zabiegów operacyjnych, polegających na wycięciu całej szyjki macicy (amputacja szyjki macicy, wycięcie macicy drogą: przezpochwową, brzuszną, laparoskopową) lub jej fragmentu (konizacja szyjki macicy, elektrokonizacja szyjki macicy). W celu zapewnienia najwyższej jakości ostatecznego rozpoznania na podstawie badania histopatologicznego całej szyjki macicy nie włączono do badania pacjentek, u których jedyną wykonaną procedurą było diagnostyczne pobranie wycinków czyli biopsja szyjki macicy. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy, pierwszą z nich stanowiło 51 kobiet z rozpoznaniem lub podejrzeniem zmian śródnabłonkowych lub raka szyjki macicy w badaniu cytologicznym lub histologicznym. Druga grupa objęła 47 pacjentek z prawidłowym wynikiem badania cytologicznego, zakwalifikowanych do wyżej wymienionych operacji ze wskazań innych niż zmiany śródnabłonkowe i rak szyjki macicy (np. mięśniaki macicy). W ramach badania każdej pacjentce pobierano konwencjonalny rozmaz cytologiczny na szkiełko podstawowe w celu wykonania preparatu cytologicznego oraz na

podłoże płynne ThinPrep PreservCyt Solution na potrzeby oceny molekularnej certyfikowanym testem HPV HR. Badanie cytologiczne oceniano wg systemu Bethesda z 2014 roku w Zakładzie Patologii w Kielcach. Dodatkowo każdej pacjentce wykonywano ocenę kolposkopową, zgodnie z obowiązującymi standardami i opisywano zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowego Towarzystwa Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy 2011 roku. W celu uniknięcia wpływu wiedzy na temat wyników dotychczas wykonanych u pacjentek badań szyjki macicy na wyniki oceny cytologicznej i kolposkopowej, inny badacz-uczestnik kwalifikował pacjentki do projektu, a inny, zaślepiony pod względem wskazań do zabiegu operacyjnego oraz wyników poprzednich badań cytologicznych oraz histopatologicznych szyjki macicy, przeprowadzał ocenę kolposkopową. Skierowania na badania cytologiczne zawierały standardowe informacje kliniczne jak w rutynowych badaniach przesiewowych. Materiał potrzebny do wykonania komercyjnych testów HPV HR pobierano zgodnie z obowiązującymi w wybranych laboratoriach protokołami pobrania, przechowywania i transportu próbek. Pobrane wymazy przekazywano do trzech wybranych laboratoriów, które wykonywały oznaczenia za pomocą następujących testów HPV: test CLART HPV 2 (1 R, Lab. REX), test Alinity m HR HPV (2 D, Lab. DIAGNOSTYKA) oraz test AmpliSens HPV HCR-genotype-titre-FRT PCR kit (3 N, Lab. NUCLEAGENA). Materiał pobrany na podłoże płynne podczas wykonywania cytologii przesyłano do analizy z wykorzystaniem referencyjnego, certyfikowanego testu BD Oncoclarity HPV Assay do laboratorium ALFAMED w Zamościu. Otrzymane wyniki badań cytologicznych i molekularnych z poszczególnych laboratoriów oraz ocenę kolposkopową zestawiono z ostatecznym pooperacyjnym wynikiem histopatologicznym szyjki macicy, który posłużył w badaniu za tzw. „złoty standard” i rozpoznanie kliniczne. Preparaty pooperacyjne utrwalone w roztworze formaliny oceniano w Zakładzie Patomorfologii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie oraz w Zakładzie Patomorfologii Szpitala Solec w Warszawie.

