

lek. Anna Lewek

**Analiza przydatności metylacji wybranych genów w wykrywaniu śródnabłonkowej
neoplazji szyjki macicy w porównaniu do metody molekularnej i cytodiagnostyki**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

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

Klinika Ginekologii
Katedra Perinatologii i Ginekologii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
mojemu Promotorowi Prof. dr hab. n. med. Witoldowi Kędzi
za poświęcony mi czas, merytoryczną pomoc
i zaangażowanie w powstanie niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Pragnę także podziękować
wszystkim pracownikom Kliniki i Uniwersytetu,
którzy przyczynili się do powstania niniejszej dysertacji naukowej,
za życzliwość i okazaną pomoc.*

*Dziękuję wszystkim, którzy obdarzyli mnie wsparciem
w trakcie powstawania niniejszej pracy,
a w szczególności mojej rodzinie.*

Spis treści

Wykaz skrótów	5
1. Wstęp.....	9
1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy	9
1.1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy na Świecie i w Europie	9
1.1.2. Epidemiologia raka szyjki macicy w Polsce	14
1.2. Etiologia raka szyjki macicy	19
1.3. Wirus brodawczaka ludzkiego i jego rola w procesie kancerogenezy	22
1.4. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy - faktyczny stan przednowotworowy	24
1.5. Dotychczasowa metoda wykrywania patologii szyjki macicy - cytodiagnostyka	27
1.6. Diagnostyka molekularna identyfikująca HPV	30
1.6.1. Test HPV DNA	30
1.6.2. Test podwójny	33
1.6.3. Test HPV mRNA	35
1.7. Diagnostyka pogłębiona - kolposkopia.....	36
1.8. Miejsce immunocytochemii w diagnostyce patologii szyjki macicy	40
1.9. Nowa metoda diagnostyczna - metylacja DNA.....	42
2. Cele.....	46
2.1. Cel główny.....	46
2.2. Cele szczegółowe.....	46
3. Materiał.....	47
4. Metoda.....	48
4.1. Cytodiagnostyka	48
4.2. Test HPV DNA.....	49
4.3. Test metylacyjny.....	50
4.4. Kolposkopia	52
4.5. Biopsja szyjki macicy	55

4.6. Metody statystyczne	55
5. Wyniki	59
5.1. Wyniki - charakterystyka populacji	59
5.2. Wyniki - ocena testu metylacyjnego.....	64
5.3. Wyniki - porównanie testu metylacyjnego do cytodiagnostyki, testu molekularnego identyfikującego DNA HPV oraz ko-testingu	70
6. Dyskusja	91
7. Wnioski.....	109
7.1. Wniosek główny	109
7.2. Wnioski szczegółowe	109
Streszczenie	110
Abstract.....	112
Wykaz rycin.....	114
Wykaz wykresów.....	115
Wykaz tabel	117
Piśmiennictwo.....	120
Załącznik 1 – zgoda Komisji Bioetycznej	132

Wykaz skrótów

ACC – dokładność [testu] (ang. accuracy)

ACOG – Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (ang. American College of Obstetricians and Gynecologists)

ACS – Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne (ang. American Cancer Society)

AGC – atypowe komórki nabłonka gruczołowego (ang. atypical glandular cells)

AIS – rak gruczołowy przedinwazyjny (łac. adenocarcinoma in situ)

ASCCP – Amerykańskie Towarzystwo ds. Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (ang. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology)

ASC-H – atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego, nie można wykluczyć zmian typu HSIL (ang. atypical squamous cells, cannot exclude HSIL)

ASC-US – atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu (ang. atypical squamous cells of undetermined significance)

ASR – standaryzowany według wieku współczynnik (ang. age-standardized rate)

AUC – pole pod krzywą ROC (ang. area under curve ROC)

CI – przedział ufności (ang. confidence interval)

CIN – śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (ang. cervical intraepithelial neoplasia)

CIS – rak przedinwazyjny (łac. carcinoma in situ)

cOR – surowy iloraz szans (ang. crude odds ratio)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

DNMT1 – metylotransferaza DNA 1 - (ang. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1)

E – wczesny region (ang. early region)

ECIS – Europejski System Informacji o Raku (ang. European Cancer Information System)

EU-27 – 27 państw członkowskich Unii Europejskiej

FDA – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. US Food and Drug Administration)

FN – fałszywie negatywny (ang. false negative)

FP – fałszywie pozytywny (ang. false positive)

H+E – hematoksylina i eozyna

HC2 – ang. Hybrid Capture 2

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)

HPV – wirus brodawczaka ludzkiego (ang. human papillomavirus)

HR HPV – HPV o wysokim stopniu ryzyka (ang. high risk HPV)

HSIL – śródnabłonkowa neoplazja dużego stopnia (ang. high-grade squamous intraepithelial lesion)

HSV-2 – wirus opryszczki pospolitej typu 2 (łac. herpes simplex virus 2)

hTERT – odwrotna transkryptaza ludzkiej telomerazy (ang. human telomerase reverse transcriptase)

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. International Agency for Research on Cancer)

IFCPC – Międzynarodowa Federacja Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii (ang. International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy)

KRN – Krajowy Rejestr Nowotworów

L – późny region (ang. late region)

LBC – cytologia na podłożu płynnym (ang. liquid-based cytology)

LCR – długi region kontrolujący (ang. long control region)

LSIL – śródnabłonkowa neoplazja małego stopnia (ang. low-grade squamous intraepithelial lesion)

miRNA – jednoniciowa cząsteczka RNA (ang. microRNA)

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. messenger ribonucleic acid)

NFZ – Narodowy Fundusz Zdrowia

NILM – brak obecności neoplazji śródnabłonkowej lub zmian nowotworowych (ang. negative for intraepithelial lesion or malignancy)

NLR – iloraz wiarygodności wyniku ujemnego (ang. negative likelihood ratio)

NOS – niesklasyfikowany (ang. not otherwise specified)

NPV – ujemna wartość predykcyjna (ang. negative predictive value)

OR – iloraz szans (ang. odds ratio)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PLR – iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (ang. positive likelihood ratio)

PPSM GPSK UM w Poznaniu – Poradnia Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

PPV – dodatnia wartość predykcyjna (ang. positive predictive value)

PTGiP – Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników

PTKiPSM – Polskie Towarzystwo Kolposkopii i Patofizjologii Szyjki Macicy

qMSP – analiza ilościowa specyficznej dla metylacji reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. quantitative methylation-specific PCR)

RCI – skala Reida (ang. Reid Colposcopic Index)

ROC – krzywa ROC (ang. receiver operating characteristic curve)

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)

SCJ – połączenie międzynabłonkowe (ang. squamo-columnar junction).

SE – błąd standardowy (ang. standard error of the estimate)

SIL – śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy – (ang. squamous intraepithelial lesion)

SIMP – System Informatycznego Monitorowania Profilaktyki

TBS – system Bethesda (The Bethesda System)

TN – prawdziwie negatywny (ang. true negative)

TP – prawdziwie pozytywny (ang. true positive)

TZ – strefa transformacji (ang. transformation zone)

USPSTF – (ang. The United States Preventive Services Task Force)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy

1.1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy na Świecie i w Europie

Rak szyjki macicy stanowi istotny problem diagnostyczno-terapeutyczny w Polsce i na świecie. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer - IARC) jest czwartym najczęstszym, po raku piersi, jelita grubego i płuc, nowotworem złośliwym u kobiet w populacji ogólnościowej. Szacunkowa liczba rozpowszechnionych przypadków na świecie z ostatnich 5 lat wynosi 1 495 211. W 2020 roku globalnie raka szyjki macicy rozpoznano u 604 127 kobiet, a 341 831 kobiet zmarło z powodu tego nowotworu¹.

Wykazano, że niski status społeczny i wysoki poziom ubóstwa korelują ze zwiększoną zachorowalnością i umieralnością na raka szyjki macicy. Wpływ tych dwóch czynników obserwuje się w ponad 50% zgonów na raka szyjki macicy. Efekt ten występuje nawet w krajach wysoko rozwiniętych, jak chociażby Stany Zjednoczone, gdzie śmiertelność z powodu raka szyjki macicy jest prawie dwukrotnie wyższa wśród kobiet z obszarów o niskim statusie socjoekonomicznym². Częstość występowania raka szyjki macicy jest wyższa wśród Afroamerykanek w porównaniu z Amerykankami rasy kaukaskiej^{3,4}. Podobna zależność dotyczy Amerykanek pochodzenia latynoskiego, które również mają wyższy współczynnik zachorowalności na raka szyjki macicy. Ponadto, przebieg choroby nowotworowej cechuje się u nich gorszą progresją i wysoką śmiertelnością, w porównaniu z innymi populacjami Ameryki Północnej^{5,6}.

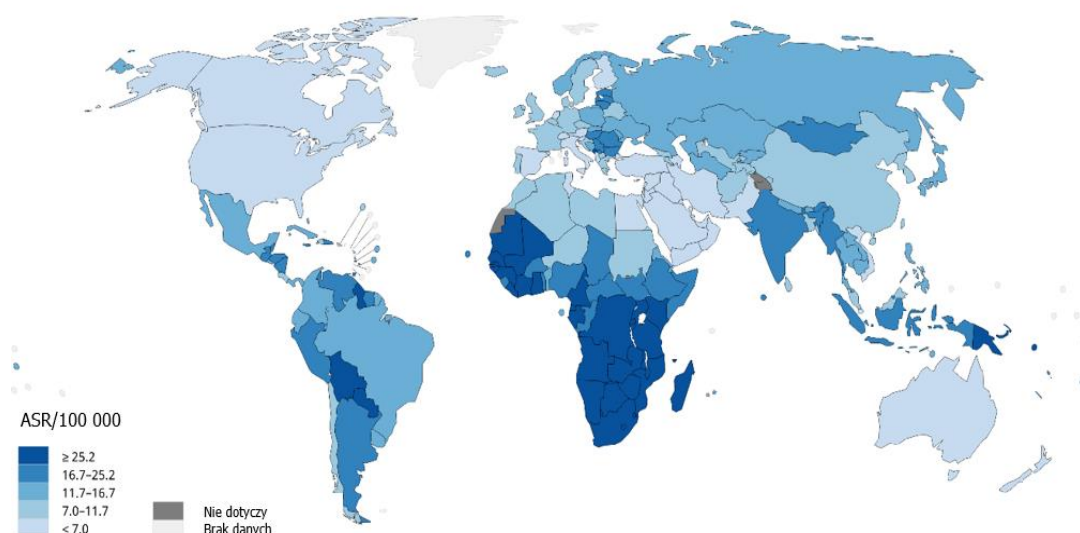
Szacuje się, że ponad 85% nowych zachorowań na raka szyjki macicy dotyczy krajów rozwijających się, głównie Afryki Subsaharyjskiej, Melanezji, Ameryki Południowej i Azji Południowo-Wschodniej. Najwyższa globalna zapadalność i umieralność cechuje Afrykę Subsaharyjską, przy czym najwyższy na świecie standaryzowany według wieku współczynnik zachorowalności (age-standardized rate - ASR), dotyczy Afryki Wschodniej (głównie Malawi, Gambii, Kenii, Szeseli, RPA, Ugandy, Zimbabwe), gdzie w 2020 roku zanotowano 40,1 nowych zachorowań na 100 000 kobiet, a 28,6 na 100 000 kobiet zmarło z powodu raka szyjki macicy².

Tak wysokie wskaźniki zachorowalności i śmiertelności w krajach rozwijających się wynikają przede wszystkim z niedostatecznej wiedzy i świadomości

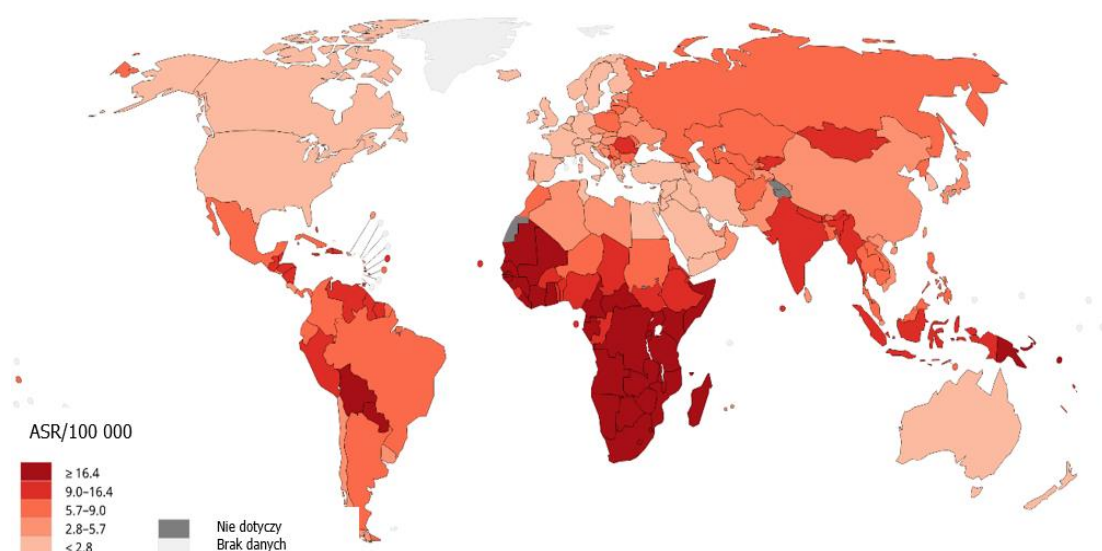
społecznej, braku skutecznych programów profilaktycznych oraz niskich nakładów finansowych na tamtejsze systemy zdrowotne. Przykładowo w Etiopii większość kobiet uważa, że badania przesiewowe powinny być wykonywane tylko w przypadku objawów⁷, a 90% mieszkanki Tanzanii nigdy nie była przebadana w kierunku raka szyjki macicy⁸. Do dużego rozpowszechnienia tej choroby w Afryce Subsaharyjskiej przyczynia się koinfekcja wirusami HIV (human immunodeficiency virus) i opryszczki pospolitej typu 2 (herpes simplex virus 2 - HSV-2). Do innych czynników należą bariery strukturalne, odległość od ośrodków leczniczych, bariery religijne, czy też brak powszechnych, populacyjnych szczepień przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus - HPV)^{9,10}.

Dla porównania z wyżej wymienionymi obszarami, wskaźniki zachorowalności są od 7 do 10 razy niższe w Azji Zachodniej, Australii, Nowej Zelandii i Ameryce Północnej, a śmiertelność jest mniejsza nawet 18-krotnie. Zapadalność na raka szyjki macicy w tych rejonach waha się od 4,1 do 6,2 przypadków na 100 000 kobiet (dane z roku 2020). Mniejsza liczba nowych przypadków raka szyjki macicy w krajach o wysokim poziomie rozwoju w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat wynika przede wszystkim z rosnącego statusu społeczno-ekonomicznego ludności i malejącego ryzyka przetrwałej infekcji HPV, co jest efektem poprawy higieny osobistej, zmniejszenia liczby porodów i częstości występowania chorób przenoszonych drogą płciową, a także usprawnionych programów profilaktycznych².

Szacunkowe standaryzowane wiekowo współczynniki zachorowalności i umieralności na raka szyjki macicy na świecie na 100 000 kobiet przedstawiono na rycinie 1 i rycinie 2.

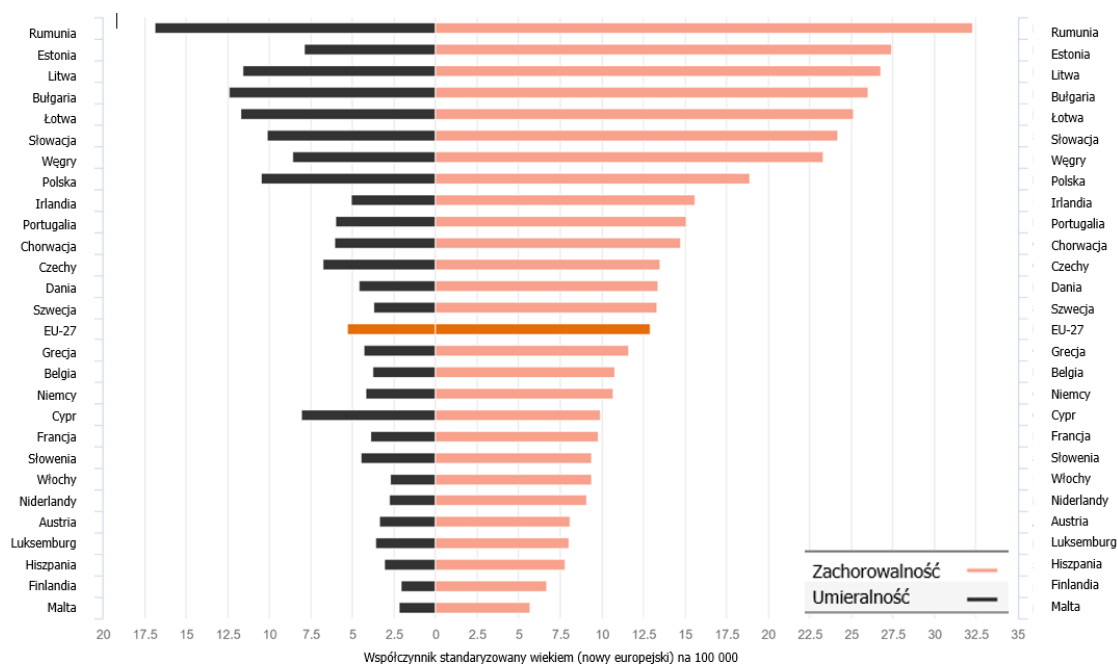


Rycina 1. Szacowana zapadalność na raka szyjki macicy na świecie w 2020 roku; ASR/100 000 kobiet (GLOBOCAN/IARC 2020)¹.



Rycina 2. Szacowana umieralność na raka szyjki macicy na świecie w 2020 roku; ASR/100 000 kobiet (GLOBOCAN/IARC 2020)¹.

Pomimo znacznych postępów w związku z wdrażaniem badań przesiewowych w kierunku raka szyjki macicy, poczynionych w Europie w ostatnich dekadach, wskaźniki śmiertelności w wielu krajach tego kontynentu są nadal wysokie. Według danych IARC w 2020 roku w Europie rozpoznano 58 169 nowych przypadków raka szyjki macicy, a liczba zgonów wywołanych tym nowotworem wyniosła 25 989. W całej Europie w 2020 roku standaryzowany współczynnik zapadalności na raka szyjki macicy na 100 000 kobiet wynosił 10,7, umieralności zaś 3,5¹. Zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy w wybranych krajach Europy przedstawiono



EU-27 – 27 państw członkowskich Unii Europejskiej

Wykres 1. Szacowana zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy w Europie w 2020 roku; ASR/100 000 kobiet (ECIS 2020)¹¹.

Podział Europy na „stare” i „nowe” państwa członkowskie, które przystąpiły do Unii Europejskiej po 2004 roku, odzwierciedla duże zróżnicowanie geograficzne występowania raka szyjki macicy. Kraje z najwyższymi standaryzowanymi wiekowo współczynnikami zachorowalności na 100 000 kobiet (ASR) w 2020 roku według Europejskiego Systemu Informacji o Raku (European Cancer Information System - ECIS) to Rumunia (22,4), Estonia (18,8), Litwa (18,8). Najwyższe współczynniki umieralności na 100 000 kobiet zaobserwowano również w Rumunii (9,6), a także w Bułgarii (7,1) oraz na Łotwie i na Litwie (odpowiednio 6,8 i 6,7). Najniższymi wskaźnikami nowych rozpoznań mogą poszczycić się Malta (3,8), Finlandia (5,2), Luxemburg (5,3), Austria (5,4) i Hiszpania (5,5), a najniższą liczbę zgonów prezentuje Finlandia i Malta (1,1)¹¹.

Zachorowalność na raka szyjki macicy w Europie znacząco spada od 1960 roku, z wyłączeniem Europy Wschodniej. Spadek ten jest najbardziej widoczny w Europie Północnej. Śmiertelność również wyraźnie maleje w ciągu ostatnich dziesięcioleci, głównie w krajach „starej” Unii Europejskiej, a znacznie wolniej w jej wschodniej części. Podział Europy na dwa kontrastujące ze sobą regiony pod względem wskaźników epidemiologicznych wynika z opóźnień we wdrażaniu skryningu cytologicznego i z różnic w narodowych programach diagnostycznych. Od lat

zauważa się odmiennosc w krajowych rekomendacjach profilaktycznych. Rozbieznosc wykonywania badan cytologicznych widoczna jest zarowno w zakresie wiekowym (od 20-30 do 60-65 roku zycia), jak i w interwalach diagnostyki (co 2 do 5 lat).

Postep we wczesnym wykrywaniu raka szyjki macicy w wielu krajach kontynentu europejskiego wynika z wprowadzania w ostatnich latach na skale masowa testu molekularnego opartego na identyfikacji DNA lub mRNA HPV. Holandia od lat odnosi najwieksze sukcesy w reformie skринingowej. Od 2017 roku program profilaktyczny oparty jest na teście HPV DNA wykonywanym u wszystkich kobiet w wieku 30-60 lat, w interwalach 5-letnich do 40 r.z., a nastepnie co 10 lat. Testy pobierane sa przez lekarzy rodzinnych albo samodzielnie przez pacjentki. W Turcji od 2014 roku wykonuje sie ko-testing (polaczenie cytologii i testu na DNA HPV) z genotypowaniem HPV 16/18 u pacjentek w wieku 30-65 lat w odstepach 5-letnich¹².

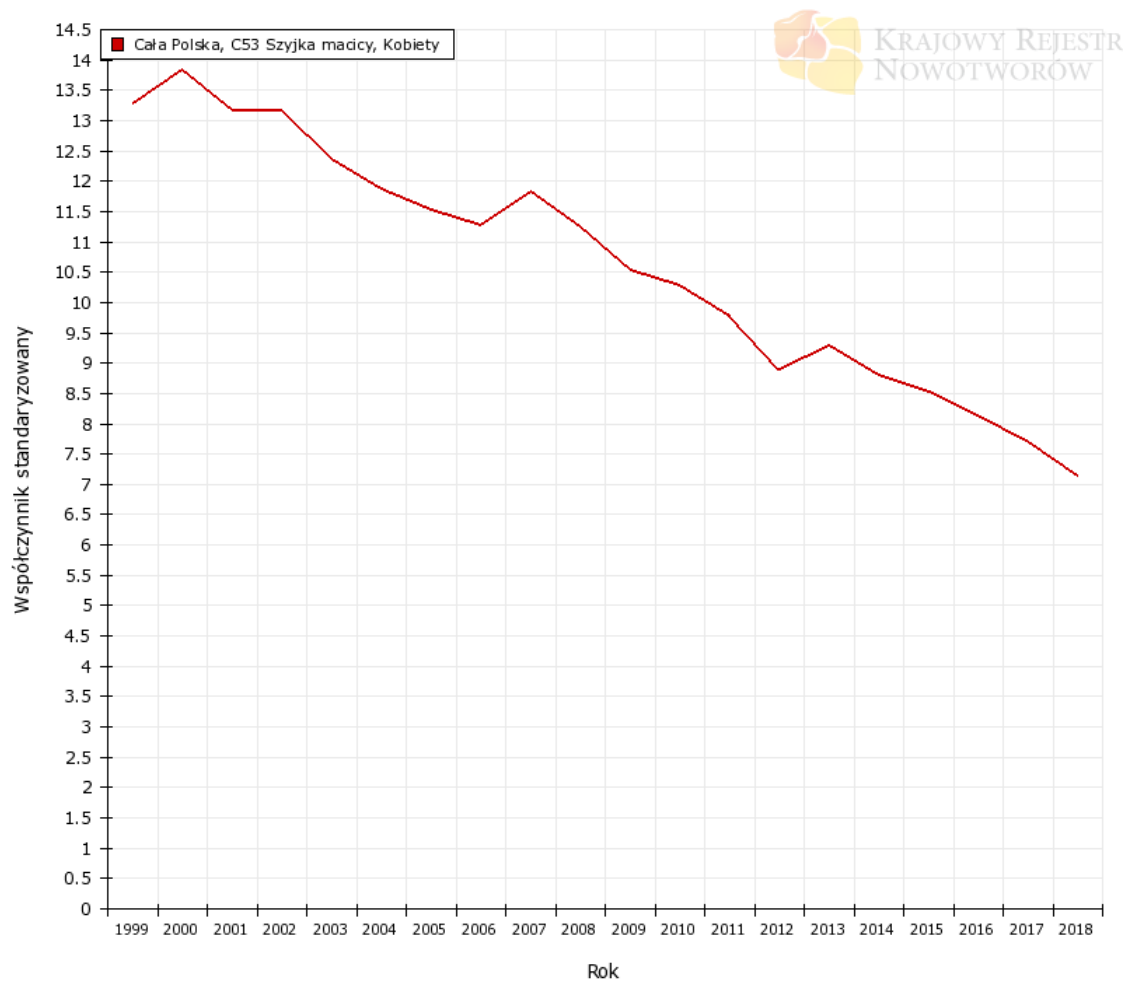
Wlochy, Szwecja, Finlandia i Hiszpania wprowadzily skринing raka szyjki z dodatkowymi testami na HPV w wielu regionach administracyjnych swoich panstw. W Szwecji wymaz cytologiczny wykonywany jest u mlodszych kobiet w wieku 23-29 lat, nastepnie od 30 do 64 r.z. zastepowany jest przez test na DNA HPV (do 49 r.z. co 3 lata, potem kolejno co 7). Podobnie badanie cytologiczne wykonuje sie u Hiszpanek w wieku 25-30 lat, natomiast po 30 r.z. test na DNA HPV lub test podwojny co 5 lat. Kolejne kraje, w tym Norwegia, Dania, Belgia, Niemcy, Malta, Wielka Brytania (wylaczajac Walie, ktora w 2018 roku zastapila cytodiagnostyke testem HPV DNA), aktualnie sa na roznych etapach modyfikowania swoich planow prewencyjnych¹².

Podzial epidemiologiczny widoczny na mapie Europy wynika glownie ze skutecznego ograniczania wystepowania raka szyjki macicy i jego skutkow w krajach Europy Polnocnej, Zachodniej i Poludniowej, w ktorych od lat funkcjonuja dobrze zorganizowane programy wczesnego wykrywania raka szyjki oraz masowe szczepienia przeciwko HPV. Liczba przypadkow tego nowotworu w Europie Srodkowo-Wschodniej jest nadal alarmujaco wysoka. Wieloletnie zaniedbania i bledy logistyczne zwiazane z profilaktyka, niskie naklady pieniezne, brak wystarczajacej liczby wyspecjalizowanych ośrodkow przyczyniaja sie do tak duzego rozpowszechnienia i zbyt poznego wykrywania raka szyjki macicy. Długookresowa, skuteczna prozdrowotna edukacja publiczna, prowadzona konsekwentnie w krajach

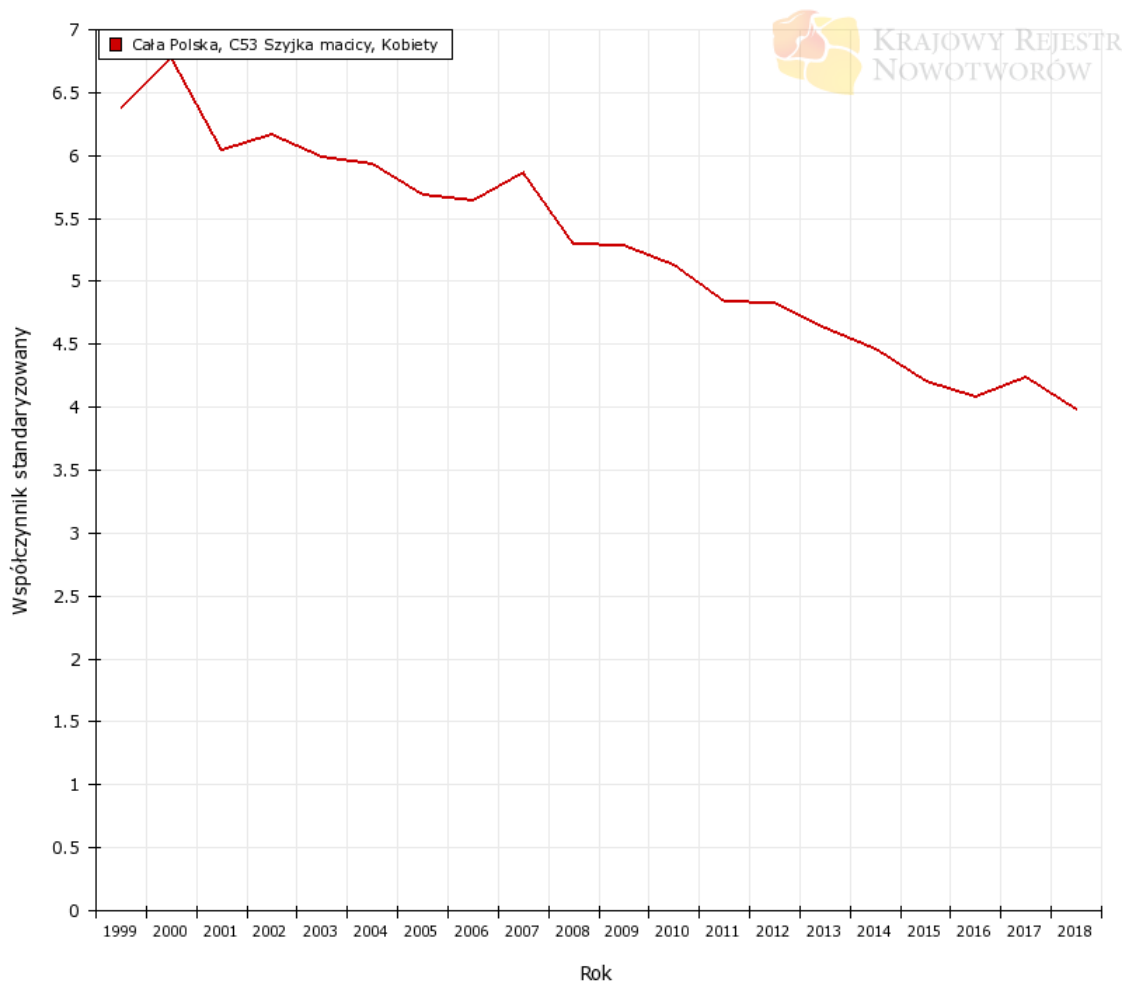
skandynawskich, kontrastuje z bardzo niską świadomością społeczną cechującą populację wschodnich regionów Europy. Od 30 lat najwyższą śmiertelność w Europie prezentuje Rumunia. Mimo uruchomienia w 2012 roku narodowego programu przesiewowego dla kobiet w wieku 25-64 lata, zgłaszalność na badania cytologiczne jest tam bardzo niska. Przyczyną tego stanu jest błędne przekonanie o bezcelowości tych badań, obawa przed konsultacją ginekologiczną czy brak funduszy. Dodatkowo badania socjologiczne wykazały, że Rumunki prezentują wysoki poziom lęku przed szczepieniami przeciwko HPV związany z przeświadczeniem, że szczepionka jest ryzykowna i stanowi eksperyment badawczy¹³.

1.1.2. Epidemiologia raka szyjki macicy w Polsce

Na tle danych światowych Polska jest krajem o średnim współczynniku zachorowalności na raka szyjki macicy. Niestety w porównaniu do Europy Zachodniej zapadalność jest nadal wysoka. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) z 2018 roku rak szyjki macicy jest siódmym pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Stanowi to 2,8% rozpoznań wszystkich nowotworów w populacji żeńskiej. Mimo 2360 zdiagnozowanych przypadków raka szyjki, widoczna jest znaczna tendencja spadkowa w ciągu ostatnich dziesięcioleci. W 2018 roku współczynnik zachorowalności standaryzowany wiekiem na 100 000 kobiet wynosił 7,1, co w porównaniu do wyników sprzed 20 lat (13,8/100 000 ASR) ukazuje korzystne zmiany epidemiologiczne (wykres 2). Trendy malejące widoczne są także w liczbie zgonów. W 2018 roku z powodu raka szyjki macicy zmarły w Polsce 1593 kobiety, co odpowiada 3,5% wszystkich zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi u kobiet. Aktualny współczynnik umieralności wynoszący 4,0/100 000 ASR obniżył się o ok. 40% w porównaniu do 2000 roku (wykres 3)¹⁴.



Wykres 2. Trendy czasowe zachorowalności na raka szyjki macicy w Polsce w latach 1999-2018; współczynnik standaryzowany wiekiem na 100 000 kobiet (KRN 2018)¹⁴.



Wykres 3. Trendy czasowe umieralności z powodu raka szyjki macicy w Polsce w latach 1999-2018; współczynnik standaryzowany wiekiem na 100 000 kobiet (KRN 2018)¹⁴.

Liczba zachorowań na raka szyjki macicy w Polsce rośnie wraz z wiekiem począwszy od 35 r.ż., osiągając w ostatnich latach szczyt w przedziale wiekowym 55-69 lat. W porównaniu do początku XXI wieku rozpoznawalność raka znacznie spadła w grupie wiekowej 40-49 lat. Większość zgonów także stwierdza się wśród kobiet między 60 a 69 rokiem życia. Analizując dane z ostatnich dwudziestu lat wyraźnie widać stopniowe przesuwanie się piku umieralności ku coraz starszym grupom wiekowym¹⁴.

Według podziału administracyjnego Polski najniższą zachorowalność w 2018 roku (dane KRN) odnotowano w województwie lubuskim, gdzie standaryzowany wiekowo współczynnik na 100 000 kobiet wyniósł 4,5, i małopolskim z wartością współczynnika 5,5. Na trzecim miejscu znalazło się województwo podkarpackie ze współczynnikiem 6,2. Najmniej zgonów potwierdzono w województwie opolskim i podkarpackim (równorzędnie 3,0/100 000 kobiet) (rycina 3 i 4). Wyraźną poprawę

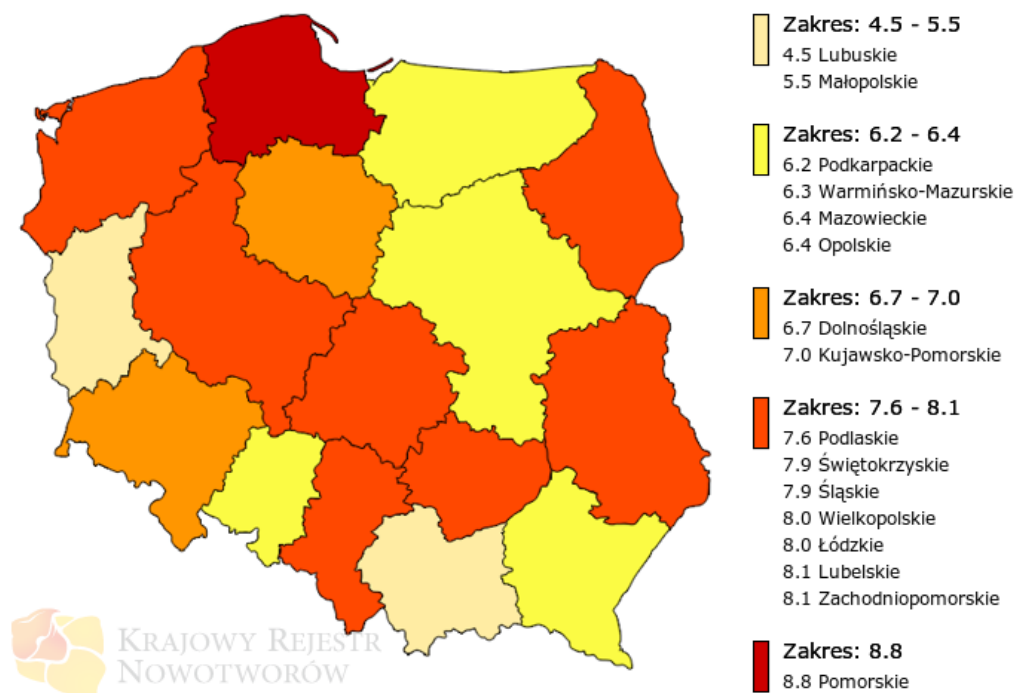
wyników obserwuje się od 2005 roku, kiedy to wprowadzono w Polsce Populacyjny Program Wczesnego Wykrywania Raka Szyjki Macicy. Program zakładał wykonywanie, w ramach powszechnego ubezpieczenia zdrowotnego, masowych badań cytologicznych u Polek między 25 a 59 r.ż., w odstępach 3-letnich¹⁴.

Celem narodowych badań przesiewowych jest doprowadzenie do obniżenia wskaźników epidemiologicznych w Polsce do poziomu obserwowanego w przodujących w tym zakresie krajach. W ramach ustawy o Narodowej Strategii Onkologicznej trwają prace nad rozpoczęciem refundacji szczepień przeciwko HPV. Aktualnie w zakresie programów promocji zdrowia część samorządów finansuje szczepienia dla nastoletnich dziewcząt i chłopców. Od 2019 roku prowadzone jest ministerialne badanie pilotażowe nad zastosowaniem badania molekularnego w kierunku obecności DNA HPV jako nowego testu przesiewowego w programie profilaktyki raka szyjki macicy w Polsce. Centralnym Ośrodkiem Koordynującym bezpłatne badanie kobietom w wieku 30-59 lat jest Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie¹⁵. Zgodnie prognozami Krajowego Rejestru Nowotworów w populacji Polek należy spodziewać się spadku zachorowań na raka szyjki macicy w kolejnych latach.

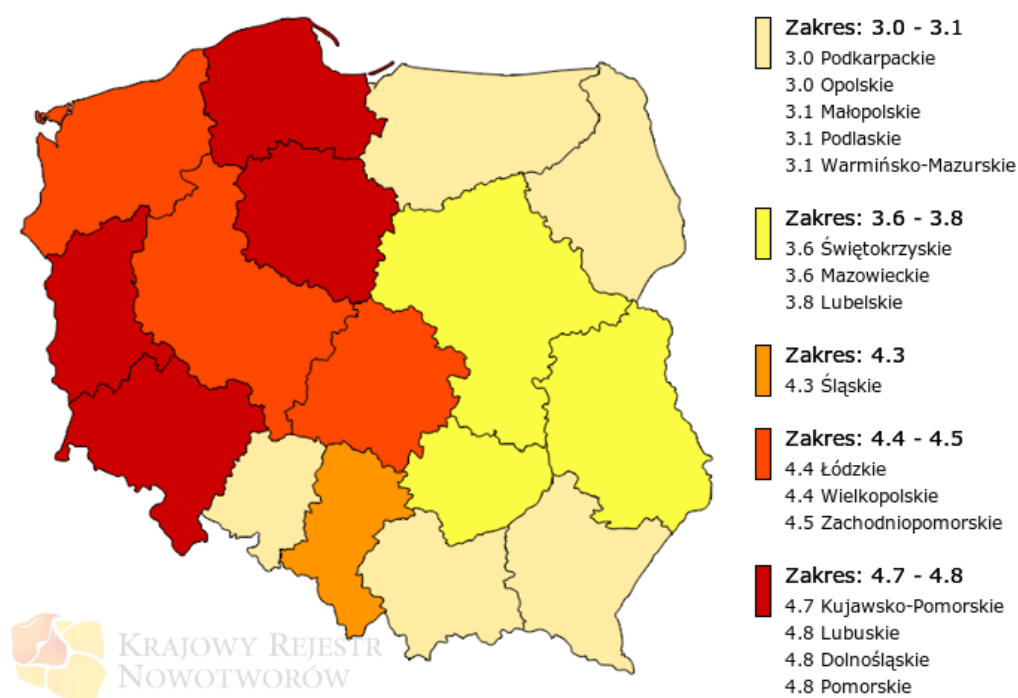
Niestety dynamika spadkowa nie jest jednakowa we wszystkich województwach. W roku 2018 najwięcej zachorowań na 100 000 kobiet zanotowano w województwie pomorskim (8,8), zachodnio-pomorskim i lubelskim (w obu 8,1). W województwie lubuskim, mimo najniższej zapadalności na raka szyjki macicy, umieralność jest największa w skali Polski – 4,8/100 000. Takie same wysokie wyniki prezentują województwa pomorskie i dolnośląskie (rycina 3 i 4)¹⁴.

Mimo istniejącego narodowego programu skринingowego, zgłaszalność na badania cytologiczne Polek jest wciąż niesatysfakcjonująca. Bardzo niska frekwencja wynika z niedostatecznej świadomości społecznej w naszym kraju i ulega stopniowemu pogorszeniu, od momentu rezygnacji przez Ministerstwo Zdrowia z wysyłania imiennych zaproszeń na badanie cytologiczne, tj. od 2015 roku, co w konsekwencji wpływa na niższą i zbyt późną wykrywalność tego nowotworu. W oparciu o dane Ministerstwa Zdrowia według stanu na dzień 1 marca 2021 roku jedynie 13,14% populacji kobiet objętych jest skринingiem cytologicznym.

Przed 2017 rokiem zgłaszalność przekraczała 20%, największy wskaźnik osiągnięto w 2012 roku, wyniósł on 23,75%¹⁶.



Rycina 3. Zachorowalność na raka szyjki macicy w Polsce w 2018 roku; ASR/100 000 kobiet (KRN 2018)¹⁴.



Rycina 4. Umieralność na raka szyjki macicy w Polsce w 2018 roku; ASR/100 000 kobiet (KRN 2018)¹⁴.

Brak wiedzy, niechęć i obawa przed korzystaniem z okresowych kontroli ginekologicznych przyczynia się do rozpoznawania choroby w wysokim stadium zaawansowania klinicznego o niewielkich szansach na całkowite wyleczenie. Zgodnie z danymi Concord-3, opublikowanymi w 2018 roku, leczenie raka szyjki macicy w Polsce jest mało skuteczne. Pięcioletnie przeżycia w latach 2010-2014 uzyskano w naszym kraju u 55,1% pacjentek z tym rozpoznaniem. Odsetek wyleczalności jest jednym z najniższych spośród 71 krajów ujętych w badaniu i drugi od końca w Europie. Pomimo wzrostu przeżyć 5-letnich o pięć punktów procentowych, w ciągu 20 lat od 1995 roku, Polska zostaje daleko w tyle w porównaniu do reszty krajów rozwiniętych świata, których odsetek przeżyć sięga nawet 70-80%¹⁷.

By zbliżyć się do standardów epidemiologicznych Europy Zachodniej, istnieje konieczność intensyfikacji działań profilaktycznych w Polsce. Prozdrowotna edukacja społeczna, ustawowe wprowadzenie populacyjnej profilaktyki pierwotnej, poszerzenie gamy testów przesiewowych i podniesienie jakości leczenia przyczyni się do poprawy wyników epidemiologicznych i podwyższenia wykrywalności patologii szyjki macicy już na etapie stanów przedrakowych, ograniczając tym samym rozwój zaawansowanych klinicznie nowotworów.

1.2. Etiologia raka szyjki macicy

Punktem zwrotnym w badaniach nad czynnikami rozwoju raka szyjki macicy było odkrycie wirusa brodawczaka ludzkiego i jego powiązania z procesem kancerogenezy. Do lat siedemdziesiątych XX wieku za główny czynnik etiologiczny uważano wirus opryszczki typu 2. Dopiero wyizolowanie od kobiet z rakiem szyjki macicy, przez niemieckiego profesora Haralda zur Hausena, w 1984 roku DNA HPV 16, a rok później DNA HPV 18 podważyło tę hipotezę. Jego teorie początkowo nie zyskały powszechnej aprobaty, do momentu ujawnienia, że HPV stanowi heterogenną rodzinę wirusów, z której tylko część wykazuje potencjał onkogenny. Profesor zur Hausen w swoich badaniach udowodnił, że wirusowe DNA zostaje wbudowane w genom komórki gospodarza uruchamiając proces tworzenia nowotworu na etapie molekularnym. Ponadto, zauważył, że dwa białka wirusowe E6 i E7, odpowiadają za transformację nowotworową prawidłowej komórki. Odkrycie roli wirusa brodawczaka ludzkiego umożliwiło w kolejnych latach opracowanie testów do jego identyfikacji oraz rozwój szczepionki obniżającej ryzyko transmisji zakażenia

i tym samym zachorowania na raka szyjki macicy. W 2008 roku, za swój wkład do nauk medycznych, Harald zur Hausen został uhonorowany Nagrodą Nobla¹⁸.

Według ogólnoświatowych badań IARC z 1999 roku w 99,7% raków szyjki macicy potwierdzono obecność DNA HPV różnych typów¹⁹. Wirusy brodawczaka ludzkiego stanowią heterogenną grupę patogenów zdolnych do zakażenia komórek nabłonka i skóry. Proliferacja komórek nowotworowych zachodzi w błonie śluzowej nabłonka narządów moczowo-płciowych, odbytu, jamy ustnej, gardła i dróg oddechowych. Dotychczas zidentyfikowano ponad 200 typów wirusa brodawczaka ludzkiego, z których około 40 wykazuje powinowactwo do komórek błon śluzowych narządów moczowo-płciowych²⁰. W oparciu o potencjał onkogenny, HPV można podzielić na typy niskiego i wysokiego ryzyka nowotworzenia. Spośród 40 typów zakażających narządy moczowo-płciowe, około 15 wykazuje właściwości rakotwórcze, tj.: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70²¹. Do najbardziej onkogennych typów wirusa należą: 16, 18, 31, 33, 45. Powszechnie uważa się, że typy HPV 16 i 18 odpowiadają razem za powstanie około 70% raka szyjki macicy na świecie²². HPV 16 jest najczęściej rozpoznawany w rakach płaskonabłonkowych, natomiast gruczolakoraki są najsilniej powiązane z HPV typu 18.

Wirus brodawczaka ludzkiego jest rozpowszechniony globalnie. Dane dotyczące częstości jego występowania są jedynie szacunkowe, gdyż w wielu krajach nie prowadzi się rejestru bezobjawowych zakażeń HPV. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem w 2018 roku potwierdzono 690 000 nowotworów różnego typu, których rozwój jest powiązany z HPV²³. Wieloośrodkowa metaanaliza 194 badań z całego świata, obejmująca milion kobiet zakażonych HPV z prawidłowym wynikiem cytologii, oszacowała częstość globalnego występowania wirusa na 11,7%. Najwięcej przypadków odnotowano w Afryce Subsaharyjskiej (24%)²⁴. Przeważającym typem HPV na świecie, w tym w Stanach Zjednoczonych i Europie, jest HPV 16. Częstość jego identyfikacji w nowotworach wynosi około 50% przypadków, pozostałe typy - 18, 31 i 45 razem stanowią w przybliżeniu 30%²⁵. W Azji natomiast, zaraz po typie 16, najczęściej występuje typ 52 i 58²⁶. Do najpopularniejszych wirusów wywołujących łagodne zmiany o charakterze kłykcin kończystych należą typy 6 i 11. Na podstawie danych epidemiologicznych z całego świata opracowano 9-walentną szczepionkę przeciw najczęstszym, onkogennym i nieonkogennym typom wirusa brodawczaka ludzkiego tj.: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58.