Dla każdej z badanych metod diagnostycznych (cytodiagnostyka, testy HPV HR, ocena kolposkopowa) wyliczono czułość i swoistość. Kalkulacje wykonano na poziomie dwóch punktów odcięcia dyskryminujących wyniki prawidłowe od nieprawidłowych – dysplazji co najmniej średniego stopnia (CIN 2+) oraz dysplazji co najmniej wysokiego stopnia (CIN 3+). Wyniki cytologiczne podzielono na rozmazy prawidłowe (NILM – brak zmian śród nabłonkowych i procesu złośliwego) oraz nieprawidłowe (zmiany ASC-US lub bardziej zaawansowane) podobnie jak wyniki impresji kolposkopowej, gdzie wynik prawidłowy oznaczał brak zmian CIN, a wynik nieprawidłowy co najmniej mniejsze zmiany kolposkopowe według nomenklatury IFCPC z 2011 roku (Międzynarodowe Towarzystwo Kolposkopii

i Patologii Szyjki Macicy, ang. International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy). Badania diagnostyczne porównano pod względem poszczególnych parametrów i wyliczono odpowiednie ilorazy. Parametry poszczególnych badań zostały porównane za pomocą testu McNemara dla grup zależnych. Podstawowe statystyki zaraportowano w postaci licznosci i odsetków. Wszystkie zastosowane testy były dwustronne, a poziom istotności $<0,05$ uznano za statystycznie znamienne. Dla zastosowanych w projekcie testów HPV HR obliczono odsetki zgodności oraz współczynnik zgodności Kappa.

WYNIKI

Posługując się testem McNemara stwierdzono, że w wykrywaniu zmian CIN 2+ oraz zmian CIN 3+ wszystkie testy HPV HR cechują się statystycznie istotnie wyższą czułością w porównaniu z cytodiagnostyką (zarówno test certyfikowany jak i pozostałe). Badanie cytologiczne wykazuje statystycznie istotnie niższą czułość w wykrywaniu zmian CIN 2+ oraz zmian CIN 3+ w porównaniu z każdym kotestem, a także w porównaniu z oceną kolposkopową z punktem odcięcia na poziomie mniejszych zmian kolposkopowych.

Zarówno dla końcowego punktu odcięcia CIN 2+ jak i CIN 3+ przeprowadzona analiza nie wykazała statystycznie istotnej różnicy czułości i swoistości pomiędzy komercyjnymi testami HPV HR, a także pomiędzy żadnym z nich w zestawieniu z testem certyfikowanym. W omawianych grupach nie stwierdzono również statystycznie istotnej różnicy czułości i swoistości pomiędzy żadnym z kotestów.

W wykrywaniu zmian CIN 2+ oraz zmian CIN 3+ ocena kolposkopowa z punktem odcięcia na poziomie większych zmian kolposkopowych wykazuje statystycznie istotnie wyższą swoistość w porównaniu z wszystkimi testami molekularnymi jak i kotestami. Dodatkowo stwierdzono, że statystycznie istotnie wyższą czułość w wykrywaniu zmian CIN 2+ oraz zmian CIN 3+ prezentuje ocena kolposkopowa z przyjętym punktem końcowym na poziomie mniejszych zmian kolposkopowych w porównaniu z impresją kolposkopową z punktem końcowym na poziomie większych zmian kolposkopowych.

Analiza statystyczna wykazała wysoką zgodność pomiędzy wszystkimi badanymi metodami molekularnymi.

WNIOSKI

1. Wybrane, komercyjnie dostępne na polskim rynku testy HPV mają wysoką czułość i akceptowalną swoistość w wykrywaniu zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy.
2. Wybrane, komercyjnie dostępne na polskim rynku testy HPV HR cechuje wysoka zgodność wyników, zarówno z w zestawieniu z testem referencyjnym BD Oncoclarity HPV Assay jak i między sobą.
3. Parametry analizowanych testów HPV przemawiają za ich dużą przydatnością i włączeniem do badań przesiewowych w kierunku wczesnego wykrywania raka szyjki macicy w Polsce.
4. Wybrane, komercyjnie dostępne na polskim rynku testy HPV HR mają znacznie wyższą czułość niż badania cytologiczne w wykrywaniu zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy. Czuość kotestu nie różni się statystycznie istotnie od czuości testów molekularnych w wykrywaniu zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy. Wysoka czuość i swoistość oceny kolposkopowej potwierdza przydatność tej metody do weryfikacji nieprawidłowych wyników badań przesiewowych szyjki macicy

6. ABSTRACT

INTRODUCTION

Cervical cancer remains an important clinical and public health problem both worldwide and in Poland. The development of invasive cervical cancer is preceded by years of growth of well-defined precancerous conditions (precursors) that can be effectively detected and treated, reducing morbidity and mortality in patients with cervical cancer. Indeed, such reduction has been noted in many countries around the world with the introduction of screening. The incidence and mortality rates are higher in Poland than in European Union countries with well-organized preventive screening programs.