Najwyższe rozpowszechnienie HPV stwierdza się u kobiet w młodym wieku, szczególnie poniżej 25 roku życia. Następnie, wraz z wiekiem częstość występowania spada, co widoczne jest zwłaszcza w Ameryce i Europie. Istnieją doniesienia o obserwowanym wzroście częstości występowania zakażeń HPV w populacji kobiet w wieku pomenopauzalnym²⁴. Na podstawie metaanalizy 44 badań z różnych regionów świata stwierdzono, że częstość występowania HPV jest najwyższa u kobiet do 35 roku życia, następnie spada, by ponownie wzrastać w wieku 45-54 lata²⁷.

Do transmisji HPV najczęściej dochodzi poprzez kontakt płciowy. Wirus wnika do nabłonka skóry lub błony śluzowej w miejscu mikrouszkodzeń jego powierzchni, by następnie wbudować swój genom do DNA komórek gospodarza²⁸. Kluczowymi czynnikami wpływającymi na ryzyko zakażenia u kobiet jest liczba partnerów seksualnych, wiek rozpoczęcia inicjacji i przeszłość seksualna mężczyzny. Na podstawie badań wykazano znikome ryzyko zakażenia HPV kobiet będących dziewczycami, w przeciwieństwie do częstego występowania wirusa u prostytutek. Mężczyźni są nosicielami i głównymi wektorami wirusa. Udowodniono, że obrzezanie zmniejsza trzykrotnie prawdopodobieństwo utajonej infekcji HPV²⁹. Potwierdzono również możliwość transmisji wirusa wśród homoseksualnych partnerów. Ponadto, do zarażenia może dojść drogą wertykalną, z matki na dziecko. W trakcie porodu najczęściej dochodzi do zakażenia noworodka nieonkogennymi typami HPV 6 i 11. Konsekwencją tego jest ryzyko rozwoju nawracającej brodawczakowatości krtani u dzieci³⁰. Istnieje również ryzyko przenoszenia wirusa drogą pośrednią, poprzez skażone przedmioty. Inne drogi transmisji, jak karmienie piersią czy kontakt z krwią są słabo udokumentowane.

Zakażenia onkogennymi typami HPV przebiegają najczęściej bezobjawowo, mają charakter przemijający i ustępują samoistnie dzięki działaniu układu odpornościowego w ciągu kilku miesięcy. Jedynie 10-20% zakażeń przyjmuje postać przetrwałej infekcji, która może doprowadzić do przemiany nowotworowej komórek prawidłowego nabłonka. Kluczowym czynnikiem prowadzącym do rozwoju raka szyjki macicy jest lokalizacja zakażenia w tak zwanej strefie przekształceń, między nabłonkiem wielowarstwowym płaskim pokrywającym tarczę szyjki macicy, a nabłonkiem gruczołowym wyściełającym kanał szyjki macicy. Topograficznie jest to najczęstsze miejsce inicjacji nowotworzenia dla raka szyjki macicy³¹.

Do ważnych czynników wpływających na progresję zmian wirusowych i nowotworowych należą także zaburzenia funkcji układu immunologicznego. Szereg autorów zwraca uwagę na rolę długotrwałego stosowania doustnej antykoncepcji hormonalnej, co zwiększa ryzyko rozwoju zakażenia HPV i jego następstw. Wielorództwo, powyżej 7 ciąż, podnosi ryzyko rozwoju infekcji HPV i raka szyjki macicy 2-krotnie w porównaniu do kobiet z jednym lub dwójką dzieci i 4-krotnie w stosunku do nieródek. Palenie papierosów i nadużywanie alkoholu również wpływają na podniesienie ryzyka rozwoju przetrwałej infekcji wirusowej. Prawdopodobieństwo wystąpienia raka szyjki macicy u pacjentek zarażonych HIV wzrasta 5-krotnie w porównaniu do niezakażonych. Stan mikrobiomu pochwy może mieć działanie protekcyjne lub pobudzające przemianę nowotworową w obrębie szyjki macicy. Koincydentalne zakażenie Chlamydia trachomatis lub HSV-2 podwaja ryzyko kancerogenezy. Oczywistym czynnikiem mającym duży wpływ na rozwój raka jest przebyte w przeszłości leczenie śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy²⁹.

1.3. Wirus brodawczaka ludzkiego i jego rola w procesie kancerogenezy

Grupę dotychczas sklasyfikowanych ponad 200 typów HPV można podzielić na podgrupy: α , β , γ , μ , ν . Do podgrupy α należy ponad 65 typów wirusa cechujących się powinowactwem do nabłonka błony śluzowej i mogących sprzyjać powstawaniu raka. Wirusy β i γ zakażają przede wszystkim skórę, natomiast pozostałe - μ oraz ν tworzą łagodne brodawki, z reguły nieulegające przemianie nowotworowej^{32,33}.

Wirus brodawczaka ludzkiego należy do rodziny Papillomaviridae. Jest małym wirusem, o średnicy 55 nm. Jego materiał genetyczny stanowi dwuniciowy, kolisty DNA składający się z około 8000 par zasad. Genom wirusa obudowany jest bezotoczkowym kapsydem o ikosaedralnej symetrii. Kapsyd tworzą 2 białka strukturalne L1 i L2. 360 kopii białka L1 jest zorganizowanych w 72 kapsomery, każdy kapsomer powiązany jest dodatkowo z białkiem L2³³⁻³⁵.

Genom wirusa można podzielić na trzy funkcjonalne regiony. Region wczesny E (early) koduje sześć białek niestukturalnych (E1, E2, E4, E5, E6 i E7) odpowiedzialnych za replikację wirusa i regulację transkrypcji, a także ochronę przed układem odpornościowym. Istotne znaczenie mają białka E6 i E7 inaktywujące geny supresorowe gospodarza (p53 i pRB), prowadząc do rozwoju nowotworu. Region późny L (late) koduje dwa białka strukturalne (L1 i L2) tworzące kapsyd wirusa.

Region LCR (long control region) jest regionem kontrolującym transkrypcję i replikację wirusowego DNA^{33,36}.

Jak już wspomniano powyżej, do zarażenia HPV dochodzi w miejscu mikrourazów odsłaniających błonę podstawną nabłonka, co umożliwia проникnięcie tam wirusa. Na powierzchni komórek warstwy podstawnej znajdują się receptory siarczany heparyny lub α i β integryn, które wiążą się z DNA wirusowym³⁷. Po проникnięciu do nabłonka genom wirusa pozostaje w formie episomalnej. W tej postaci trafia do jądra komórkowego, gdzie jego własne DNA ulega inkorporacji do ludzkiego DNA. Następstwem tego jest wczesna transkrypcja genów białek E1 i E2. Białka E1 i E2 kontrolują ekspresję białek E6 i E7 oraz utrzymują ją na bardzo niskim poziomie, chroniąc wirusa przed działaniem układu odpornościowego. Za proces проникnięcia do komórki i transportu do jądra komórkowego odpowiadają białka kapsydowe L1 i L2³⁸.

Ekspresja genów białek E1, E2, E5, E6, E7 odbywa się w warstwie ponadpodstawnej nabłonka. Białka E6 i E7 mają zdolność destabilizacji genomu komórkowego gospodarza, dzięki czemu pełnią kluczową rolę w procesie transformacji nowotworowej. Białko E6 inaktywuje białko supresorowe p53, uniemożliwiając tym samym regulację cyklu komórkowego, przebieg apoptozy oraz naprawę uszkodzeń DNA. Ponadto, E6 blokuje białka proapoptyczne BAX i BAK oraz indukuje inhibitory apoptozy^{39,40}. Wykazano również, że aktywuje ekspresję katalitycznej podjednostki odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (human telomerase reverse transcriptase – hTERT), co w efekcie stymuluje podziały komórkowe⁴¹. Drugie białko wirusowe E7 blokuje supresor pRB i uwalnia czynnik E2F z kompleksu pRB-E2F, co prowadzi do transkrypcji cytokin A i E, które pobudzają przejście komórki do fazy S.

Właściwości onkogenne wykazuje także białko E5, głównie poprzez wzmacnianie aktywności transformującej białek E6 i E7³⁹. Białko E4 zatrzymuje komórkę w fazie G2, przez co zapewnia powielanie liczby kopii genomu HPV⁴². Cykl życiowy wirusa kończy się w powierzchniowej warstwie nabłonka, gdzie genom wirusa zostaje wbudowany do kapsydu, a następnie w gotowej postaci uwolniony z komórki³⁹. Za proces składania i uwalniania cząstek wirusowych odpowiadają proteiny E2 i E4. Pełen cykl replikacyjny wirusa zachodzi tylko w zróżnicowanych keratynocytach.

Warto podkreślić także, że białka onkogenne E6 i E7 mogą zakłócać ekspresję jednoniciowego RNA (microRNA - miRNA). Cząsteczki miRNA odpowiadają za prawidłową regulację cyklu komórkowego, w tym procesy angiogenezy i apoptozy oraz komunikację międzykomórkową. Zaburzona ekspresja poszczególnych miRNA może skutkować łagodnym bądź agresywnym przebiegiem choroby i prowadzić do rozwoju nowotworu^{43,44}.

1.4. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy - faktyczny stan przednowotworowy

Termin rak przedinwazyjny szyjki macicy został wprowadzony w 1928 roku przez Waltera Schillera w celu określenia atypowego rozrostu nieprzekraczającego błony podstawnej nabłonka. Następnie w roku 1932 Albert Compton-Broders zaproponował pojęcie carcinoma in situ (CIS) – dosłownie rak w miejscu⁴⁵. W latach pięćdziesiątych XX wieku Reagan wprowadził nazwę dysplazja, aby opisać nieprawidłowy nabłonek szyjki macicy, będący pośrednim stanem między nabłonkiem prawidłowym a CIS⁴⁶. W zależności od stopnia zmian w nabłonku wyróżniano dysplazję łagodną, umiarkowaną i ciężką. W 1967 roku Richart zaobserwował ciąg zmian histologicznych odpowiadających progresji w nabłonku i zastąpił termin dysplazja pojęciem śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (cervical intraepithelial neoplasia - CIN)⁴⁷. CIN podzielono na stopnie: CIN1, CIN2 i CIN3. Mianem CIN1 określono dysplazję małego stopnia, CIN2 średniego stopnia, a CIN3 dużego stopnia. CIN3 obejmował zarówno dysplazję wysokiego stopnia, jak i CIS. Aktualnie oceny cytologicznej szyjki macicy dokonuje się w Systemie Bethesda (The Bethesda System – TBS), który został wprowadzony w 1988 roku, a następnie zmodyfikowany w 1991 i 2001 roku. Na potrzeby TBS utworzono termin squamous intraepithelial lesion (SIL) i wydzielono śródnabłonkową zmianę małego (low squamous intraepithelial lesion – LSIL) i dużego stopnia (high squamous intraepithelial lesion - HSIL). Analogicznie do mianownictwa TBS opisującego obrazy cytologiczne, w nomenklaturze histopatologicznej stosuje się LSIL dla śródnabłonkowej neoplazji niskiego stopnia i HSIL dla śródnabłonkowej neoplazji wysokiego stopnia.

Jak już wspomniano powyżej zmiany przednowotworowe w 90% przypadków rozwijają się w tak zwanej strefie transformacji (transformation zone - TZ). Fizjologiczna granica pomiędzy nabłonkiem wielowarstwowym płaskim pokrywającym

tarczę szyjki macicy, a nabłonkiem walcowatym wyścielającym kanał szyjki macicy, nazywana jest również połączeniem międzynabłonkowym (squamo-columnar junction – SCJ). SCJ może przemieszczać się z endocervix do ectocervix w okresie dojrzewania, a następnie po tym okresie ponownie cofać się do kanału szyjki macicy. Jego położenie zależy między innymi od zmian hormonalnych czy mikrobiologicznych, a także przebytych porodów i zabiegów na szyjce macicy. Pod wpływem czynników drażniących lub hormonalnych może dojść do rozwoju metaplazji. Polega ona na różnicowaniu się komórek nabłonka walcowatego w komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Proces ten w szyjce macicy ma swój początek w komórkach rezerwowych położonych pod nabłonkiem gruczołowym. Obszar komórek, które uległy metaplazji płaskonabłonkowej może mieścić się w strefie transformacji. Jak już wcześniej wspomniano, w tym miejscu najczęściej dochodzi do powstania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka⁴⁸.

W komórkach nabłonka wielowarstwowego płaskiego, czyli keratynocytach pochodzących ze zmienionego neoplastycznie nabłonka szyjki macicy można stwierdzić charakterystyczne cechy morfologiczne. Widoczny jest polimorfizm jądrowy i komórkowy. Jądra komórkowe są powiększone, nadbarwliwe, o nierównomiernym rozmieszczeniu chromatyny i dużym jąderku. Sąsiadujące komórki różnią się między sobą kształtem oraz wielkością i liczbą jąder. Obserwuje się zwiększony stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny. W warstwach powierzchniowych i pośrednich nabłonka mogą znajdować się koilocyty – komórki o dużym, hiperchromatycznym jądrze otoczonym jasną wakuolą, tzw. „halo”. Koilocytoza jest częstym objawem zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego.

Histologicznie śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy cechuje się nieprawidłowym różnicowaniem komórek, zatarciem granic między warstwami nabłonka, obecnością atypowych i licznych figur mitotycznych. Powyższe zaburzenia morfologiczne występują w zmiennym nasileniu w różnych warstwach nabłonka, co stanowi podstawę do wyodrębnienia trzech stopni SIL/CIN:

CIN1/LSIL, to jest zmiana śródnabłonkowa małego stopnia, cechuje się zaburzeniami dojrzewania komórek oraz nielicznymi figurami podziału jedynie w dolnej 1/3 warstwie przypodstawnej nabłonka. 2/3 górne zbudowane są z prawidłowo zróżnicowanych komórek. Niewielkie nieprawidłowości jąder można zaobserwować

na całej grubości nabłonka. W warstwach powierzchniowych mogą występować koilocyty.

Śródnabłonkowa zmiana średniego stopnia – CIN2/HSIL – charakteryzuje się brakiem różnicowania komórkowego oraz większą liczbą figur mitotycznych w 2/3 dolnych grubości nabłonka. Ponadto, w warstwach przypodstawnych spotkać można nieprawidłowe figury podziału. Dojrzałe komórki znajdują się w warstwach powierzchniowych. W całej grubości nabłonka widoczna jest bardziej nasilona atypia jądrowa.

W CIN3/HSIL, czyli śródnabłonkowej zmianie dużego stopnia, dojrzewanie komórkowe i stratyfikacja nabłonka mogą być całkowicie nieobecne lub ograniczone do górnej 1/3 nabłonka. Na wszystkich poziomach nabłonka rozciągają się liczne, często patologiczne mitozy, a jądra komórkowe cechuje nierzadko wybitny polimorfizm. Nabłonek w całości jest pogrubiały, o zwiększonej komórkowości i całkowicie nieprawidłowej architekturze⁴⁹.

Przetrwiała infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego poprzedza powstanie śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy o kilka lat. Od zakażenia HPV mija średnio 7-10 lat do powstania zmiany przednowotworowej i kolejne 3-5 lat do powstania inwazyjnego raka szyjki macicy⁵⁰. Progresja SIL dotyczy zmian, którym towarzyszy infekcja onkogennymi typami HPV. Szacuje się, że obecność wirusa typu 16 zwiększa pięciokrotnie ryzyko progresji choroby. Przeważająca część zmian CIN1/LSIL ma postać incydentalną, zwłaszcza u pacjentek w wieku 25-30 lat, i jest eliminowana wraz ze zniknięciem wirusa w 80 procentach przypadków w ciągu 12-24 miesięcy. Według metaanalizy opublikowanej w The BMJ dotyczącej nieleczonych CIN2/HSIL - 50% zmian w ciągu 2 lat ulega samoistnej regresji, około 30% utrzymuje się, a 18% ulega progresji do bardziej zaawansowanych stadiów. U badanych poniżej 30 roku życia omawiane wskaźniki są korzystniejsze i wynoszą odpowiednio: 60%, 23% i 11%⁵¹. Rak szyjki macicy rozwija się na podłożu zmian typu CIN2+/HSIL. Przemiana nowotworowa przebiega tym szybciej, im wyższe jest stadium zaawansowania neoplazji szyjki macicy. Aktualnie przyjmuje się, że CIN1/LSIL jest histopatologicznym odzwierciedleniem zakażenia HPV, a nie rzeczywistym prekursorem raka⁵². Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization

– WHO) w wytycznych z 2014 roku podkreśliła znaczenie wykrywania i leczenia zmian co najmniej CIN2+/HSIL.

1.5. Dotychczasowa metoda wykrywania patologii szyjki macicy - cytodiagnostyka

Profilaktyka zdrowotna, według definicji WHO, to działania zapobiegające chorobom poprzez ich wczesne wykrycie i leczenie. Jej głównym celem jest zmniejszenie zachorowalności i śmiertelności populacyjnej. Wyróżnia się profilaktykę wczesną, pierwszej fazy (tzw. pierwotną), drugiej fazy (tzw. wtórną) oraz trzeciej fazy. Badania przesiewowe mieszczą się w zakresie zadań profilaktyki wtórnej. Polegają na wskazaniu możliwości wystąpienia choroby za pomocą zastosowanych masowo, nieinwazyjnych, prostych, tanich oraz akceptowalnych dla badanego i badającego testów diagnostycznych.

Efektywność testu skriningowego oceniana jest poprzez jego: czułość – zdolność do prawidłowego rozpoznania choroby, swoistość – zdolność do wykluczenia choroby, dodatnią wartość predykcyjną (positive predictive value – PPV) – proporcję osób z dodatnim wynikiem, które rzeczywiście są chore oraz ujemną wartość predykcyjną (negative predictive value – NPV) – proporcję osób z ujemnym wynikiem, które rzeczywiście są zdrowe. Oczekiwania wobec testu przesiewowego to czułość i swoistość zbliżona do 100% oraz wysoka dodatnia i ujemna wartość predykcyjna⁵³.

W większości krajów świata, w tym w Polsce, programy profilaktyczne mające na celu wykrywanie SIL oparte są na badaniu cytologicznym. Test polega na pobraniu szczoteczką złuszczonych komórek nabłonka z tarczy i szyjki macicy w sposób konwencjonalny, wykonując rozmaz na szkiełku podstawowym, lub alternatywny, z wykorzystaniem tzw. podłoża płynnego (liquid-based cytology – LBC). Według Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników (PTGiP) rekomendowaną metodą barwienia rozmazów cytologicznych jest metoda Papanicolau. Materiał badany jest pod mikroskopem i oceniany według systemu Bethesda⁵⁴.

Klasyfikacja Papanicolau, której twórcą jest ojciec cytodiagnostyki - Georges Papanicolau, powstała w połowie XX wieku. Wprowadzenie tego ważnego narzędzia diagnostycznego do masowych badań przesiewowych, znacząco zmniejszyło zachorowalność i umieralność z powodu raka szyjki macicy w ciągu kolejnych 50 lat konsekwentnego prowadzenia skriningu. Pomimo ogromnego wkładu Papanicolau

w obniżenie częstości występowania raka szyjki, jego klasyfikacja obecnie uważana jest za niejednoznaczną i trudną w interpretacji. W 1988 roku grupa ekspertów stworzyła nowy system opisu oceny rozmazów cytologicznych – The Bethesda System. Klasyfikacja była dwukrotnie modyfikowana i obowiązuje w szeregu państw od 2001 roku. Celem systemu TBS było stworzenie korelacji cytologiczno-histologicznej, poprawa komunikacji między patomorfologami a ginekologami, zmniejszenie liczby wyników fałszywie dodatnich i ujemnych oraz dostarczenie wiarygodnych danych do porównań między ośrodkami. Szczegółowe opisy zmian umożliwiły określenie jakości rozmazu, a także rozdzielenie rozpoznów sugerujących neoplazję od rozpoznów nienowotworowych, m.in. stanów spowodowanych czynnikami infekcyjnymi, zmian odczynowych czy atrofii. W założeniu autorów TBS rozpoznania cytologiczne powinny odpowiadać histopatologicznym stopniom zaawansowania SIL/CIN oraz inwazyjnym rakom szyjki macicy (tabela 1).

Tabela 1. Porównanie klasyfikacji rozpoznów cytologicznych i odpowiadającej jej terminologii rozpoznów histopatologicznych (na podstawie rekomendacji PTGiP 2016)⁵⁴.

Tradycyjne rozpoznanie dysplazja	Terminologia CIN	System Bethesda, SIL
Brodawczak	Brodawczak	LSIL
Dysplazja małego stopnia	CIN1	
Dysplazja średniego stopnia	CIN2	HSIL
Dysplazja dużego stopnia	CIN3	
Rak przedinwazyjny		

Terminologia cytologiczna według klasyfikacji TBS obejmuje:

1. Nieprawidłowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego:

- ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) – atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu,
- ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude HSIL) - atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego, nie można wykluczyć zmian typu HSIL,
- LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion) – śródnabłonkowa neoplazja małego stopnia,
- HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion) - śródnabłonkowa neoplazja dużego stopnia,
- Rak płaskonabłonkowy;

2. Nieprawidłowe komórki nabłonka gruczołowego:

- AGC (atypical glandular cells) – atypowe komórki nabłonka gruczołowego,
- AIS (adenocarcinoma in situ) – rak gruczołowy in situ,
- Gruczolakorak⁵⁴.

Konwencjonalna cytodiagnostyka obarczona jest licznymi błędami, które wpływają na ostateczne rozpoznanie. Błędy techniczne mogą pojawić się na etapie pobierania, utrwalania, barwienia preparatów oraz interpretacji wyników. Jako alternatywę dla cytodiagnostyki konwencjonalnej wprowadzono wspomnianą metodę zabezpieczania materiału na podłożu płynnym (LBC), co poprawiło jakość wymazów. Cytologia płynna pozbawiona jest efektu nakładania się komórek, cytolizy czy ryzyka nieprawidłowego utrwalenia. Z preparatów wyeliminowane są komórki zapalne, krew, śluz itp. przez co są one bardziej czytelne. Wadą testów LBC jest ich wysoki koszt ograniczający ich stosowanie w krajach o niskich nakładach na system profilaktyki onkologicznej.

Mimo unowocześnionej klasyfikacji TBS i nowej technologii LBC efektywność badań cytologicznych pozostaje na niskim poziomie. Głównym ograniczeniem cytodiagnostyki jest jej subiektywny charakter oceny. Czulość badań cytologicznych w identyfikacji CIN2+ oceniana jest na 85%, a swoistość na 23%. Wartość PPV i NPV wynosi odpowiednio 39% i 72%⁵⁵. Duże badania kohortowe (ATHENA n=4275, VUSA n=1303, POBASCAM n=1100) określiły czulość cytodiagnostyki u pacjentek HPV-dodatnich z rozpoznaniem CIN2+ na 51,5% do 66%, specyficzność odpowiednio 73,4% do 89,1%. Dla rozpoznań CIN3+ czulość wyniosła między 53,5% a 75,4%, specyficzność zaś 73% - 85,6%⁵⁶⁻⁵⁸.

W ramach Polskiego Programu Profilaktyki Raka Szyjki Macicy realizowanego przez Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) wykonywane są badania cytologiczne metodą konwencjonalną. Program adresowany jest do kobiet w wieku 25–59 lat, które w ciągu ostatnich 3 lat nie miały pobranego wymazu cytologicznego. U kobiet obciążonych czynnikami ryzyka (zakażonych wirusem HIV, przyjmujących leki immunosupresyjne, zakażonych HPV - typem wysokiego ryzyka) badanie wykonywane jest co 12 miesięcy.

Według analizy kosztów funkcjonowania Programu w latach 2007-2009, całkowity koszt jednego badania cytologicznego wynosił około 60 zł. W 2009 roku

koszt wykrycia jednego stanu przednowotworowego wyniósł ok. 600 zł, natomiast koszt wykrycia jednego nowego przypadku raka szyjki macicy to ok. 15 tys. zł⁵⁹. Zgodnie z analizą opłacalności stosowania metody LBC w ramach skринingu opracowanego na podstawie danych Systemu Informatycznego Monitorowania Profilaktyki (SIMP) i NFZ (2015 r.) jednostkowa cena cytologii płynnej jest wyższa niż cytologii konwencjonalnej i wynosi odpowiednio 178 zł, w porównaniu do 134 zł. LBC charakteryzuje się wyższą czułością i niższą swoistością w porównaniu do metody konwencjonalnej. Większa czułość przyczynia się do zmniejszenia nakładów finansowych na leczenie pojedynczego przypadku raka, który jest wykrywany i rozpoznawany na niskim poziomie zaawansowania. Niższa specyficzność natomiast skutkuje zwiększeniem wydatków na etapie pogłębionej diagnostyki. Wyniki analizy ekonomicznej sugerują wydłużenie oczekiwanego odsetka przeżyć 5-letnich na korzyść cytologii płynnej, a także zmniejszenie zachorowalności o 41/100 tys. kobiet i śmiertelności o 31/100 tys. kobiet⁶⁰. Analizy szacunkowe z 2018 roku określiły, że przy pełnym zastąpieniu cytodiagnostyki konwencjonalnej przez LBC i przy utrzymaniu satysfakcjonującej zgłaszalności do programu, całkowity koszt etapu diagnostycznego w 2021 roku może wzrosnąć z 11,4 do 21,7 mln zł⁶⁰.

Cytodiagnostyka, bez względu na metodę, nie jest narzędziem idealnym. Jej podstawowym ograniczeniem jest wysoki odsetek wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wynoszących nawet 15-50%⁶¹. Ponadto, niesatysfakcjonująca czułość i swoistość cytologii są przyczyną prowadzenia intensywnych badań nad nowymi, ulepszonymi testami wykrywającymi patologię szyjki macicy.

1.6. Diagnostyka molekularna identyfikująca HPV

1.6.1. Test HPV DNA

Odkrycie wirusa brodawczaka ludzkiego, poznanie jego biologii i roli w procesie kancerogenezy szyjki macicy znalazło zastosowanie praktyczne m.in. w opracowaniu testów molekularnych identyfikujących DNA HPV. Pierwsze badanie oceniające aplikację kliniczną testów na DNA HPV (typ 16) u 21 kobiet zostało opublikowane w 1989 roku przez Tidy i wsp.⁶². W ślad za nim ukazały się dwa kolejne opracowania naukowe badające użyteczność kliniczną testów HPV. Pierwsze przeprowadzone przez Reid'a i wsp. (n=1012) wykazało zwiększenie czułości wykrywania zmian przednowotworowych w połączeniu z badaniem cytologicznym⁶³.

Drugie z 1992 roku wykonane przez Cox'a i wsp. oceniało przydatność pierwszego testu HPV DNA (ViraPap Test - HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35) zatwierdzonego do użytku klinicznego przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (US Food and Drug Administration - FDA). W badaniu na 482 pacjentkach oceniono czułość samego testu w wykrywaniu zmian CIN2+ na 70%, a w połączeniu z cytologią na 90%. Na tej podstawie stwierdzono, że dzięki wdrożeniu testów na DNA HPV można ograniczyć o około połowę liczbę wykonywanych kolposkopii z biopsją, co dało pole naukowcom do tworzenia nowych algorytmów diagnostycznych⁶⁴.

Materiał do badania DNA HPV pobierany jest szczoteczką ze strefy przekształceń obejmującej tarczę i kanał szyjki macicy. Wymaz umieszczany jest w podłożu płynnym do cytologii LBC i testu HPV, a następnie przechowywany w temperaturze pokojowej.

Pierwszą metodą molekularną służącą do wykrywania infekcji HPV zarejestrowaną przez FDA był test Hybrid Capture 2 (HC2). Technologia ta oparta jest na hybrydyzacji wirusowego DNA przy pomocy oznakowanych komplementarnych sond RNA. Czułość testu jest wysoka i porównywalna z nowszymi metodami, wadą jest natomiast brak możliwości genotypowania poszczególnych typów HPV oraz występujące wyniki fałszywie ujemne⁶⁵.

Aktualnie najbardziej znaną techniką wykrywania DNA HPV jest metoda oparta na reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time polymerase chain reaction – RT-PCR), która w sposób bezpośredni wykrywa materiał genetyczny wirusa. Reakcja rozpoczyna się od amplifikacji unikalnych dla wirusa fragmentów DNA, następnie przy wykorzystaniu sond fluorescencyjnych dokonywany jest odczyt sygnału i analiza przebiegu reakcji. Przekroczenie wartości progowej przez krzywą amplifikacji sekwencji docelowej wskazuje na pozytywny wynik próbki. W trakcie jednej reakcji możliwa jest jednoczasowa detekcja poszczególnych barwników fluorescencyjnych opowiadających innym sekwencjom docelowym⁶⁶. Na świecie dostępne są różne testy identyfikujące DNA HPV umożliwiające oddzielną detekcję określonej liczby genotypów wirusa.

Porównano efektywność obu powyższych technologii. Czułość metody Hybrid Capture 2 dla wykrywania zmian CIN2+ wyniosła 95,2%, specyficzność 72,4%, natomiast metody PCR odpowiednio 93,7% i 77,2%. Warto zaznaczyć, że czułość

wykrycia w grupie badanej przypadków raka – dla HC2 to 100%, dla PCR – 82,6%⁶⁷. W dużym badaniu kohortowym analizującym strategię triage przy użyciu cytodiagnostyki i testów HPV DNA wykazano wyższą czułość, ale mniejszą swoistość metody molekularnej wykrywającej obecność DNA wirusa w porównaniu do badania cytologicznego. Dla wykrywania zmian CIN3+ czułość cytodiagnostyki wyniosła 70,6%, swoistość 85,6%, natomiast testu na DNA HPV odpowiednio 81,2% i 53,8%. Połączenie obu metod razem znacznie zwiększyło czułość diagnostyczną – 96,3% dla zmian CIN3+ i 95% dla CIN2+⁵⁷.

U młodszych pacjentek ze względu na duży odsetek zakażeń incydentalnych skrining oparty na testach HPV DNA nie jest zalecany. Amerykańskie Towarzystwo ds. Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology – ASCCP) u kobiet poniżej 25 roku życia rekomenduje stosowanie jedynie badań cytologicznych, u starszych pacjentek wskazuje się na dużą rolę testów wykrywających DNA wirusa⁶⁸.

Negatywna wartość predykcyjna testów HPV DNA jest bliska 100%, co oznacza wysoką prawdziwość ujemnych wyników, a tym samym bardzo niskie ryzyko rozwoju zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy w ciągu najbliższych lat u kobiet z negatywnym wynikiem testu. Badanie obejmujące ponad 23 tys. pacjentek z 6 krajów europejskich wykazało, że przy ujemnym wyniku testu na DNA HPV ryzyko rozwoju zmian CIN3+ w ciągu 6 kolejnych lat jest znacznie niższe (0,27%) niż przy prawidłowym wyniku cytologii (0,97%)⁶⁹. Inne duże badanie (n=330 tys.) udowodniło, że ujemny wynik testu na DNA HPV u kobiet powyżej 30 r.ż. daje pewność braku zachorowania na raka szyjki macicy w ciągu kolejnych 5 lat. Ponadto dodanie testu na DNA HPV do badania cytologicznego wykonywanego co 3 lata pozwala na wcześniejszą identyfikację kobiet z wysokim ryzykiem nowotworu⁷⁰. Wdrożenie testów na DNA HPV do badań skriningowych zwiększa czułość wykrywania zmian przednowotworowych oraz pozwala na wydłużenie interwałów między badaniami, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia kosztów związanych z programami diagnostycznymi.

Według wyliczeń na potrzeby „Programu polityki zdrowotnej w kierunku wczesnego wykrywania wirusa human papilloma-virus (HPV)” realizowanego w województwie opolskim w latach 2016-2020, jednostkowy koszt wykonania testu

HPV DNA wynosi ok. 120 zł⁷¹. W analizie kosztów badań przesiewowych przy użyciu testów na DNA HPV, przeprowadzonej w 5 krajach rozwijających się, wykazano opłacalność wykonywania skriningu w dłuższych odstępach czasowych u kobiet powyżej 35 r.ż., uzyskując przy tym obniżenie zachorowalności na raka szyjki macicy o ok. 50%. Test na DNA HPV wykonywany w interwałach 5-letnich okazał się lepszą alternatywą dla programów profilaktycznych opartych dotąd na cytologii konwencjonalnej pobieranej co 3 lata, zarówno ze względu na korzyść ekonomiczną jak i epidemiologiczną⁷².

1.6.2. Test podwójny

Jednoczesne zastosowanie w programie skriningowym testu na DNA HPV oraz cytodiagnostyki nosi miano testu podwójnego, inaczej ko-testingu. Amerykańskie towarzystwa naukowe zalecają stosowanie ko-testingu lub samodzielnego testu HPV DNA w odstępach 5-letnich w miejsce rutynowych badań cytologicznych wykonywanych co 3 lata. Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne (American Cancer Society – ACS) w 2020 roku wydało najnowsze wytyczne rekomendujące rozpoczęcie skriningu raka szyjki macicy u pacjentek powyżej 25 r.ż., opartego na testach HPV DNA zatwierdzonych przez FDA, wykonywanych raz na 5 lat. Jako akceptowalną opcję zaleca się test podwójny co 5 lat lub cytologię co 3 lata. Amerykańskie Towarzystwo ds. Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (ASCCP) oraz Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG) w najnowszych rozporządzeniach z 2019 roku stawiają na równi jako preferowane metody - oparte na identyfikacji DNA HPV, w teście samodzielnym lub w połączeniu z cytologią, wykonywane co 5 lat, u kobiet w wieku 30-65 lat. Metodą alternatywną jest badanie cytologiczne realizowane w interwałach 3-letnich. Towarzystwo The United States Preventive Services Task Force (USPSTF) traktuje równorzędnie powyższe trzy opcje diagnostyczne (tabela 2)^{68,73-75}.

Tabela 2. Porównanie rekomendacji skriningu raka szyjki macicy według amerykańskich towarzystw naukowych^{68,73-75}.

WIEK	ASCCP/ACOG 2019	USPSTF 2018	ACS 2020
<21 r.ż.	Nie zaleca się	Nie zaleca się	Wiek <25 r.ż.: Nie zaleca się
21 – 29 r.ż.	Cytologia co 3 lata	Cytologia co 3 lata	Wiek 25 – 29 r.ż.: • Test HPV DNA co 5 lat (preferowane) • Ko-testing co 5 lat lub cytologia co 3 lata (akceptowalne)
30 – 65 r.ż.	• Test HPV DNA lub ko-testing co 5 lat (preferowane) • Cytologia co 3 lata (akceptowalna)	• Test HPV DNA lub ko-testing co 5 lat (preferowane) • Cytologia co 3 lata (akceptowalna)	• Test HPV DNA co 5 lat (preferowane) • Ko-testing co 5 lat lub cytologia co 3 lata (akceptowalne)
>65 r.ż.	Nie zaleca się Jeśli w wywiadzie nie było zmian $\geq$CIN2 Wymóg: w ciągu ostatnich 10 lat (ACOG) / 20 lat (ASCCP) prawidłowe wyniki screeningu	Nie zaleca się Wymóg: w ciągu ostatnich 10 lat prawidłowe wyniki screeningu	Nie zaleca się Wymóg: w ciągu ostatnich 10 lat prawidłowe wyniki screeningu
Stan po histerektomii z szyjką macicy	Nie zaleca się Jeśli w wywiadzie nie było zmian $\geq$CIN2 lub raka szyjki macicy	Nie zaleca się Jeśli w wywiadzie nie było zmian $\geq$CIN2 lub raka szyjki macicy	Nie zaleca się Jeśli w wywiadzie nie było zmian $\geq$CIN2 lub raka szyjki macicy w ciągu ostatnich 25 lat

Według analizy efektywności diagnostycznej oraz kosztowej, porównującej 3 powyższe strategie skriningowe na grupie prawie 100 tys. kobiet, wykazano najwyższą czułość wykrywania zmian CIN3+ dla testu podwójnego (99,4%). Czułość samodzielnych metod - testu na DNA HPV oraz cytodiagnostyki wyniosła odpowiednio 94,1% i 90,7%. Pojedynczy test HPV DNA okazał się nieco bardziej swoisty (98,1%) niż pozostałe strategie (obie 97,6%) i miał najwyższy wskaźnik PPV (12,1% vs. 10,3% dla cytologii i 9,6% dla ko-testingu). Wartość NPV była jednakowa dla wszystkich metod (>99,9%). W interwale 3-letnim samodzielny test na DNA HPV okazał się najtańszą strategią (294 wykryte zmiany CIN3+, przy 2422 wykonanych kolposkopiach, koszt 3,47 mln \$) i bardziej efektywną niż badanie cytologiczne (9 wykrytych

przypadków CIN3+ mniej, przy wyższym koszcie diagnostyki pogłębionej). Test podwójny wykrył 14 zmian CIN3+ więcej niż pojedynczy test na DNA HPV, co wymagało wykonania ok. 100 tys. dodatkowych wymazów cytologicznych, 566 dodatkowych kolposkopii, kosztem ponad 170 tys. \$ za każdy zdiagnozowany przypadek, co razem dało 2,38 mln \$ dodatkowego nakładu finansowego. Samodzielny pierwotny test na DNA HPV wydaje się być metodą o najlepszych parametrach diagnostycznych przy zachowaniu opłacalności budżetowej⁷⁶.

1.6.3. Test HPV mRNA

Wyrazem postępu diagnostyki molekularnej w ostatnich latach jest opracowanie metody PCR opartej na identyfikacji transkryptów mRNA E6/E7 onkogenów HPV. W następstwie wbudowania genomu HPV w genom komórki gospodarza dochodzi do nadekspresji białek E6 i E7, co świadczy o przetrwałej infekcji onkogennymi typami wirusa. Wynikiem powyższych procesów jest destabilizacja genomu, zaburzenie regulacji cyklu komórkowego, zahamowanie procesów apoptozy, uszkodzenie DNA, a w konsekwencji przemiana nowotworowa. Obecność transkryptów E6/E7 świadczy zatem o wysokim ryzyku rozwoju zmian typu HSIL i ich progresji w kierunku raka. Testy HPV mRNA oparte są na analizie amplifikacji RNA przy pomocy odwrotnej transkryptazy. Materiał pobierany jest szczoteczką z szyjki macicy, tak samo jak w przypadku testów HPV DNA, na podłoże płynne.

Czułość testów HPV DNA i mRNA jest porównywalna. Według artykułu z 2017 roku porównującego obie te metody na 1866 pacjentkach, czułość obu testów wykrywających 14 typów HPV wyniosła 97%. Specyficzność testu HPV mRNA dla zmian $\geq$ HSIL była jednak istotnie wyższa niż klasycznego testu HPV DNA, odpowiednio 41% i 13%. Pozytywna wartość predykcyjna, w wykrywaniu $\geq$ HSIL, testu opartego na detekcji mRNA wyniosła 25%, co w porównaniu do metody identyfikującej DNA HPV wynoszącej 16%, skutkuje lepszą oceną pacjentek z wysokim ryzykiem rozwoju zmian zaawansowanych⁷⁷. Podobne wyniki uzyskano w badaniu obejmującym 413 kobiet przy użyciu obu technologii. Specyficzność metody identyfikującej mRNA E6/E7 w stosunku do testu HPV DNA była prawie trzykrotnie wyższa (50% vs. 18%). Wartość PPV dla testu HPV mRNA i DNA wyniosła odpowiednio 62% i 52%⁷⁸. Ujemne wyniki testów HPV mRNA charakteryzują się wyższą wartością prognostyczną niż testy HPV DNA w populacji kobiet poniżej 30 r.ż., u których większość rozpoznań

to zmiany ulegające samoistnej regresji. Procedura oparta na detekcji transkryptów E6/E7 mRNA, mimo dużego kosztu jednostkowego, pozwala na wykrycie pacjentek z istotnym ryzykiem progresji zmian w kierunku nowotworowym, ograniczenie wykonywania dodatkowych badań inwazyjnych przy negatywnym wyniku, a tym samym zmniejszenie kosztów związanych z kolposkopią i biopsją szyjki macicy.

1.7. Diagnostyka pogłębiona - kolposkopia

Etap pogłębionej diagnostyki raka szyjki macicy obejmuje badanie kolposkopowe oraz analizę histopatologiczną pobranych wycinków z miejsc podejrzanych o nowotworzenie. Kolposkopia została opracowana przez niemieckiego ginekologa Hansa Hinselmanna w 1925 roku. Jej nazwa pochodzi od dwóch greckich słów: kolpos – pochwa i skopeo – uważnie patrzeć. Polega na dokładnym oglądaniu szyjki macicy, a także powierzchni błony śluzowej sromu oraz pochwy przy pomocy powiększającego dwuokularowego urządzenia optycznego połączonego ze źródłem światła – kolposkopu. Czułość metody w wykrywaniu zmian HSIL+ wynosi w przybliżeniu 56%, swoistość zaś około 94%. Dodatnia i ujemna wartość predykcyjna plasują się w granicach odpowiednio 77% i 85%⁷⁹.

W 2020 roku Polskie Towarzystwo Kolposkopii i Patofizjologii Szyjki Macicy (PTKiPSM) oraz Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników (PTGiP) wydało rekomendacje dotyczące protokołów kolposkopowych. W zakres zalecanego optymalnego standardu postępowania wchodzi:

- ocena kolposkopowa tarczy szyjki macicy z podziałem na kwadranty,
- pobranie wycinków ze wszystkich rekomendowanych obszarów,
- ewentualnie, w przypadku nieuwidocznienia nieprawidłowości, pobranie biopsji losowej z nowego SCJ (nowej granicy międzynabłonkowej) z godzin 2, 4, 8 i 10,
- pobranie materiału z kanału szyjki macicy u wszystkich pacjentek z wyjątkiem ciężarnych⁸⁰.

Pierwszym etapem kolposkopii jest ocena makroskopowa sromu oraz ścian pochwy, następnym - potwierdzenie adekwatności badania podczas wstępnej analizy wzrokowej. Kolposkopia nieadekwatna nie pozwala badającemu w pełni postawić rozpoznania z przyczyn od niego niezależnych (zmiany zapalne, krwawienie, blizna)⁸¹.

Kolejno, po przemyciu powierzchni szyjki 0,9% roztworem soli fizjologicznej, dokonuje się ponownej wizualizacji szyjki i ścian pochwy. Rekomenduje się 4- do 15-krotne powiększenie obrazu. Następnym etapem jest ocena łożyska naczyniowego przy pomocy wbudowanego zielonego filtru. W świetle zielonym atypowe czerwone naczynia widoczne są jako czarne gałązki, których wygląd umożliwia rozpoznanie charakteru zmiany. Najistotniejszym etapem badania kolposkopowego jest wykonanie próby z 3-5% wodnym roztworem kwasu octowego, który aplikuje się na powierzchnię szyjki. Kwas octowy powoduje odwracalną denaturację cytokeratyn obecnych w nabłonku, co doprowadza do zbielenia jego powierzchni. W prawidłowym, dojrzałym nabłonku zbielenie jest nieobecne. Intensywność zbielenia, obrzęk nabłonka oraz czas trwania reakcji rośnie wraz z zaawansowaniem patologii. Oceny szyjki i ścian pochwy dokonuje się po 1 i po 3 minutach od aplikacji kwasu octowego. Ostatnim etapem jest przeprowadzenie próby Schillera – przemycie części pochwowej szyjki macicy płynem Lugola, czyli roztworem jodu w jodku potasu. W prawidłowym nabłonku obecny glikogen powoduje wybarwienie powierzchni na kolor ciemnobrązowy, reakcja daje wynik jodopozytywny. Na skutek nasilonej proliferacji komórek tworzących SIL lub bardziej zaawansowane patologie, nabłonek pozbawiony jest glikogenu, przez co nie ulega wybarwieniu. Próba ma charakter nieswoisty, gdyż wynik jodonegatywny może być osiągany w innych stanach patologicznych, zmianach doczesnowych, a także w nabłonku prawidłowym. Ze względu na niespecyficzność testu, nie jest on zalecany w podstawowym schemacie badania kolposkopowego. Współczesne kolposkopy wyposażone są w cyfrowy aparat fotograficzny umożliwiający dokumentację powyższych etapów⁸⁰.

Opisów obrazów kolposkopowych dokonuje się według ujednoliconej nomenklatury powstałej na drodze konsensusu polskich ekspertów w 2020 roku, opartej na rekomendacjach Międzynarodowej Federacji Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy - IFCCPC) z 2011 roku. Tabela 3 przedstawia zalecaną terminologię kolposkopową⁸¹.

Po dokładnej ocenie kolposkopowej dokonywana jest selekcja obszarów, z których pobierany będzie materiał do badania histopatologicznego. Rekomendowany protokół obejmuje: biopsję celowaną, ewentualnie biopsję losową oraz pobranie materiału z kanału szyjki macicy. Złotym standardem w wykrywaniu zmian

HSIL/CIN2+ jest badanie kolposkopowe połączone z biopsją celowaną, pobieraną z miejsc podejrzanych o rozwój SIL lub przemianę nowotworową. Zaleca się pobranie co najmniej jednego bioptatu kleszczykami o szerokości cięcia 2mm. Materiał z kanału szyjki macicy pobierany jest przy użyciu łyżki ginekologicznej, ewentualnie za pomocą szczoteczki kanałowej typu EndoCervex-Brush. Rozpoznanie AGC oraz AIS wymagają pobrania diagnostycznego materiału dodatkowo z jamy macicy. Po zakończonych procedurach inwazyjnych stosuje się rutynową kontrolę hemostazy⁸⁰.

Tabela 3. Polska nomenklatura kolposkopowa 2020 w oparciu o mianownictwo IFCPC 2011 (rekomendacje PTGiP 2020)⁸¹.