Risk factors for the development of cervical cancer and its precursors include early sexual initiation, multiparity, risky sexual behaviour of women and their partners, use of oral contraceptives, smoking, and HIV infection. However, the key factor in the development of cervical cancer is persistent infection with high-risk oncogenic human papillomavirus (HPV HR). The HPV HR group includes the following genotypes: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, and 73. Nearly 100% of cervical cancers are thought to be associated with HPV HR infection and show the presence of HPV DNA of various types. Genotype 16 was found in 58% of cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN III) and 63% of cases of invasive cervical cancer. Precancerous conditions of the cervix and early stages of cancer can be detected by exfoliative cytology, available worldwide since the 1940s. In Poland, cytological examinations are available for women aged 25-59 once every 3 years as part of the cervical cancer prevention programme implemented in 2005. Cytological examinations are also available and much more frequently performed outside the prophylaxis program as part of the so-called opportunistic screening at the patient's request or ordered by gynaecologists. Cytological smears are evaluated using the Bethesda system. In women with abnormal cytology results, management algorithms are implemented, including repeat smear, colposcopic examination with histopathological verification and/or molecular testing for HPV HR, or a combination of these procedures. Currently, screening programs based on HPV HR testing as a stand-alone diagnostic method or in combination with a cytologic examination in the form of a "cotest" are being implemented or are already in place in many countries around the world. According to the available literature, these tests have a higher sensitivity than cytodiagnosics,

enabling a more accurate diagnosis of intraepithelial lesions. They also seem to protect against the diagnosis of so-called interval cancers, i.e. cancers diagnosed in the interval between rounds of testing after a negative result is obtained to a greater extent than cytological testing. Tests detecting HPV HR infection are commercially available in Poland in some laboratories, and work is underway to include them as independent diagnostic tools in the program of prevention and early detection of cervical cancer in Poland. The aim of this study is to determine the clinical usefulness of commercially available HPV HR tests for cervical cancer screening by evaluating their selected parameters and comparing them with the parameters of the certified HPV BD Oncoclarity HPV Assay and cytodiagnostic parameters. The obtained results may be useful in selecting an appropriate cervical cancer screening regimen in Poland.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the Department of Gynecology and Gynecologic Oncology of the Military Medical Institute in Warsaw and in the Department of Obstetrics and Gynecology with Gynecologic Oncology Subdivision of the Praga Hospital p.w. Przemienienia Pańskiego in Warsaw between 2015 and 2020 after obtaining Bioethics Committee approvals No. 20/WIM/13 and KB/1236/20. Ninety-eight patients aged 25-73 were included in the study. The study was conducted on women qualified for surgical procedures involving excision of the entire cervix (cervical amputation, transvaginal, abdominal or laparoscopic hysterectomy) or its fragment (cervical conization, cervical electroconization). Patients were divided into two groups. The first group consisted of 51 women with a diagnosis or suspicion of intraepithelial lesions or cervical cancer on cytological or histological examination. The second group included 47 patients with normal cytological examination results who qualified for the operations as mentioned above for indications other than intraepithelial lesions and cervical cancer (e.g. myomas). Each patient had a conventional cytological smear taken on a basic slide for cytological preparation and ThinPrep PreservCyt Solution liquid medium for molecular evaluation with a certified HPV HR test. The cytological examination was evaluated according to the 2014 Bethesda system in the Department of Pathology in Kielce. In addition, each patient underwent a colposcopic examination evaluated according to current standards and described using the nomenclature of the International Society of Colposcopy and Cervical Pathology 2011. To exclude the influence of prior knowledge of patients' previous cervical examination results on the cytological and colposcopic evaluation results, one investigator qualified patients into the study, and another investigator (blinded to indications for surgery and results of previous cytological and cervical histopathological examinations) conducted the colposcopic