KOLPOSKOPIA 2020 POLSKA NOMENKLATURA KOLPOSKOPOWA w oparciu o mianownictwo IFCPC 2011 KONSENSUS EKSPERTÓW			
Ocena ogólna		- Adekwatna/nieadekwatna z powodu... (np. ograniczonego uwidocznienia szyjki z powodu zapalenia, krwawienia, blizny) - Uwidocznienie nowego połączenia międzynałonkowego: widoczne całkowicie, widoczne częściowo, niewidoczne - Typ strefy transformacji: 1, 2, 3	
Prawidłowe obrazy kolposkopowe		Pierwotny nabłonek wielowarstwowy płaski - Dojrzały - Atroficzny Nabłonek walcowaty - Ektopia Metaplastyczny nabłonek wielowarstwowy płaski - Torbiele Nabotha - Otwarte krypty gruczołowe Zmiany doczesnowe w ciąży	
Nieprawidłowe obrazy kolposkopowe:	Zasady ogólne	Lokalizacja zmiany: w obrębie lub poza strefą transformacji, lokalizacja zmiany wg położenia wskazówek na tarczy zegara Wielkość zmiany: liczba kwadrantów, którą zajmuje zmiana, wielkość zmiany jako procent zajęcia tarczy	
	Stopień 1 (mniejsze zmiany kolposkopowe)	Cienkie zbielenie nabłonka Nieregularna, geograficzna granica	Drobna mozaika Drobne punkcikowanie
	Stopień 2 (większe zmiany kolposkopowe)	Gęste zbielenie nabłonka Zbielenie szybko pojawiające się Obwałowane ujścia krypt gruczołowych	Gruba mozaika Grube punkcikowanie Ostra granica Objaw granicy wewnętrznej Objaw grzbietu
	Niespecyficzne	Leukoplakia (keratoza, hiperkeratoza), nadżerka Barwienie płynem Lugola (test Schillera): zabarwiony/niezabarwiony	
Zmiany podejrzane o inwazję		Naczynia atypowe Objawy dodatkowe: kruche naczynia, nierówna powierzchnia, zmiana egzofityczna, martwica, owrzodzenie (martwicze), guz/nowotwór widoczny makroskopowo	
Pozostałe zmiany		Wrodzona strefa transformacji Kłykciny kończyste Polip (ektocerwikalny/endocerwikalny) Zapalenie	Zwężenie Zaburzenia wrodzone Zmiany po leczeniu Endometrioza

1.8. Miejsce immunocytochemii w diagnostyce patologii szyjki macicy

Wiedza dotycząca biologii HPV i procesu kancerogenezy dostarczyła cennych informacji w zakresie prognozowania zmian w kierunku inwazyjnego raka szyjki macicy. Mimo rozwoju metod molekularnych wykrywania DNA i mRNA HPV, nadal trwają badania nad testami diagnostycznymi o zwiększonej czułości i swoistości. W sferze poszukiwań nad nowymi metodami, umożliwiającymi różnicowanie na wczesnym etapie zmian o charakterze incydentalnym od patologii średniego i wysokiego stopnia, znalazła się diagnostyka immunocytochemiczna.

W 2002 roku wprowadzono do badań przesiewowych detekcję białka p16INK4a (p16) w preparatach cytologicznych oraz histopatologicznych. Fizjologicznie białko p16 pełni rolę inhibitora cyklinozależnej kinazy CDK, przeciwdziała tworzeniu się aktywnego kompleksu CDK4 z cykliną D, a tym samym zapobiega fosforylacji białka pRb. W konsekwencji pRb tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, dzięki czemu cykl komórkowy zatrzymuje się w fazie G1. W prawidłowych tkankach wykrywana jest niska ekspresja p16INK4a. W momencie zakażenia onkogennymi typami HPV, białko wirusowe E7 prowadzi do zakłócenia szlaku pRb-E2F, wobec czego dochodzi do nadekspresji p16INK4a i przejścia komórki do fazy S. Dlatego białko p16 jest uważane za marker niekorzystnych prognostycznie zmian wykrywanych na wczesnym etapie kancerogenezy⁸².

Metodę wykrywania białka p16 uzupełniono w 2010 roku o detekcję antygenu jądrowego Ki-67. Białko Ki-67 jest markerem proliferacji komórkowej, występuje we wszystkich fazach podziałowych (G1, S, G2, M), z wyjątkiem fazy G0. Ekspresja Ki-67 wrasta wraz z zaawansowaniem złośliwego charakteru zmian⁸².

Jednoczasowa detekcja białek p16 i Ki67 została wykorzystana do opracowania testu immunocytochemicznego o nazwie CINtec PLUS. Pozwala on na wykrycie komórek o zaburzonym cyklu komórkowym spowodowanym infekcją HPV. Nadekspresja supresora nowotworów – białka p16 oraz ekspresja markera proliferacji – białka Ki-67 w warunkach fizjologicznych nie występuje w tej samej komórce. Stąd, wykrycie koekspresji p16/Ki-67, przy pomocy przeciwciał, służy do identyfikacji transformacji nowotworowej. Dodatni wynik reakcji barwnej występuje, gdy w tej samej komórce dochodzi jednocześnie do wybarwienia jądra na kolor czerwony (ekspresja p16) i cytoplazmy na kolor brązowy (ekspresja Ki-67).

Dla postawienia pozytywnego wyniku testu immunocytochemicznego wystarczy obecność jednej podwójnie wybarwionej komórki w preparacie cytologicznym. Badanie pozwala na wyodrębnienie grupy pacjentek, które wymagają diagnostyki pogłębionej⁸².

W dużej metaanalizie, porównującej metodę podwójnego barwienia z testem HPV DNA, na podstawie 38 badań wykazano podobną czułość obu technik diagnostycznych dla wykrywania zmian CIN2 i CIN3, przy znacznie większej swoistości testu p16/Ki-67 (tabela 4).

Tabela 4. Czułość i swoistość testu p16/Ki-67 oraz testu HPV DNA u pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US lub LSIL dla wyników histopatologicznych CIN2 i CIN3, na podstawie danych z metaanalizy⁸³.

Test	Pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US/LSIL	Wynik histopatologiczny	Liczba badań włączonych do metaanalizy	Czułość [%]	Swoistość [%]
p16/Ki-67	ASC-US	CIN2+	13	84	77
		CIN3+	5	88	72
	LSIL	CIN2+	18	86	66
		CIN3+	6	96	47
HPV DNA	ASC-US	CIN2+	25	93	45
		CIN3+	14	98	47
	LSIL	CIN2+	25	95	27
		CIN3+	13	100	22

U pacjentek z rozpoznaniem ASC-US czułość testu p16/Ki-67 jest mniejsza niż testu na DNA HPV dla wykrywania zmian CIN3+, odpowiednio 88% i 98%. Natomiast wykluczenie zmian CIN2 jest bardziej swoiste w przypadku metody podwójnego barwienia (77% vs. 45%). Czułość obu metod u pacjentek z rozpoznaniem LSIL dla wykrywania zmian CIN3+ jest porównywalna, za to specyficzność wykluczenia CIN2 jest ponad 2-krotnie wyższa w przypadku testu immunocytochemicznego – 66%, w porównaniu do testu HPV DNA – 27%. Powyższe wyniki wskazują na przewagę metody podwójnego barwienia nad testem molekularnym wykrywającym DNA wirusa, zwłaszcza u pacjentek z cytologią LSIL. Prym immunocytochemii dotyczy większych zdolności metody do potwierdzenia zmian o wyższym zaawansowaniu histopatologicznym typu CIN2+ oraz do możliwości efektywnego wykluczenia patologii incydentalnej⁸³.

1.9. Nowa metoda diagnostyczna - metylacja DNA

Aktualnie trwają poszukiwania ulepszonych metod diagnostycznych wykrywających zmiany o dużym ryzyku progresji. Skrining w kierunku raka szyjki macicy nastawiony na identyfikację pacjentek z zaawansowanymi zmianami przedrakowymi pozwalałby na wykonywanie diagnostyki pogłębionej jedynie w przypadku rozpoznania rzeczywiście wymagających weryfikacji. Badania nad nowymi metodami, których czułość, swoistość, wartość PPV i NPV byłyby jak najbliższe 100% w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy, są nadal w toku. Wysokie parametry diagnostyczne pozwoliłyby na ograniczenie wykonywania kolposkopii z powodu wyników fałszywie pozytywnych, co w konsekwencji doprowadziłoby do oszczędności nakładów finansowych przeznaczonych na profilaktykę.

W ostatnich latach nastąpił postęp w dziedzinie nazywanej epigenetyką, czyli nauką zajmującą się badaniem procesów modyfikacji ekspresji genów, które nie są zależne od zmian sekwencji genomu. Termin „epigenetyka” został wprowadzony w 1942 roku przez brytyjskiego biologa Conrada Waddingtona jako interakcje zachodzące między genami i ich produktami, decydujące o fenotypie⁸⁴. Aktualnie pojęcie epigenetyki oznacza każdą stabilną lub dziedziczną zmianę w ekspresji genów, która nie obejmuje zmian w sekwencji DNA. Spektrum zainteresowań epigenetyki obejmuje dziedziczenie pozagenowe. Mechanizmy epigenetyczne kierują organizmem od stadium zapłodnienia do śmierci. Do głównych zmian ekspresji genów kontrolowanych przez epigenom należy metylacja DNA, modyfikacje histonów oraz wyciszanie genów oparte na miRNA.

Szczególne zainteresowanie wśród naukowców budzi obecnie udział metylacji DNA w powstawaniu nowotworów. Metylacja DNA to proces kowalencyjnego przyłączania grup metylowych (-CH₃) do zasad azotowych nukleotydów, głównie do cytozyny, w obrębie tzw. wysp CpG w pozycji 5' pierścienia pirymidynowego. Wyspy CpG to regiony w genomie utworzone z dinukleotydów – cytozyny połączonej wiązaniem fosfodiesterowym z guaniną. Reakcja metylacji zachodzi dzięki enzymom – metylotransferazom DNA, jest procesem enzymatycznym, a zatem odwracalnym, podlegającym demetylacji. W prawidłowych komórkach regulacja genów zależy od określonego, niezmiennego wzoru metylacji DNA. Pod wpływem niekorzystnych czynników kancerogennych wzór metylacji może ulegać zmianom⁸⁵.

Zaburzone wzorce metylacji DNA pełnią ważną rolę w procesie nowotworzenia. Onkogeneza może być powiązana z różnymi zmianami metylacji, do których należą: hipermetylacja wysp CpG, hipometylacja prawidłowo zmetylowanych genów, metylacja pozostałych zasad azotowych oraz destabilizacja chromosomów. Hipermetylacja, czyli zwiększenie poziomu metylacji promotorów różnych genów powoduje utratę ich funkcji. Nasiloną metylacja promotorów genów supresorowych odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego i hamowanie procesu proliferacji, prowadzi do rozwoju kancerogenezy. Po raz pierwszy zaobserwowano zmiany w metylacji związane z HPV w 1984 roku⁸⁶. Białka E6 i E7 onkogennych typów HPV mogą zwiększać ekspresję enzymów metylotransferaz DNA, prowadząc do hipermetylacji wielu różnych genów. Najistotniejszym skutkiem tego procesu jest hamowanie promotorów genów supresorowych. Proteina E6 aktywuje metylotransferazę DNA 1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 – DNMT1) poprzez supresję p53, natomiast białko E7 może bezpośrednio asocjować z DNMT1 indukując jego nadekspresję⁸⁷.

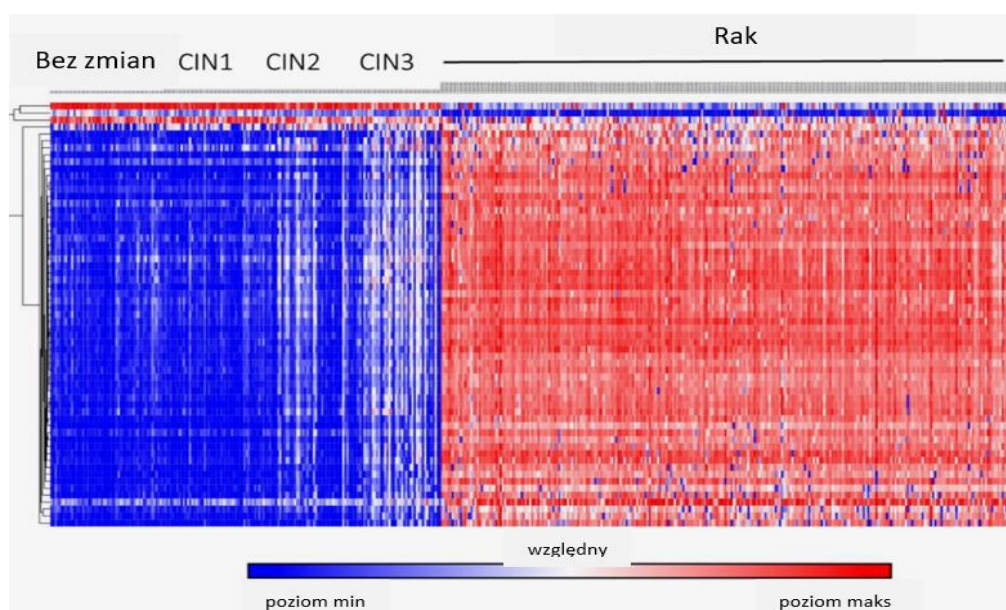
Dotychczas odkryto ponad 100 ludzkich genów będących biomarkerami metylacji w raku szyjki macicy, spośród których szczegółowo w literaturze zostało opisanych około 20. Najbardziej znaczące klinicznie, wykrywane w zmianach o zaawansowanej transformacji nowotworowej i w raku inwazyjnym to: CADM1, MAL, FAM19A4, mir124-2, PAX1, SOX1 i EPB41L3⁸⁵. Każdego roku odkrywane są nowe geny, których aktywność jest zaburzona przez hipermetylację ich promotora. Aktualnie trwają prace nad testami diagnostycznymi umożliwiającymi detekcję hipermetylacji promotora różnych genów w materiale pobranym z szyjki macicy. Do tej pory nie odkryto pojedynczego genu, który byłby wystarczająco czuły i swoisty w wykrywaniu zaawansowanej śródnamionkowej neoplazji szyjki macicy. Obecne badania sukcesywnie rozszerzają panele biomarkerów metylacji, konstruując najlepsze diagnostycznie kombinacje testowe.

Testy molekularne wykrywające metylację DNA oparte są na różnych technologiach. Najpopularniejszą metodą jest analiza ilościowa specyficznej dla metylacji reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative methylation-specific PCR – qMSP). Próbkę do testów pobierane z szyjki macicy lub pochwy mogą być umieszczane w specjalnej cieczy transportowej lub przesyłane w postaci suchej. Wyizolowane DNA z materiałów klinicznych podlega amplifikacji,

a następnie poddawane jest pirosekwencjonowaniu lub konwersji wodorosiarczynem^{88,89}. Istnieją też metody analizy całego genomu przy pomocy różnych chipów wraz z masowym równoległym głębokim sekwencjonowaniem⁹⁰. Testy metylacyjne Multiplex RT-PCR powielają jednocześnie regiony promotorów kilku różnych genów supresorowych raka szyjki macicy.

W badaniach klinicznych analizujących poziomy metylacji wielu różnych genów komórek gospodarza (m.in. CADM1, MAL, FAM19A4, mir124-2, JAM3, C13ORF, TERT, EPB41L3, ANKRD18CP, CDH6, GFRA1, GATA4, LHX8, PRDM14) wykazano wysoką czułość i swoistość wykrywania zmian zaawansowanych z krótkoterminowym ryzykiem progresji do raka szyjki macicy. Ponadto, testy metylacyjne przeprowadzone wśród pacjentek HPV-dodatnich pozwalają na ocenę możliwości rozwoju zmian CIN3+ z wieloletnim wyprzedzeniem⁹¹. Połączenie oceny metylacji promotorów kilku genów w reakcji multiplex PCR np. CADM1/MAL lub FAM19A4/mir124-2, zwiększa skuteczność diagnostyczną testu, cechuje się wysoką powtarzalnością, krótszym czasem pracy przy użyciu mniejszej ilości materiału oraz lepszą jakością uzyskanych danych⁹².

Na rycinie 5 przedstawiono mapę analizy metylacji DNA. Poziom metylacji koreluje z progresją zmian. Każdy rząd prezentuje sondę, która odpowiada markerowi metylacji DNA. Każda kolumna oznacza próbkę pobraną od pacjentki⁹³.



Rycina 5. Mapa analizy metylacji wysp CpG w próbkach pobranych z szyjki macicy (n=54 próbki prawidłowe; 50 CIN1; 40 CIN2; 42 CIN3; 270 rak inwazyjny)⁹³.

Wykazano, że testy analizujące hipermetylację promotorów genów supresorowych: CADM1, MAL, mir124-2 i FAM19A4 charakteryzują się czułością 100% w wykrywaniu raka szyjki macicy^{94,95}. Metaanaliza porównująca strategie diagnostyczne u pacjentek z pozytywnym wynikiem HPV oceniła czułość różnych testów metylacyjnych w diagnozowaniu zmian CIN3+ mieszczącą się w zakresie 43% - 96%. Swoistość wahała się między 33% a 91%, NPV 91,2% - 93,9%, a PPV 30% - 48,1%⁹¹.

Metody wykrywające metylację DNA mogą być wykorzystywane jako testy kontrolne, informujące o krótkoterminowym ryzyku progresji u pacjentek z dodatnim wynikiem HPV lub nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego (ASC-US/LSIL), celem określenia konieczności wykonania diagnostyki pogłębionej. Pozytywny wynik testu metylacyjnego mówi o aktywnym procesie kancerogenezy w komórkach szyjki macicy, skłania tym samym do przeprowadzenia dodatkowych badań. Natomiast wynik negatywny upoważnia do pozostawienia pacjentki pod obserwacją. Zdolność technologii metylacyjnej do oceny ryzyka przemiany nowotworowej lub regresji infekcji HPV otwiera perspektywę na wprowadzenie nowych programów diagnostycznych. Ograniczenie liczby wykonywanych kolposkopii jedynie do niezbędnych, pozwoliłoby zmniejszyć ogólne koszty skriningu. Aktualnie nadal trwają badania nad rozwojem i komercjalizacją testów metylacyjnych. Określenie ich parametrów diagnostycznych w wykrywaniu zaawansowanych śródnabłonkowych neoplazji szyjki macicy, dostarczyłoby kompletniejszych informacji, a w połączeniu z dotychczasowymi metodami umożliwiłoby stworzenie atrakcyjniejszych schematów przesiewowych.

2. Cele

Głównym założeniem pracy była analiza przydatności testu metylacyjnego dla genów supresorowych FAM19A4 i mir124-2, który miałby stanowić alternatywę lub uzupełnienie metody molekularnej identyfikującej DNA HPV oraz cytodiagnostyki w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy. Na świecie poszukuje się metody diagnostycznej umożliwiającej redukcję liczby skierowań na diagnostykę pogłębioną, doprowadzając do oszczędności nakładów finansowych przeznaczonych na profilaktykę raka szyjki macicy, przy zachowaniu wysokiej wykrywalności zaawansowanej neoplazji i raka szyjki macicy.

2.1. Cel główny

1. Analiza przydatności testu metylacyjnego dla genów supresorowych FAM19A4 i mir124-2 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy.

2.2. Cele szczegółowe

1. Określenie wartości diagnostycznej testu metylacyjnego dla genów FAM19A4 i mir124-2 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy.
2. Ocena stopnia korelacji między częstością wykrywania procesu metylacji genów FAM19A4 i mir124-2 a zaawansowaniem rozpoznanej patologii, z podziałem na $\leq$ CIN1, CIN2, CIN3, rak szyjki macicy.
3. Ocena korelacji między wykrytą metylacją genów FAM19A4 i mir124-2 a genotypami HPV, z podziałem na HPV 16, HPV 18 i łączną grupę HPV HR.
4. Ocena korelacji między wykrytą metylacją genów FAM19A4 i mir124-2 a wiekiem pacjentek, z podziałem na grupy <30 r.ż. i ≥ 30 r.ż.
5. Porównanie wartości diagnostycznej testu metylacyjnego dla genów FAM19A4 i mir124-2 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy z metodą molekularną identyfikującą DNA HPV, cytodiagnostyką oraz ko-testingiem.

3. Materiał

Badania realizowano w Poradni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (PPSM GPSK UM w Poznaniu). Materiał pobierano od marca 2019 do lutego 2021 roku. Badania wykonywane były prospektywnie.

Kryteria włączenia do badania obejmowały pacjentki skierowane z powodu nieprawidłowego wyniku cytologicznego lub klinicznego podejrzenia patologii szyjki macicy przy prawidłowym wyniku cytologii (brak obecności neoplazji śródnabłonkowej lub zmian nowotworowych – negative for intraepithelial lesion or malignancy – NILM). Za wynik nieprawidłowy według TBS uznawano: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, rak płaskonabłonkowy, AGC, AIS, gruczolakorak. Do badania zakwalifikowano 98 kobiet między 18 a 69 rokiem życia.

Każda pacjentka miała pobrany test HPV DNA HR oraz test metylacyjny QIASure. Ponadto, u wszystkich kobiet wykonano kolposkopię z biopsją tarczy szyjki macicy oraz łyżeczkowanie kanału szyjki macicy. Część pacjentek skierowanych z powodu klinicznego podejrzenia patologii, które nie posiadały zewnętrznego wyniku cytologii oraz pacjentki, których wynik cytologiczny wymagał weryfikacji miały pobrany wymaz cytologiczny na podłoże płynne w PPSM GPSK UM w Poznaniu. Wszystkie badania zostały przeprowadzone po uprzednim otrzymaniu pisemnej zgody od każdej pacjentki.

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu – Uchwała nr 36/19.

*Na potrzeby niniejszej pracy test molekularny identyfikujący DNA HPV oparty na reakcji PCR nazwano metodą molekularną.

*Mimo aktualnej nomenklatury histopatologicznej dotyczącej nazewnictwa śródnabłonkowej neoplazji małego stopnia – LSIL oraz śródnabłonkowej neoplazji średniego i dużego stopnia – HSIL, na potrzeby niniejszej pracy, zgodnie z porównywaną literaturą światową, zastosowano nazwy CIN1 dla LSIL, CIN2 i CIN3 dla HSIL.

4. Metoda

4.1. Cytodiagnostyka

Materiał do badania cytologicznego umieszczano w podłożu płynnym na bazie wodnego roztworu denaturowanego etanolu - BD SurePath Preservative Fluid. Po uprzednim założeniu wziernika i usunięciu z szyjki nadmiaru śluzu przy pomocy jałowego gazika, wymaz pobierano jałową szczoteczką typu Cyto-Brush z tarczy i kanału szyjki macicy. Szczoteczkę wprowadzano do zewnętrznego ujścia kanału szyjki na głębokość 1-1,5 cm i obracano zgodnie z ruchem wskazówek zegara pięć razy wokół własnej osi. Następnie szczoteczkę umieszczano w większym otworze pojemnika BD SurePath Collection Vial (zawierającego BD SurePath Preservative Fluid), przekręcano o 90° i pociągano do góry pozostawiając końcówkę szczoteczki w pojemniku. Tak przygotowany materiał przechowywano w temperaturze 2-30°C do czasu analizy cytologicznej.

Preparaty do testu BD SurePath Liquid-based Pap Test przygotowywano przy zastosowaniu automatycznego systemu BD Totalys SlidePrep firmy Becton Dickinson. System umożliwia konwersję płynnych zawiesin z pobranym materiałem komórkowym w jednorodne, cienkowarstwowe, indywidualnie barwione preparaty. Proces przekształcania materiału przebiega wieloetapowo. Pierwszym etapem jest mieszanie na wytrząsarce zakonserwowanych próbek. W dalszej kolejności przygotowane próbki nanoszone są na odczynnik do wirowania w gradiencie stężenia BD Density Reagent. Podczas wirowania odbywa się wzbogacanie materiału i sedymentacja. Z próbek usuwana jest część komórek zapalnych oraz inne zanieczyszczenia. Następnie wymieszany osad komórek przenoszony jest do komory osadczej zamontowanej na szkiełku podstawowym - BD SurePath PreCoat. Komórki po przejściu sedymentacji grawitacyjnej, barwione są zmodyfikowaną metodą Papanicolaou. Szkiełko podstawowe przemywane jest ksylenem i pokrywane szkiełkiem nakrywkowym. Wybarwione komórki, gotowe do analizy mikroskopowej, znajdują się w krążku o średnicy 13 mm⁹⁶.

Preparaty oceniano przy użyciu mikroskopu optycznego Axioskop 40 (Zeiss) w powiększeniu 200- do 400-krotnym przez specjalistów cytomorfologii medycznej. Wszystkie rozmazy ujemne były oceniane wtórnie przez starszego cytotechnika. Dobór preparatów do tej oceny był dokonywany metodą „schodkową”. Każdy nieprawidłowy

cytoonkologicznie wynik podlegał ponownej ocenie przez lekarza patomorfologa wyspecjalizowanego w cytodiagnostyce. Klasyfikacji obrazów dokonywano według systemu Bethesda.

4.2. Test HPV DNA

Materiał komórkowy do badania na DNA HPV oraz do testu metylacyjnego pobierany był jałową szczoteczką Cervical Brush z tarczy i kanału szyjki macicy oraz ze sklepień pochwy. Szczoteczkę umieszczano centralnie w ujściu zewnętrznym kanału szyjki i obracano pięciokrotnie wokół własnej osi zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Materiał do obu testów umieszczano w jednym pojemniku z płynnym podłożem – Roche Cell Collection Medium. Szczoteczkę wypłukiwano przyciskając ją dziesięciokrotnie do dna pojemnika, a następnie wykonywano ruch wirujący. Do czasu analizy wirusologicznej, próbki przechowywane były w temperaturze 2-8°C. Badania wykonywano w Pracowni Wirusologii Molekularnej PPSM GPSK UM w Poznaniu.

Do detekcji HPV wykorzystano jakościowy test molekularny oparty na reakcji Real-Time PCR – Cobas® 4800 HPV Test (Roche Diagnostics). Test ten pozwala na oznaczenie 14 typów wirusa brodawczaka ludzkiego w warunkach *in vitro* z genotypowaniem typów HPV 16 i 18 oraz zbiorczą identyfikacją typów wirusa o wysokim stopniu ryzyka (high risk – HR): 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68. Test Cobas® 4800 HPV opiera się na trzech głównych etapach: przygotowaniu próbek, amplifikacji PCR sekwencji docelowych DNA oraz detekcji znakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych swoistych dla identyfikowanych typów HPV⁹⁷.

Przygotowanie próbek do testu jest w pełni zautomatyzowane przy użyciu aparatu cobas x 480. Próbki wcześniej pobrane na podłoże płynne, poddawane są trawieniu w warunkach denaturujących w podwyższonej temperaturze, a następnie ulegają lizie za pośrednictwem odczynnika chaotropowego. Uwolnione kwasy nukleinowe wirusa oraz DNA β -globiny zostają oczyszczone poprzez absorpcję do magnetycznych cząstek szkła. Jednoczesne, analogiczne reakcje, którym ulega w teście ludzki gen β -globiny zapewniają kontrolę całego procesu. Dodatni wynik dla β -globiny w próbce badanej potwierdza obecność materiału ludzkiego⁹⁷.

Amplifikacja PCR docelowych sekwencji kwasu nukleinowego zachodzi przy wykorzystywaniu komplementarnych par primerów dla DNA 14 typów HPV

oraz dla DNA β -globiny. Proces odbywa się w analizatorze cobas z 480. Swoiste pary primerów zawarte są w odczynniku Master Mix. Mieszanina, w której zachodzi reakcja docelowa, po podgrzaniu do temperatury 95°C umożliwia aktywację polimerazy DNA, denaturację DNA wirusa i DNA genomu oraz odsłonięcie regionów docelowych dla starterów. Po obniżeniu temperatury do 55°C dochodzi do połączenia primerów z sekwencjami docelowymi DNA. Następnie temperatura reakcji zostaje podniesiona do 72°C, polimeraza DNA syntetyzuje nić komplementarną do matrycy, dzięki czemu powstaje dwuniciowa kopia DNA sekwencji docelowej genomu HPV i genu β -globiny. Cykl powtarzany jest wielokrotnie, każdorazowo podwajając pożądany łańcuch DNA^{97,98}.

Detekcja produktów amplifikacji zachodzi w czasie rzeczywistym przy użyciu oznaczonych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych. Cztery różne reakcje barwne umożliwiają wykrycie niezależnego sygnału pochodzącego od HPV 16, HPV 18, pozostałych 12 typów HPV HR łącznie oraz od β -globiny⁹⁷.

4.3. Test metylacyjny

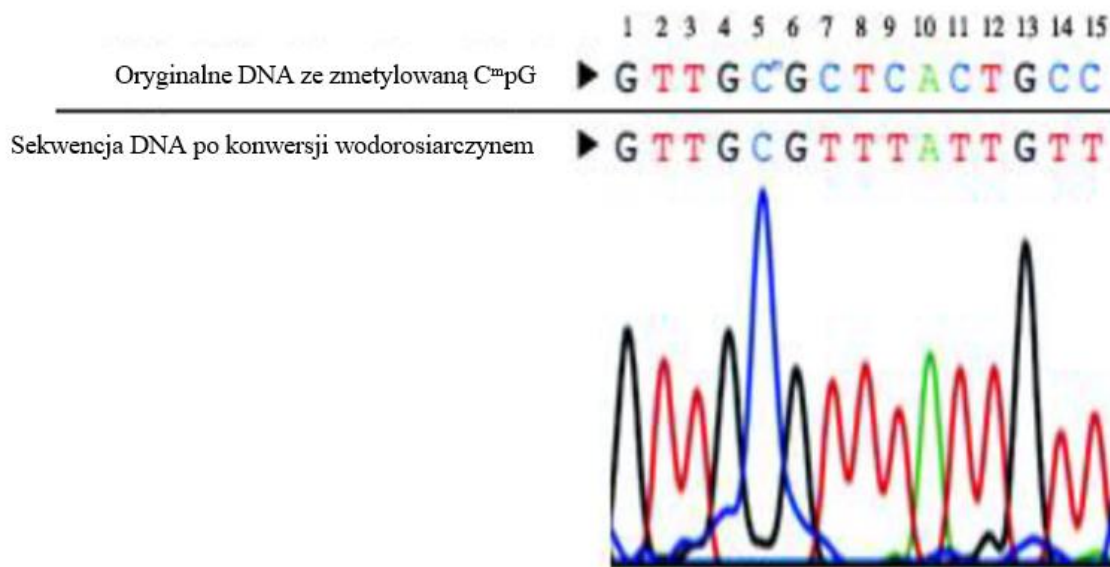
Do czasu wykonania testu metylacyjnego, próbki pobrane analogicznie jak w identyfikacji DNA HPV, na podłoże płynne - Roche Cell Collection Medium, przechowywano w zamrażarce w temperaturze od -30 do -20°C. Proces umożliwiający detekcję hipermetylacji promotorów genów FAM19A4 i mir124-2 składa się z kilku etapów:

- 1) Izolacja DNA,
- 2) Oznaczenie stężenia DNA,
- 3) Wydzielenie właściwej porcji eluatu DNA,
- 4) Konwersja DNA wodorosiarczynem,
- 5) Wykonanie testu QIASure,
- 6) Interpretacja wyników.

Pierwszym etapem jest wyizolowanie genomowego DNA z materiału klinicznego. Procedurę wykonywano przy zastosowaniu zestawu opartego na kolumnach - QIAamp DNA Micro Kit. Następnie przygotowywano odczynniki – CT Conversion Reagent (światłowrażliwy) oraz M-Wash Buffer. Dokonywano

pomiaru stężenia DNA w poszczególnych próbkach. Próbkę do PCR o objętości 50 µl inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut, a po dodaniu CT Conversion Reagent inkubowano w termocyklerze o temperaturze 50°C przez 12-16 godzin, po czym ponownie ochładzano do temperatury 0-4°C.

Optymalna porcja eluatu DNA potrzebna do konwersji wodorosiarczynem wynosi między 100 ng a 2 µg, 200 ng jest ilością najbardziej zalecaną. Konwersję wodorosiarczynem przeprowadzano przy pomocy zestawu EZ DNA Methylation™ Kit firmy Zymo Research, który oparty jest na reakcji między wodorosiarczynem sodu a cytozyną. Reakcja polega na przekonwertowaniu niezmetylowanych cytozyn do uracylu, natomiast zmetylowane cytozyny pozostają w stanie niezmienionym. Rycina 6 przedstawia wyniki sekwencjonowania dwuniciowego DNA po konwersji wodorosiarczynem. Przekonwertowane DNA po reakcji z wodorosiarczynem jest gotowe do amplifikacji PCR i dalszych procesów. Może być użyte natychmiast lub przechowywane w temperaturze poniżej -20°C. Zalecaną porcją eluowanego DNA do reakcji PCR jest objętość 1-4 µl⁹⁹.



Rycina 6. Konwersja wodorosiarczynem matrycy DNA. Zmetylowana cytozyna w pozycji 5' utrzymana w stanie niezmienionym, pozostałe niezmetylowane cytozyny przekształcone do uracylu⁹⁹.

QIASure Methylation Test firmy QIAGEN jest multipleksowym testem PCR przeprowadzanym w czasie rzeczywistym, przeznaczonym do diagnostyki in vitro. Umożliwia amplifikację metylowanych regionów promotorów genów supresorowych – FAM19A4 i mir124-2 oraz genu ACTB pełniącego rolę kontroli jakości procesu¹⁰⁰.

Aby wykonać test QIASure, 17,5 µl gotowego preparatu QIASure Master Mix umieszczano w rurkach do PCR, następnie dodawano 2,5 µl wody, 2,5 µl kalibratora – QIASure Calibrator i 2,5 µl DNA po konwersji wodorosiarczynem. Mieszanina Master Mix umożliwia proces amplifikacji DNA, posiada primery i sondy dla docelowych genów i genu ACTB. QIASure Calibrator składa się z sekwencji amplikonów trzech genów: FAM19A4, mir124-2 oraz ACTB. Procedura PCR wykonywana była w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM rozgrzanym do temperatury 95°C¹⁰⁰.

Analiza wyników i interpretacja danych przeprowadzana była w pełni automatycznie za pomocą oprogramowania Rotor-Gene AssayManager v1.0. Liczba cykli PCR koniecznych do detekcji sygnału fluorescencyjnego określana jest jako wartość C_T, odpowiada liczbie docelowych cząstek w próbce. W trakcie interpretacji wyników oznaczana jest względna wartość ilościowa (ΔC_T) metylacji promotora genów FAM19A4 i mir124-2. Wartość ΔC_T stanowi różnicę między wartością C_T genu docelowego FAM19A4 lub mir124-2 a wartością C_T genu ACTB. Dla normalizacji wyników określana jest wartość $\Delta\Delta C_T$, będąca różnicą między wartością ΔC_T kalibratora a wartością ΔC_T genów docelowych FAM19A4 lub mir124-2. Próbkę oceniano jako pozytywną pod względem hipermetylacji (Hypermethylation positive), jeśli wartość $\Delta\Delta C_T$ dla co najmniej jednego z genów - FAM19A4 lub mir124-2 znalazła się poniżej punktu odcięcia¹⁰⁰.

4.4. Kolposkopia

Diagnostyka kolposkopowa w PPSM GPSK UM w Poznaniu przeprowadzana jest zgodnie z aktualnymi rekomendacjami PTKiPSM oraz PTGiP i obejmuje trzy główne etapy:

- 1) Ocena kolposkopowa sromu, pochwy, tarczy szyjki macicy z podziałem na kwadranty oraz okolicy okołodbytniczej,
- 2) Pobranie biopsji z miejsc podejrzanych do badań histopatologicznych (ewentualnie wykonanie biopsji losowej ze strefy przekształceń między nabłonkiem wielowarstwowym płaskim a gruczołowym),
- 3) Pobranie materiału z kanału szyjki macicy.

W pierwszej kolejności oceniano makroskopowo srom, ściany pochwy i okolice okołodbytniczą. Następnie dokonywano kwalifikacji adekwatności kolposkopii, czyli możliwości postawienia pełnego rozpoznania kolposkopowego. Po uwidocznieniu szyjki, przemywano jej powierzchnię 0,9% roztworem NaCl w celu oczyszczenia ze śluzu i ponownie dokonywano analizy kolposkopowej w powiększeniu 4-15-krotnym. Przy użyciu filtru zielonego oceniano podnabłonkowe łożysko naczyniowe.

W następnej kolejności wykonywano próbę z 3-5% wodnym roztworem kwasu octowego, który aplikowano na powierzchnię tarczy szyjki macicy. Niskie pH roztworu powoduje denaturację obecnych w nabłonku cytokeratyn, doprowadzając do obrzęku i zbielenia jego powierzchni. Intensywność zbielenia oraz czas trwania reakcji nasila się wraz z zaawansowaniem neoplazji. Szyjkę i ściany pochwy oceniano po 1 i po 3 minutach od aplikacji kwasu octowego.

Ostatnim etapem było przeprowadzenie próby Schillera, polegającej na przemyciu tarczy szyjki macicy roztworem jodu w jodku potasu (płynem Lugola). Reakcja daje wynik jodopozytywny powodując wybarwienie prawidłowego nabłonka bogatego w glikogen na kolor ciemnobrązowy. Nabłonek neoplastyczny lub zmieniony nowotworowo charakteryzuje obniżona zawartość glikogenu, przez co nie ulega on wybarwieniu i pozostaje w kolorze żółtym. Wynik taki klasyfikowany jest jako jodonegatywny.

Diagnostykę kolposkopową wykonywano przy zastosowaniu kolposkopu stereoskopowego OCS 500 marki OLYMPUS, wyposażonego w cyfrowy aparat umożliwiający dokumentację fotograficzną. Do automatycznej archiwizacji komputerowej posłużył program IRIS Ginekologia.

Opisów kolkogramów dokonywano według zalecanej ujednoliconej nomenklatury opartej na wytycznych IFCPC z 2011 roku (tabela 3). Ponadto w ramach niniejszej pracy do oceny kolposkopowej wykorzystano ośmiopunktową skalę Reida (Reid Colposcopic Index – RCI). Skala ocenia 4 parametry obserwowanej zmiany - brzeg i kolor zmiany po próbie z kwasem octowym, charakter naczyń krwionośnych oraz reakcję na próbę jodową. Za każdą cechę przyznaje się od 0 do 2 punktów. Suma punktów ułatwia zakwalifikowanie zmian według zaawansowania patologii. Za wynik nieprawidłowy uważa się przyznanie ≥ 3 punktów według RCI (tabela 5)¹⁰¹.

Tabela 5. Skala Reida ^{101,102}.

Cecha kolposkopowa	0 pkt	1 pkt	2 pkt
Margines zmiany – próba z kwasem octowym	Niewyraźne granice zmiany, tzw. „granice geograficzne”. Powierzchnia kłykcinowata i brodawkczakowata. Zmiany satelitarne dobrze odgraniczone od nowego SCJ.	Ostre granice zmiany. Zmiana o regularnych, widocznych kształtach.	Uniesione, zwinięte, złuszczone się granice zmiany. Krawędzie o zróżnicowanym stopniu zbienienia.
Kolor zmiany – próba z kwasem octowym	Delikatne zbienienie. Półprzezroczyste, śnieżnobiałe, szybko ustępujące zbienienie o połyskującej powierzchni.	Pośrednie zbienienie. Świecące zbienienie o szaro-białym odcieniu.	Intensywne zbienienie. Matowe, długo utrzymujące się zbienienie o szarym odcieniu.
Naczynia krwionośne – próba z kwasem octowym	Delikatne punkcikowanie i płaska mozaika.	Zanik naczyń po próbie z kwasem octowym.	Grube punkcikowanie, mozaika, naczynia nieprawidłowe.
Próba jodowa	Reakcja jodopozytywna – kolor ciemnobrązowy. Obszar jodonegatywny o punktacji ≤ 3 pkt oceniających trzy powyższe cechy.	Częściowy wychwyt jodu.	Reakcja jodonegatywna – kolor żółty. Obszar jodonegatywny o punktacji ≥ 4 pkt oceniających trzy powyższe cechy.
Interpretacja wyniku: 0-2 pkt – wynik prawidłowy lub CIN1; 3-4 pkt – CIN1 lub CIN2; 5-8 pkt CIN2 lub CIN3			

4.5. Biopsja szyjki macicy

Każdej pacjentce, po dokładnej ocenie kolposkopowej szyjki macicy z podziałem na kwadranty, pobierano biopsję celowaną z miejsc podejrzanych. W przypadku niewidocznienia nieprawidłowości wykonywano biopsję losową z nowej granicy międzynabłonkowej. Biopsjaty pobierano kleszczykami o szerokości cięcia 2 mm. Ponadto, wszystkie pacjentki miały wykonywane diagnostyczne łyżeczkowanie kanału szyjki macicy przy użyciu łyżki ginekologicznej.

Materiał tkankowy utrwalano w 4% zbuforowanym wodnym roztworze formaldehydu (10% roztworze formaliny). Następnie materiał poddawano procesowi odwadniania w stężonych roztworach alkoholu przy pomocy urządzenia HistoCore PEARL firmy Leica Biosystems. Kolejno, fragmenty tkankowe zatapiano w bloczkach parafinowych w sposób częściowo zautomatyzowany z wykorzystaniem modułowego centrum do zatapiania tkanek HistoCore Arcadia H+C+EGF (Leica Biosystems). Uformowane bloczki przechowywano w urządzeniu chłodzącym, aż do momentu krojenia. Bloczki przy pomocy mikrotomów marki Leica Biosystems krojono na kilkumikrometrowe skrawki parafinowe, które rozprostowywano w łaźni wodnej Leica HI1210 i umieszczano na szkiełkach podstawowych. Skrawki tkankowe następnie poddawano procesowi odparafinowania i nawodnienia. Tak przygotowane preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (H+E) w sposób automatyczny w urządzeniu Leica ST5010 połączonym z nakrywką Leica CV5030. Preparaty przekazywano do oceny mikroskopowej lekarzowi patologowi. Przygotowanie preparatów histologicznych oraz analiza patomorfologiczna przeprowadzane były w Pracowni Patomorfologicznej GPSK UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

4.6. Metody statystyczne

Analiza wartości diagnostycznych testu metylacyjnego oraz porównywanych metod skriningowych została dokonana przy pomocy pakietu statystycznego PQStat Software 1.8.2.

Zastosowane metody diagnostyczne scharakteryzowano i porównano przy użyciu parametrów wyliczonych na podstawie tabeli kontyngencji (tabela 6) zawierającej dane o liczności przypadków zdiagnozowanych badanym testem

- prawdziwie: pozytywnych (true positive – TP) i negatywnych (true negative – TN) oraz fałszywie: pozytywnych (false positive – FP) i negatywnych (false negative – FN).

Tabela 6. Tabela kontyngencji 2x2 użyta do przeprowadzenia obliczeń statystycznych.

Liczności obserwowane		rzeczywistość (metoda referencyjna)		
		choroba (+)	brak choroby (-)	suma
test diagnostyczny	wynik pozytywny (+)	<i>TP</i>	<i>FP</i>	<i>TP+FP</i>
	wynik negatywny (-)	<i>FN</i>	<i>TN</i>	<i>FN+TN</i>
	suma	<i>TP+FN</i>	<i>FP+TN</i>	<i>TP+TN+FP+FN</i>

W celu scharakteryzowania testu metylacyjnego oraz pozostałych metod skriningowych użyto następujących parametrów statystycznych:

- Czułość – zdolność testu do wykrywania pacjentek rzeczywiście chorych, wyliczana ze wzoru:

$$\text{czułość} = \frac{TP}{TP + FN}$$

- Swoistość – zdolność testu do wykrywania pacjentek rzeczywiście zdrowych, wyliczana ze wzoru:

$$\text{swoistość} = \frac{TN}{FP + TN}$$

- Pozytywna wartość predykcyjna (PPV) – prawdopodobieństwo, że pacjentka jest chora mając pozytywny wynik testu, wyliczana ze wzoru:

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

- Negatywna wartość predykcyjna (NPV) – prawdopodobieństwo, że pacjentka jest zdrowa mając negatywny wynik testu, wyliczana ze wzoru:

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

- Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (positive likelihood ratio - PLR) – iloraz szansy na otrzymanie pozytywnego wyniku przez pacjentkę rzeczywiście

chorą do szansy, że pozytywny wynik otrzymałaby pacjentka zdrowa. Parametr wyliczany ze wzoru:

$$PLR = \frac{\text{czułość}}{1 - \text{swoistość}} = \frac{TP(TP + FN)}{FP(FP + TN)}$$

- Iloraz wiarygodności wyniku ujemnego (negative likelihood ratio - NLR) – iloraz szansy na otrzymanie negatywnego wyniku przez pacjentkę rzeczywiście chorą do szansy, że negatywny wynik otrzymałaby pacjentka zdrowa. Parametr wyliczany ze wzoru:

$$NLR = \frac{1 - \text{czułość}}{\text{swoistość}} = \frac{FN(TP + FN)}{TN(FP + TN)}$$

- Dokładność testu (accuracy - ACC) – prawdopodobieństwo postawionej diagnozy bez względu na wynik (pozytywny lub negatywny), wyliczana ze wzoru:

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

Dla wyznaczanych parametrów 95% przedział ufności (confidence interval – CI) budowany był zgodnie z metodą Cloppera-Pearsona dla pojedynczej proporcji. Dla ilorazu wiarygodności wyniku dodatniego i ujemnego zastosowano metodę wyznaczania przedziału ufności w oparciu o błąd standardowy (standard error of the estimate - SE).

Dla PLR:

$$SE = \sqrt{\frac{1 - \text{czułość}}{TP} + \frac{\text{swoistość}}{FP}}.$$

Dla NLR:

$$SE = \sqrt{\frac{\text{czułość}}{FN} + \frac{1 - \text{swoistość}}{TN}}.$$

Na podstawie zebranych licznosci, do oceny przydatności zastosowanych testów diagnostycznych skonstruowano wykresy krzywych ROC (receiver operating characteristic curve). Za punkt odcięcia przyjęto wartość 1 (stymulanta, skala dychotomiczna 0,1). Jakość testów została opisana za pośrednictwem wielkości pola powierzchni pod krzywą ROC (area under curve – AUC). Jakość klasyfikacji, lepszą niż losowy podział, wyrażało pole powierzchni AUC istotnie statystycznie większe

niż wartość 0,5. Przedział ufności dla AUC został wyliczony w oparciu o metodę DeLong.

Do przeprowadzenia porównania testu metylacyjnego z pozostałymi strategiami diagnostycznymi zastosowano model zależny. Porównywano krzywe ROC zbudowane na tych samych pacjentkach. Postać statystyki testowej wyrażona została wzorem:

$$Z = \frac{|AUC_1 - AUC_2|}{SE_{AUC_1 - AUC_2}},$$

gdzie: AUC_1 , AUC_2 i SE różnicy pól wyliczone zostały na podstawie metody nieparametrycznej DeLong.

Testy rozkładu cech χ^2 Pearsona i test dla trendu Cochran-Armitage zastosowano do analizy istotności statystycznej różnic rozkładu dodatniego wyniku testu metylacyjnego w grupach pacjentek scharakteryzowanych stopniem zaawansowania zmian histopatologicznych. Analizowano wzajemny rozkład cechy pomiędzy grupami: $\leq$ CIN1, CIN2, CIN3, rak szyjki macicy oraz weryfikowano hipotezę o zależności zaawansowania zmian i natężenia odsetka dodatniej metylacji.

Testy analizujące rozkład dodatniej metylacji: test dokładny Fishera i χ^2 Pearsona zastosowano także do oceny istotności statystycznej różnic w rozkładzie metylacji pośród pacjentek, u których zidentyfikowano poszczególne typy HPV.

Iloraz szans (odds ratio - OR) na wystąpienie stanów wyróżnionych: CIN2, CIN3, $\geq$ CIN3 na podstawie oceny wystąpienia dodatniej metylacji został wyliczony w oparciu o model regresji logistycznej. Analiza modelu regresji logistycznej została także wykorzystana do oceny szansy wystąpienia dodatniej metylacji w zależności od wieku pacjentki.