evaluation. Cytology referrals included standard clinical information as in routine screening. Material needed for commercial HPV HR testing was collected in accordance with selected laboratories' protocols for specimen collection, storage, and transport. Collected smears were submitted to the three selected laboratories, which performed assays using the following HPV assays: CLART HPV 2 assay (1 R, Lab. REX), Alinity m HR HPV assay (2 D, Lab. DIAGNOSTYKA) and AmpliSens HPV HCR assay - genotype-titre-FRT PCR kit (3 N, Lab. NUCLEAGENA). Material collected on a liquid medium during cytology was sent for analysis using the reference certified BD Oncoclarity HPV Assay to the ALFAMED laboratory in Zamość. The obtained cytological and molecular results from individual laboratories and colposcopic evaluation were compared with the final postoperative cervical histopathological result, which served as the so-called "gold standard" and clinical diagnosis in the study. Postoperative preparations fixed in formaldehyde solution were evaluated in the Department of Pathomorphology of the Military Medical Institute in Warsaw and the Department of Pathomorphology of the Solec Hospital in Warsaw.

Sensitivity and specificity were calculated for each analysed diagnostic method (cytological diagnostics, HPV HR tests, colposcopic evaluation). The calculations were made at the level of two cut-off points discriminating between correct and incorrect results - dysplasia of at least medium degree (CIN 2+) and dysplasia of at least high degree (CIN 3+). Cytological results were divided into normal smears (NILM – absence of intraepithelial lesions and malignant process) and abnormal smears (ASC-US lesions or more advanced), similarly to colposcopic impression results, where a normal result meant the absence of CIN lesions and abnormal result at least minor colposcopic lesions according to IFCPC nomenclature from 2011. (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy). The diagnostic tests were compared in terms of individual parameters, and the appropriate ratios were calculated. Parameters of individual studies were compared using the McNemar test for dependent groups. Basic statistical data was reported as counts and percentages. All the tests used were 2-sided, and a significance level of <0.05 was considered statistically significant. Concordance percentages and the kappa concordance coefficient were calculated for the HPV HR tests used in this study.

RESULTS

Using McNemar's test, it was found that all HPV HR tests had statistically significantly higher sensitivity in detecting CIN 2+ lesions and CIN 3+ lesions as compared to

Cytodiagnostic testing (both certified test and others). Cytodiagnostic testing has a statistically significantly lower sensitivity in detecting CIN 2+ lesions and CIN 3+ lesions compared to each cotest and compared to colposcopic evaluation with a cut-off point of smaller colposcopic lesions.

For both the CIN 2+ and CIN 3+ cut-offs, the analysis showed no statistically significant difference in sensitivity or specificity between the commercial HPV HR tests or between either test compared with the certified test. There was also no statistically significant difference in sensitivity and specificity between any of the cotests in the groups discussed.

In detecting CIN 2+ lesions and CIN 3+ lesions, colposcopic evaluation with a cut-off point at the level of larger colposcopic lesions showed a statistically significantly higher specificity than the molecular tests and the cotests. In addition, it was found that a statistically significantly higher sensitivity in detecting CIN 2+ lesions and CIN 3+ lesions is demonstrated by the colposcopic assessment with the cut-off point at the level of smaller colposcopic lesions compared to the colposcopic impression with the cut-off point at the level of larger colposcopic lesions.

Statistical analysis showed high concordance between all molecular methods tested.

CONCLUSIONS

1. Selected HPV tests, commercially available on the Polish market, have high sensitivity and acceptable specificity in detecting intraepithelial lesions and cervical cancer.
2. Selected HPV tests, commercially available on the Polish market, are characterized by high consistency of the results both with the reference test BD Oncoclarity HPV Assay and each other.
3. The parameters of the analyzed HPV tests support their great usefulness and inclusion in screening tests for the early detection of cervical cancer in Poland.
4. Selected HPV tests, commercially available on the Polish market, have a significantly higher sensitivity than cytological tests in detecting intraepithelial lesions and cervical cancer. There is no statistically significant difference between the sensitivity of the cotest and the sensitivity of molecular tests in detecting intraepithelial lesions and cervical cancer. The high sensitivity and specificity of the colposcopic assessment demonstrate the usefulness of this method in verifying abnormal cervical screening results.