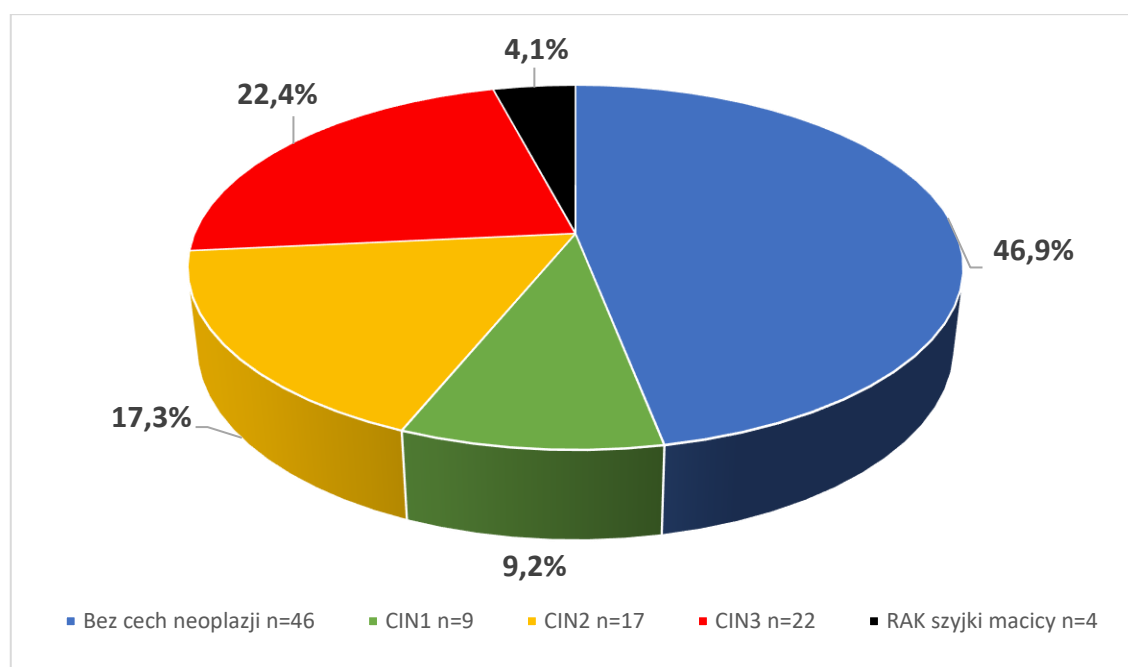
We wszystkich zastosowanych testach za poziom istotny statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

5. Wyniki

5.1. Wyniki - charakterystyka populacji

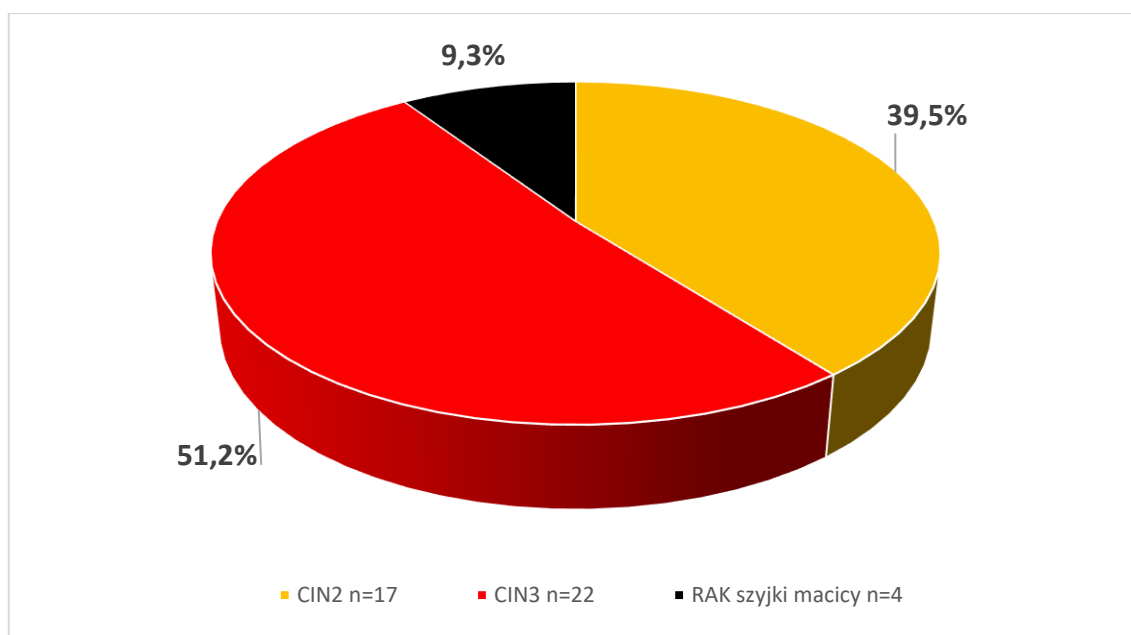
Wśród pacjentek włączonych do badania (n=98) wyodrębniono 53,1% (52/98) kobiet z cechami neoplazji szyjki macicy. Wyniki uporządkowano według poszczególnych rozpoznań histopatologicznych (wykres 4) na:

- 46 pacjentek bez cech neoplazji szyjki macicy (46,9%),
- 9 pacjentek ze zmianą CIN1 (9,2%),
- 17 pacjentek ze zmianą CIN2 (17,3%),
- 22 pacjentki ze zmianą CIN3 (22,4%),
- 4 pacjentki z rakiem szyjki macicy (4,1%).



Wykres 4. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych w całej populacji pacjentek włączonych do badania (n=98).

Do grupy badanej włączono pacjentki z potwierdzoną neoplazją szyjki macicy $\geq$ CIN2 (CIN2, CIN3, rak szyjki macicy). Wśród pacjentek z rakiem szyjki macicy wyodrębniono: 1 rak płaskonabłonkowy, 2 raki gruczołowe i 1 rak neuroendokrynnny. Odsetek grupy badanej wyniósł 43,9% (43/98), w której najczęstszym rozpoznaniem histopatologicznym była śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy dużego stopnia – CIN3 (22/43 – 51,2%) (wykres 5). Grupę kontrolną stanowiło 55 pacjentek ze zmianami $\leq$ CIN1 (bez cech neoplazji szyjki macicy, CIN1).



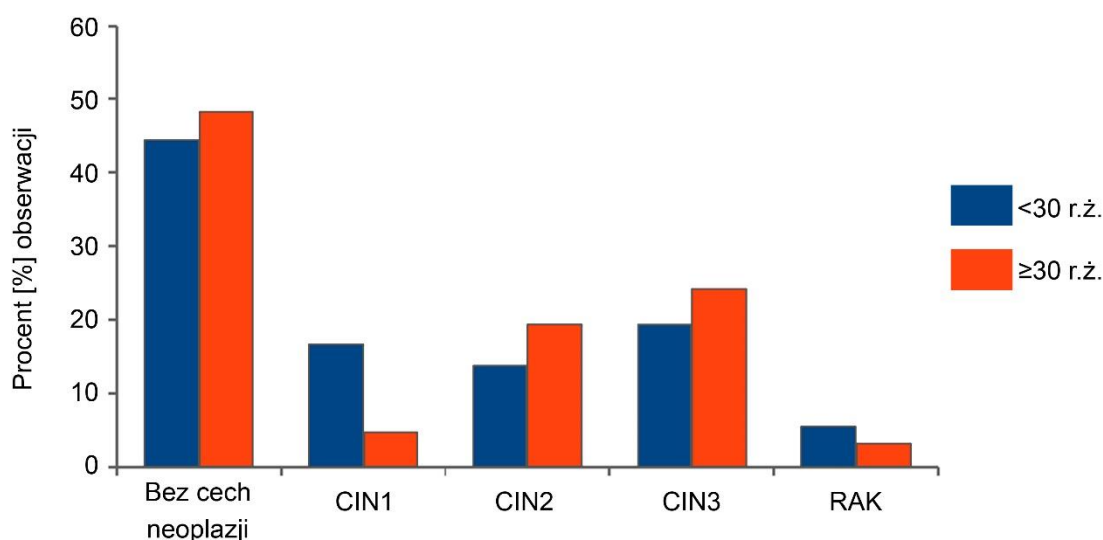
Wykres 5. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych w grupie badanej $\geq$ CIN2 (n=43).

Średnia wieku wszystkich kobiet włączonych do badania została obliczona na 35 lat. Wiek minimalny wyniósł 18 lat, maksymalny 69 lat, mediana 32 lata. Pacjentki w całej populacji ujętej w badaniu zostały podzielone na 2 grupy wiekowe – poniżej 30 r.ż. (n=36; 36,7%) i powyżej 30 r.ż. (n=62; 63,3%).

Najczęstszym rozpoznaniem o charakterze śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy w obu grupach wiekowych była zmiana CIN3. W grupie pacjentek <30 r.ż. zdiagnozowano 1 przypadek raka gruczołowego i 1 raka neuroendokrynnego, a w grupie pacjentek $\geq$ 30 r.ż. stwierdzono 1 przypadek raka gruczołowego i 1 raka płaskonabłonkowego. U pacjentek powyżej 30 r.ż. zauważono stopniowy wzrost udziału procentowego rozpoznań o wyższym zaawansowaniu neoplazji szyjki macicy w stosunku do młodszych pacjentek (tabela 7 i wykres 6).

Tabela 7. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych w całej populacji pacjentek włączonych do badania (n=98) z podziałem na 2 grupy wiekowe <30 r.ż. i $\geq$ 30 r.ż.

Grupa wiekowa	Bez cech neoplazji		CIN1		CIN2		CIN3		RAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<30 r.ż.	16	44,4	6	16,7	5	13,9	7	19,4	2	5,6
$\geq$ 30 r.ż.	30	48,4	3	4,8	12	19,4	15	24,2	2	3,2



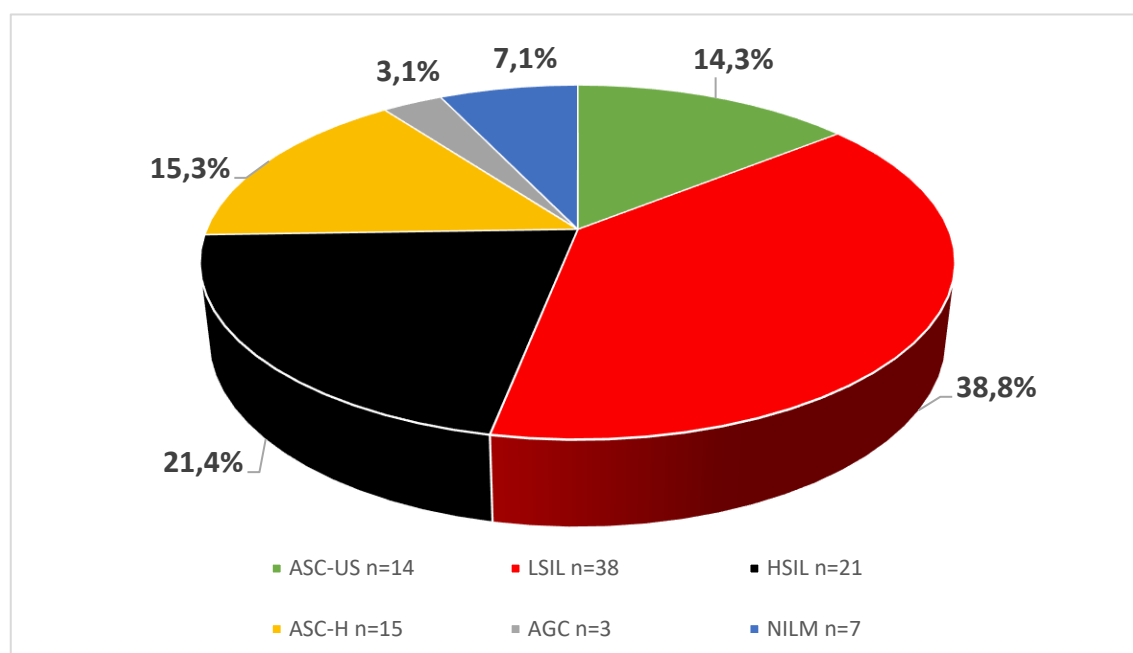
Wykres 6. Rozkład procentowy rozpoznaw histopatologicznych w grupie pacjentek <30 r.ż. i ≥30 r.ż.

W całej populacji kobiet włączonych do badania pozytywny wynik testu molekularnego na DNA 14 typów onkogennych HPV stwierdzono w 75,5% przypadków (n=74), a negatywny w 24,5% (n=24). Najczęściej identyfikowanym typem wirusa był HPV 16 (29/98) - 29,6%. W grupie badanej ≥CIN2 (n=43), zakażenie HPV 16 miało 51,2% kobiet (22/43). W grupie pacjentek z rozpoznaniem CIN3, HPV 16 wyizolowano w 63,6% przypadków (14/22). Zarówno u kobiet z CIN3, jak i z rakiem szyjki macicy nie zaobserwowano przypadku ujemnego wyniku na DNA HPV (tabela 8).

Tabela 8. Udział procentowy różnych wariantów wyników testu na DNA HPV wśród pacjentek z poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi w całej populacji włączonej do badania (n=98).

Wynik testu HPV DNA	Bez cech neoplazji n=46		CIN1 n=9		CIN2 n=17		CIN3 n=22		RAK n=4		Ogółem n=98	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HPV 16	7	15,2	0	0	6	35,3	14	63,6	2	50	29	29,6
HPV HR	13	28,3	4	44,4	5	29,4	2	9,1	0	0	24	24,5
HPV 18	0	0	0	0	1	5,9	0	0	1	25	2	2
HPV 16 i HR	6	13	1	11,1	3	17,6	5	22,7	0	0	15	15,3
HPV 18 i HR	2	4,3	0	0	0	0	1	4,5	1	25	4	4,1
HPV Ujemny	18	39,1	4	44,4	2	11,8	0	0	0	0	24	24,5

Odsetek nieprawidłowych wyników badania cytologicznego (ASC-US+) w całej populacji włączonej do badania wyniósł 92,9% (91/98). Najczęstszym rozpoznaniem cytologicznym wśród wszystkich pacjentek była zmiana LSIL, co stanowiło 38,8% całej populacji (38/98) (wykres 7 i tabela 9). W grupie badanej $\geq$ CIN2 (n=43), nieprawidłowe rozpoznanie cytologiczne miało 95,3% kobiet (41/43), a najczęstszym wynikiem w tej grupie była zmiana HSIL – 37,2% (16/43).



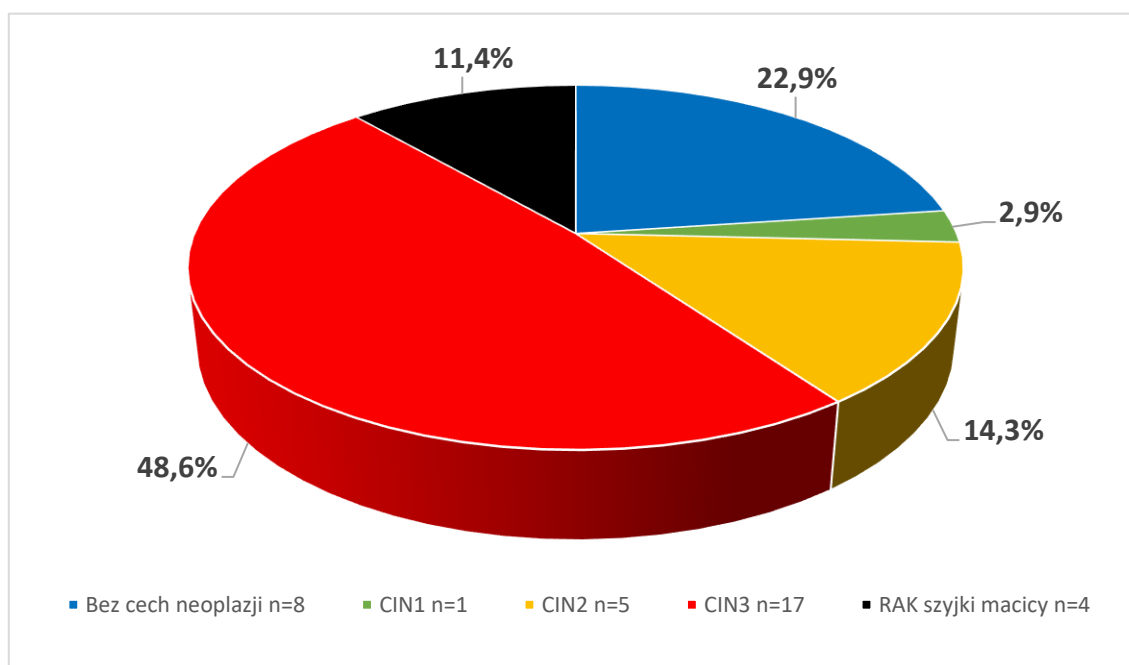
Wykres 7. Rozkład procentowy wyników cytologicznych w całej populacji włączonej do badania (n=98).

Tabela 9. Udział procentowy wyników cytologicznych wśród pacjentek z poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi w całej populacji włączonej do badania (n=98).

Rozpoznanie cytologiczne	Bez cech neoplazji n=46		CIN1 n=9		CIN2 n=17		CIN3 n=22		RAK n=4		Ogółem n=98	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ASC-US	12	26,1	1	11,1	0	0	1	4,5	0	0	14	14,3
LSIL	19	41,3	5	55,6	9	52,9	5	22,7	0	0	38	38,8
HSIL	5	10,9	0	0	6	35,3	9	40,9	1	25	21	21,4
ASC-H	7	15,2	0	0	2	11,8	6	27,3	0	0	15	15,3
AGC	0	0	1	11,1	0	0	0	0,0	2	50	3	3,1
NILM	3	6,5	2	22,2	0	0	1	4,5	1	25	7	7,1

W całej populacji pacjentek włączonych do badania, odsetek dodatnich wyników testu metylacyjnego QIASure dla genów supresorowych FAM19A4/mir124-2 wyniósł 35,7% (35/98). Spośród pozytywnych wyników metylacji, 60% (21/35) stanowiły dodatnie analizy genu FAM19A4, a 40% (14/35) zarówno genu FAM19A4, jak i mir124-2. W całej populacji nie wykazano dodatniego wyniku dla pojedynczego genu mir124-2.

Spośród wszystkich pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego (n=35), najczęstszym rozpoznaniem histopatologicznym była śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy dużego stopnia CIN3, której odsetek wyniósł 48,6% (17/35) (wykres 8).



Wykres 8. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych wśród pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego (n=35).

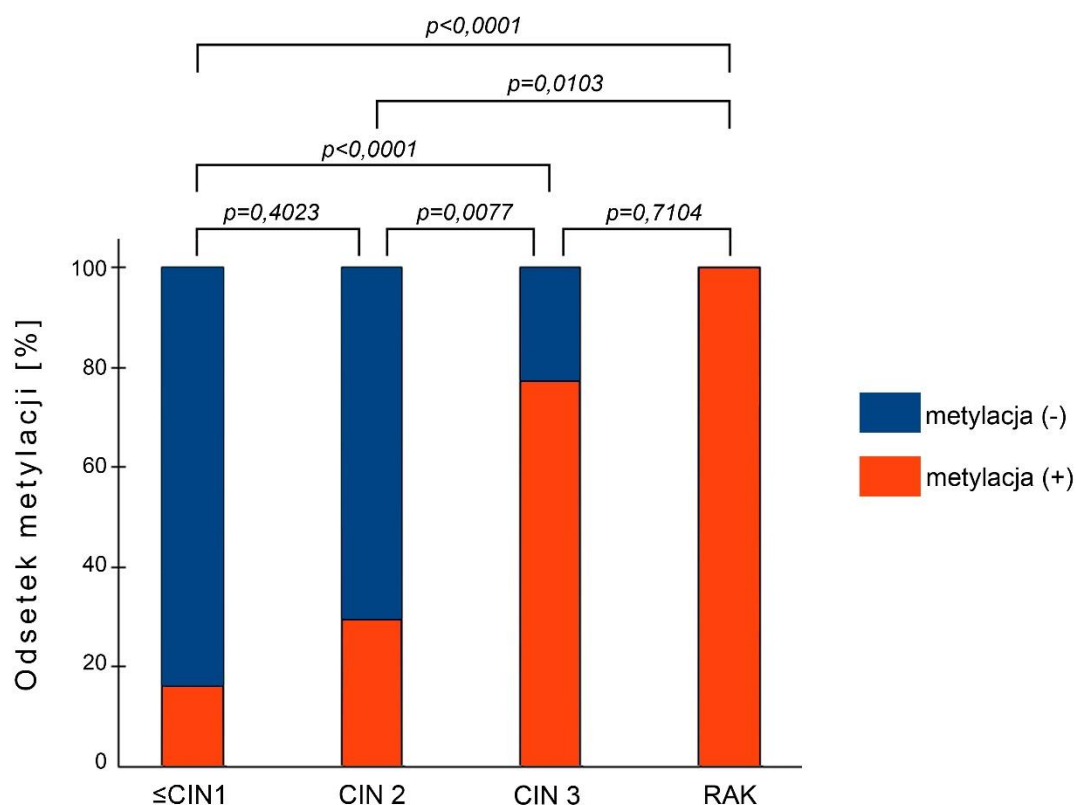
5.2. Wyniki - ocena testu metylacyjnego

Odsetek dodatnich wyników testu metylacyjnego wśród pacjentek ze zmianą $\leq$ CIN1 (bez cech neoplazji, CIN1) wyniósł 16,4% (9/55). Wykazano wzrost rosnącej liczby dodatnich wyników testu metylacyjnego wraz zaawansowaniem zmian histopatologicznych. Dla zmian CIN2 odsetek pozytywnych metylacji wyniósł 29,4% (5/17), dla zmian CIN3 77,3% (17/22), a dla raka szyjki macicy 100% (4/4) (tabela 10). Test QIASure wykrył wszystkie 4 raki szyjki macicy, w tym 1 rak płaskonabłonkowy, 2 raki gruczołowe i 1 rak neuroendokrynnny.

Tabela 10. Udział procentowy dodatnich i ujemnych wyników testu metylacyjnego wśród poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w całej populacji włączonej do badania (n=98).

Wynik testu metylacyjnego	$\leq$ CIN1 n=55		CIN2 n=17		CIN3 n=22		RAK n=4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Dodatni	9	16,4	5	29,4	17	77,3	4	100
Ujemny	46	83,6	12	70,6	5	22,7	0	0

Przy użyciu testu χ^2 dla trendu, wykazano istotny statystycznie ($p < 0,000001$) wzrost obserwowanych przypadków wystąpienia dodatniej metylacji wraz z zaawansowaniem stwierdzonego stanu histologicznego (poziom istotności $\alpha = 0,05$). Poddano analizie różnice w rozkładzie dodatnich wyników testu metylacyjnego pomiędzy poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi. Istotną statystycznie ($p < 0,05$) różnicę wykazano między rozpoznaniem $\leq$ CIN1 a CIN3 i między $\leq$ CIN1 a rakiem szyjki macicy oraz między CIN2 a CIN3 i między CIN2 a rakiem szyjki macicy (wykres 9).



p - różnice w rozkładzie dodatnich wyników testu metylacyjnego pomiędzy poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi

Wykres 9. Wykazanie wzrostu obserwowanych przypadków wystąpienia dodatniej metylacji w zależności od stwierdzonego stanu histologicznego.

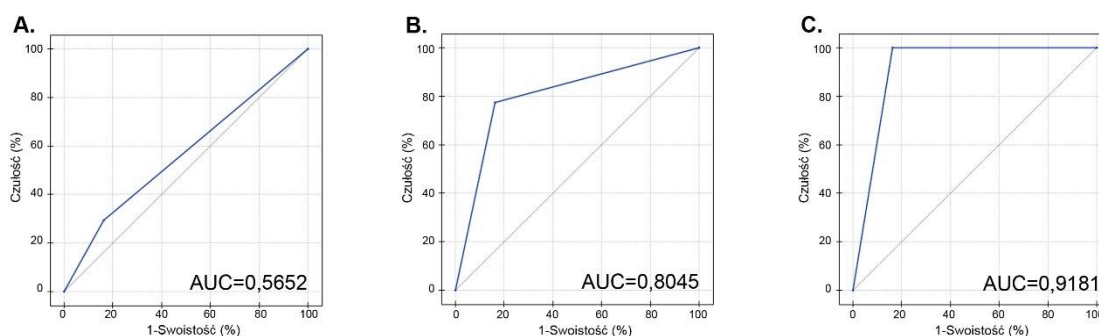
Czułość metody metylacyjnej wzrastała wraz z zaawansowaniem rozpoznania histopatologicznego i dla wykrycia zmian CIN2 została obliczona na 29,4%, dla zmian CIN3 na 77,3%, a dla raka szyjki macicy wyniosła 100%. Swoistość testu dla wszystkich rozpoznań z osobna osiągnęła taki sam wynik – 83,6%. Najwyższą wartość PPV oszacowano dla zmian CIN3 – 65,4%. Negatywna wartość predykcyjna równa 100% dotyczyła rozpoznania raka szyjki macicy. Niewiele mniejszy wynik NPV uzyskano dla zmian CIN3 – 90,2% (tabela 11).

Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (PLR) dla zmian CIN3 i dla raka szyjki macicy wyniósł odpowiednio 4,72 i 6,11. Wartość ilorazu wiarygodności wyniku ujemnego (NLR) metody QIASure dla rozpoznań CIN2 i CIN3 była nieznaczna ($\leq 0,84$). Dla raka szyjki macicy nie zbudowano ilorazu NLR, gdyż czułość metylacji dla raka równa 100% przy zerowej ilości wyników fałszywie ujemnych świadczy o tym, że każda pacjentka z rakiem otrzymała wynik prawdziwie pozytywny. Najlepsza dokładność testu (ACC) dotyczyła raka szyjki macicy – 84,7% (tabela 11).

Tabela 11. Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla wykrycia osobno zmian CIN2, CIN3 i raka szyjki macicy.

Rozpoznanie hist-pat.	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	PLR (95% CI)	NLR (95% CI)	ACC [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
CIN2	29,4 (10,3-56,0)	83,6 (71,2-92,2)	35,7 (12,8-64,9)	79,3 (66,6-88,8)	1,80 (0,70-4,64)	0,84 (0,61-1,17)	70,8 (58,9-81,0)	0,57 (0,44-0,69)	0,4186
CIN3	77,3 (54,6-92,2)	83,6 (71,2-92,2)	65,4 (44,3-82,8)	90,2 (78,6-96,7)	4,72 (2,49-8,95)	0,27 (0,13-0,59)	81,8 (71,4-89,7)	0,80 (0,70-0,91)	<0,0001
RAK	100 (39,8-100)	83,6 (71,2-92,2)	30,8 (9,1-6,14)	100 (92,3-100)	6,11 (3,36-11,11)	0	84,7 (73,0-92,8)	0,92 (0,87-0,97)	0,0055

Dla analizy przydatności testu QIASure w wykrywaniu osobno zmian CIN2, CIN3 i raka szyjki macicy wykreślono wykresy krzywych ROC. Pole powierzchni pod krzywą ROC (AUC) dla rozpoznania CIN3 zostało obliczone na 0,80 ($p<0,0001$), a dla raka szyjki macicy na 0,92 ($p=0,0055$), co świadczy o dużej mocy diagnostycznej testu w wykrywaniu zaawansowanej patologii szyjki macicy (wykres 10).



Wykres 10. Wykres krzywych ROC dla testu metylacyjnego zastosowanego w celu wykrycia: A. osobno przypadków CIN2, B. osobno przypadków CIN3, C. osobno przypadków raka szyjki macicy.

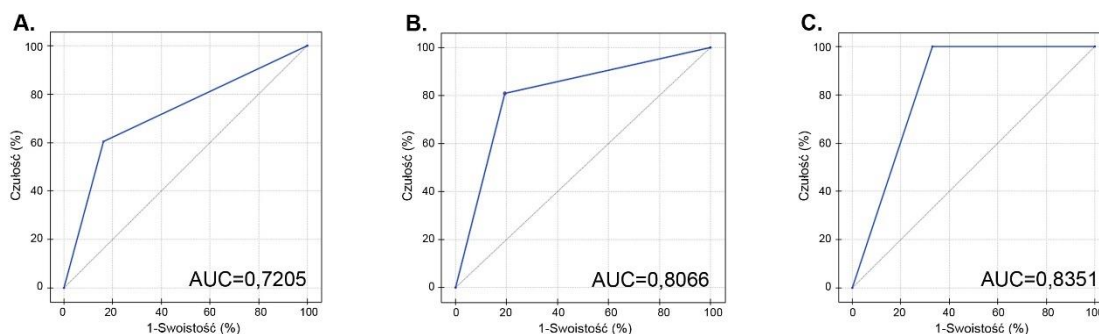
Dla zmian $\geq$ CIN2 (CIN2, CIN3 i rak szyjki macicy) czułość metody metylacyjnej została oszacowana na 60,5%, dla wspólnych rozpoznań $\geq$ CIN3 (CIN3 i rak szyjki macicy) na 80,8%, a dla raka szyjki macicy wyniosła 100%. Z uwagi na niski odsetek wyników fałszywie dodatnich testu QIASure – w przypadku $\geq$ CIN2 – 9,2% (9/98), w przypadku $\geq$ CIN3 – 14,3% (14/98), swoistość metody osiągnęła dla zmian $\geq$ CIN2 aż 83,6%, a dla $\geq$ CIN3 80,6%. Pacjentki z pozytywnym wynikiem metylacji mogły być w 74,3% (wartość PPV) pewne, że mają zmianę $\geq$ CIN2. Test QIASure cechował się wysoką wartością NPV – dla zmian $\geq$ CIN3 – 92,1%, a dla raka szyjki macicy 100%. Szansa na otrzymanie dodatniego wyniku metylacji

przez pacjentkę rzeczywiście posiadającą zmianę $\geq$ CIN3 była 4,15 razy większa (parametr PLR) niż szansa, że pozytywny wynik otrzymałaby pacjentka ze zmianą $\leq$ CIN2. Najlepszą dokładność (ACC) testu FAM19A4/mir124-2 obliczono dla rozpoznań $\geq$ CIN3 – 80,6% (tabela 12).

Tabela 12. Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla wykrycia zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy.

Rozpoznanie hist-pat.	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	PLR (95% CI)	NLR (95% CI)	ACC [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
$\geq$ CIN2	60,5 (44,4-75,0)	83,6 (71,2-92,2)	74,3 (56,7-87,5)	73 (60,3-83,4)	3,7 (1,94-7,04)	0,47 (0,32-0,70)	73,5 (63,6-81,9)	0,72 (0,63-0,81)	0,0002
$\geq$ CIN3	80,8 (60,6-93,4)	80,6 (69,5-88,9)	60 (42,1-76,1)	92,1 (82,4-97,4)	4,15 (2,50-6,89)	0,24 (0,11-0,53)	80,6 (71,4-87,9)	0,81 (0,72-0,90)	<0,0001
RAK	100 (39,8-100)	67 (56,6-76,4)	11,4 (3,2-26,7)	100 (94,3-100)	3,03 (2,27-4,05)	0	68,4 (58,2-77,4)	0,84 (0,79-0,88)	0,0237

Wielkość pola pod krzywą ROC (AUC) dla zmian $\geq$ CIN2 wyniosła 0,72 ($p=0,0002$), dla zmian $\geq$ CIN3 0,81 ($p<0,0001$), a dla raka szyjki macicy 0,84 ($p=0,0237$) (wykres 11).



Wykres 11. Wykres krzywych ROC dla testu metylacyjnego zastosowanego w celu wykrycia A. zmian $\geq$ CIN2, B. zmian $\geq$ CIN3, C. raka szyjki macicy.

Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy zostały osobno policzone dla dwóch grup wiekowych <30 r.ż. i ≥ 30 r.ż. Dla zmian $\geq$ CIN2 i $\geq$ CIN3 czułość i swoistość metody QIASure była wyższa w młodszej grupie wiekowej. Dla rozpoznań $\geq$ CIN2 czułość i specyficzność wyniosły odpowiednio 64,3% i 90,9%, a dla $\geq$ CIN3 obie oszacowano na 88,9%. Wszystkie przypadki raka szyjki macicy zostały wykryte w obu grupach wiekowych

(<30 r.ż. - 1 rak gruczołowy i 1 rak neuroendokryny, ≥ 30 r.ż. - 1 rak gruczołowy i 1 rak płaskonabłonkowy). Najwyższą wartość PPV osiągnięto dla rozpoznania $\geq \text{CIN}2$ u pacjentek poniżej 30 r.ż. - 81,8%, a najwyższą wartość NPV obliczono dla raka szyjki macicy w obu grupach wiekowych - 100%. Wysoką negatywną wartość predykcijną obliczono również dla zmian $\geq \text{CIN}3$ wśród kobiet <30 r.ż. (96%). Posługując się analizą pola pod krzywą ROC (AUC), najlepszą przydatność testu wynoszącą 0,89 ($p=0,0006$) oceniono również dla zmian co najmniej $\text{CIN}3$ u pacjentek <30 r.ż. (tabela 13).

Nie wykazano istotnego statystycznie związku pomiędzy wiekiem pacjentek a częstością obserwowanych pozytywnych wyników testu metylacyjnego. Obliczeń dokonano przy pomocy analizy modelu regresji logistycznej w przedziałach wiekowych: rocznych, dziesięcioletnich i dla grup pacjentek <30 r.ż. i ≥ 30 r.ż.

Tabela 13. Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla wykrycia zmian $\geq \text{CIN}2$, $\geq \text{CIN}3$ i raka szyjki macicy w podgrupach kobiet <30 r.ż. i ≥ 30 r.ż.

Rozpoznanie hist-pat.		Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
$\geq \text{CIN}2$	<30 r.ż.	64,3 (35,1-87,2)	90,9 (70,8-98,9)	81,8 (48,2-97,7)	80 (59,3-93,2)	0,78 (0,63-0,92)	0,0058
	≥ 30 r.ż.	58,6 (38,9-76,5)	78,8 (61,1-91,0)	70,8 (48,9-87,4)	68,4 (51,3-82,5)	0,69 (0,57-0,80)	0,0116
$\geq \text{CIN}3$	<30 r.ż.	88,9 (51,8-99,8)	88,9 (70,8-97,7)	72,7 (39,0-94,0)	96 (79,7-100)	0,89 (0,76-100)	0,0006
	≥ 30 r.ż.	76,5 (50,1-93,2)	75,6 (60,5-87,1)	54,2 (32,8-74,5)	89,5 (75,2-97,1)	0,76 (0,64-0,88)	0,0017
RAK	<30 r.ż.	100 (2,7-100)	73,5 (55,6-87,1)	18,2 (2,3-51,8)	100 (86,3-100)	0,87 (0,79-0,94)	0,0843
	≥ 30 r.ż.	100 (2,7-100)	63,3 (49,9-75,4)	8,3 (1,0-27,0)	100 (90,7-100)	0,82 (0,76-0,88)	0,1300

Posługując się testem χ^2 ($p=0,000026$) wykazano, że w grupie pacjentek z dodatnią metylacją, wszystkie pacjentki miały jednocześnie pozytywny wynik testu na DNA HPV, czego nie zaobserwowano u pacjentek z ujemną metylacją ($p=0,000026$).

Rozkład wariantów zidentyfikowanych typów HPV (HPV 16, HPV 18, HPV HR, HPV 16/HR, HPV 18/HR) był istotnie statystycznie różny ($p=0,0002$) w grupie pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego w stosunku do grupy pacjentek z ujemną metylacją (tabela 14).

Nie wykazano istotnie statystycznych różnic dotyczących dominujących typów HPV w grupach pacjentek z dodatnim i ujemnym wynikiem testu QIASure.

Tabela 14. Korelacja między wynikiem testu metylacyjnego a zakażeniem HPV - analiza rozkładu zidentyfikowanych typów HPV u pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego w stosunku do pacjentek z ujemnym wynikiem testu metylacyjnego. Test Chi².

p=0,0002

Wynik testu HPV DNA	Metylacja (+)	Procent (%)	Metylacja (-)	Procent (%)
HPV 16 dodatni	17	17,35	12	12,24
HPV 18 dodatni	2	2,04	0	0,00
HPV HR dodatni	8	8,16	16	16,33
HPV 16/HR dodatni	7	7,14	8	8,16
HPV 18/HR dodatni	1	1,02	3	3,06
HPV ujemny	0	0,00	24	24,49

p - rozkład wariantów zidentyfikowanych typów HPV w grupie pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego w stosunku do grupy pacjentek z ujemnym wynikiem testu metylacyjnego

Iloraz szans (OR) na wystąpienie zmian CIN2 (w porównaniu do braku istotnej patologii szyjki macicy - $\leq$ CIN1) u pacjentek z dodatnią metylacją wyniósł 2,13 (95% CI: 0,60–7,54). OR wystąpienia zmian CIN3 dla kobiet z dodatnim wynikiem testu QIASure w stosunku do wystąpienia zmian niższych niż CIN1, oszacowano na 17,38 (95% CI: 5,10–59,25). Wartość OR wystąpienia zmian $\geq$ CIN3 była najwyższa i wyniosła 21,47 (95% CI: 6,41–71,91). U pacjentek z dodatnią metylacją wykazano większą szansę zachorowania na neoplazję szyjki macicy o wyższym stopniu złośliwości, przy czym dla zmian CIN3 i $\geq$ CIN3 była ona istotna statystycznie (tabela 15).

Tabela 15. Iloraz szans (OR) na wystąpienie wyróżnionych zmian histopatologicznych: CIN2, CIN3 i $\geq$ CIN3 (w stosunku do zmian $\leq$ CIN1), na podstawie oceny wystąpienia dodatniego wyniku testu metylacyjnego.

Rozpoznanie histopatologiczne	OR	95% CI	p-wartość
CIN2	2,13	0,60 – 7,54	0,241282
CIN3	17,38	5,10 – 59,25	0,000005
$\geq$ CIN3	21,47	6,41 – 71,91	0,000001

Posługując się testem Chi² dla trendu wykazano istotny statystycznie ($p < 0,000001$) wzrost obserwowanych przypadków wystąpienia dodatniej metylacji w zależności od stwierdzonego rozpoznania histopatologicznego.

5.3. Wyniki - porównanie testu metylacyjnego do cytodiagnostyki, testu molekularnego identyfikującego DNA HPV oraz ko-testingu

Zarówno cytodiagnostyka, jak i test na DNA HPV wykryły 95,3% (41/43) zmian $\geq$ CIN2, a metoda metylacyjna 60,5% (26/43). Badanie cytologiczne i test HPV DNA nie zdiagnozowały 2 przypadków zmian $\geq$ CIN2, a metoda QIASure 17 (tabela 16). Cytodiagnostyka nie wykryła 1 przypadku raka płaskonabłonkowego i 1 zmiany CIN3, która po usunięciu za pomocą leep-konizacji również okazała się rakiem płaskonabłonkowym. Dla porównania metoda identyfikująca DNA HPV nie rozpoznała 2 przypadków CIN2, a test metylacyjny 12 zmian CIN2 i 5 CIN3.

Odsetek wyników fałszywie pozytywnych w przypadku cytodiagnostyki był najwyższy i wyniósł 51% (50/98). Niewiele mniejszy, bo obliczony na 33,7% (33/98) dotyczył metody molekularnej identyfikującej DNA HPV. Najmniej wyników fałszywie dodatnich wykazano dla testu metylacyjnego – 9/98 (9,2%) (tabela 16).

Połączenie cytodiagnostyki z testem HPV DNA oraz cytodiagnostyki z metylacją pozwoliło na wykrycie wszystkich zmian $\geq$ CIN2 (n=43), ale wiązało się z wysokim odsetkiem wyników fałszywie pozytywnych, odpowiednio 53,1% i 51% (tabela 16).

Test podwójny złożony z obu metod molekularnych – metylacji i testu na DNA HPV – uzyskał taki sam odsetek wyników prawdziwie (+) i (–) oraz fałszywie (+) i (–) dla zmian $\geq$ CIN2, jak samodzielny test HPV DNA. W populacji włączonej do niniejszego badania nie było przypadku pacjentki z dodatnią metylacją przy jednocześnie ujemnym wyniku testu wirusowego, stąd metylacja nie podnosi wartości diagnostycznej testu po połączeniu z testem na DNA HPV w stosunku do samego testu identyfikującego wirusa (tabela 16).

Tabela 16. Porównanie ilości wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wykrywanych przez poszczególne metody diagnostyczne dla zmian $\geq$ CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Prawdziwie pozytywne	Prawdziwie negatywne	Fałszywie pozytywne	Fałszywie negatywne
Cytodiagnostyka	41	5	50	2
Test HPV DNA	41	22	33	2
Metylacja	26	46	9	17
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	43	3	52	0
Cytodiagnostyka + Metylacja	43	5	50	0
Test HPV DNA + Metylacja	41	22	33	2

Czułość metody QIAure dla zmian $\geq$ CIN2 wyniosła 60,5%, co w porównaniu do cytodiagnostyki i testu HPV DNA było niższą wartością (czułość obu metod - 95,3%). Połączenie cytodiagnostyki z testem na DNA HPV oraz cytodiagnostyki z testem metylacyjnym pozwoliło osiągnąć czułość dla rozpoznań $\geq$ CIN2 równą 100%. Multipleksowy test FAM19A4/mir124-2 dla rozpoznań $\geq$ CIN2 cechował się najwyższą swoistością ze wszystkich metod – 83,6%. Specyficzność testu HPV DNA i cytodiagnostyki wyniosły odpowiednio 40% i 9,1% (tabela 17).

Wartość PPV metylacji była najwyższa ze wszystkich porównywanych strategii diagnostycznych i dla zmian $\geq$ CIN2 została obliczona na 74,3%. Negatywna wartość predykcyjna była najkorzystniejsza w przypadku testu na DNA HPV, dla zmian $\geq$ CIN2 wyniosła ona 91,7%, testu metylacyjnego odpowiednio 73%, cytologii zaś 71,4%. Wartość NPV osiągnęła 100% dla testów podwójnych - cytodiagnostyka + test HPV DNA oraz cytodiagnostyka + test metylacyjny (tabela 17).

Test oceniający hipermetylację promotorów genów supresorowych FAM19A4/mir124-2 w stosunku do innych strategii charakteryzował się najwyższym ilorazem wiarygodności wyniku dodatniego (PLR). Szansa na otrzymanie pozytywnego wyniku metylacji przez pacjentkę rzeczywiście posiadającą zmianę $\geq$ CIN2 była 3,7 razy większa niż szansa na otrzymanie takiego wyniku przez pacjentkę ze zmianą $\leq$ CIN1. Dla porównania parametr PLR cytodiagnostyki wyniósł 1,05, a testu HPV DNA 1,59 (tabela 17).

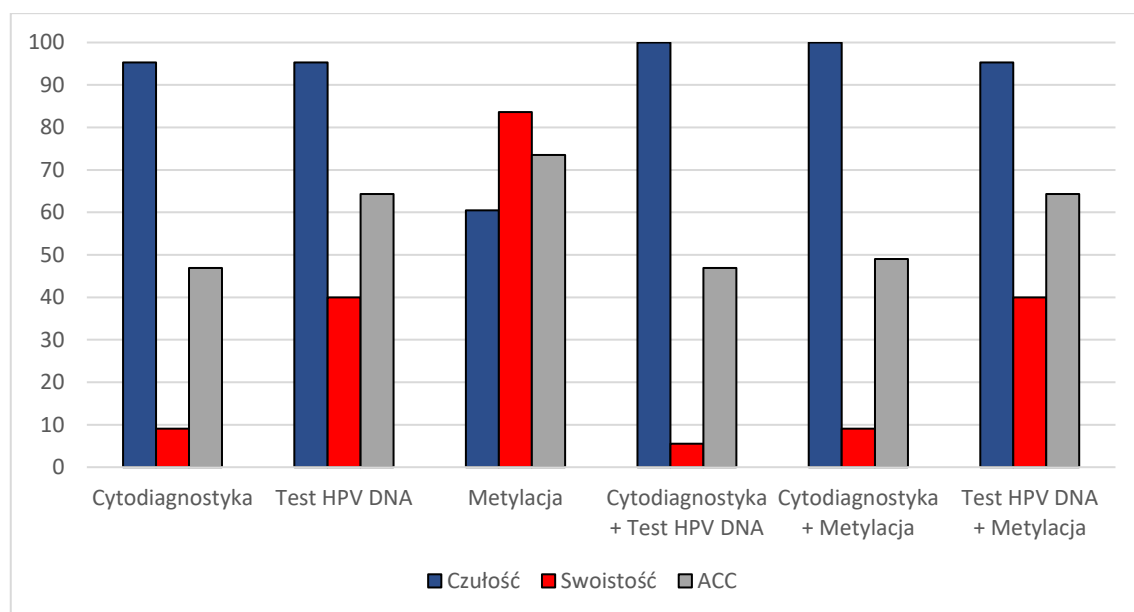
Najlepszą dokładność testu (ACC) wykazano również dla metody metylacyjnej. Pacjentki po wykonaniu testu QIAure mogły być pewne postawionej diagnozy $\geq$ CIN2

w 73,5%. Dla zmian $\geq$ CIN2 ACC badania cytologicznego obliczono na 46,9%, a testu HPV DNA na 64,3% (tabela 17).

Tabela 17. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	PLR (95% CI)	NLR (95% CI)	ACC [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	95,3 (84,3-99,4)	9,1 (3,0-20,0)	45,1 (34,6-55,8)	71,4 (29,0-96,3)	1,05 (0,94-1,17)	0,51 (0,10-2,51)	46,9 (36,8-57,3)	0,52 (0,47-0,57)	0,7070
Test HPV DNA	95,3 (84,2-99,4)	40 (27,0-54,1)	55,4 (43,4-67,0)	91,7 (73,0-99,0)	1,59 (1,27-1,99)	0,12 (0,03-0,47)	64,3 (54,0-73,7)	0,68 (0,60-0,75)	0,0028
Metylacja	60,5 (44,4-75,0)	83,6 (71,2-92,2)	74,3 (56,7-87,5)	73 (60,3-83,4)	3,7 (1,94-7,04)	0,47 (0,32-0,70)	73,5 (63,6-81,9)	0,72 (0,63-0,81)	0,0002
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (91,8-100)	5,5 (1,1-15,1)	45,3 (35,0-55,8)	100 (29,2-100)	1,06 (0,99-1,13)	0	46,9 (36,8-57,3)	0,53 (0,50-0,56)	0,6443
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (91,8-100)	9,1 (3,0-20,0)	46,2 (35,8-56,9)	100 (47,8-100)	1,1 (1,01-1,20)	0	49 (38,7-59,3)	0,55 (0,51-0,58)	0,4415
Test HPV DNA + Metylacja	95,3 (84,2-99,4)	40 (27,0-54,1)	55,4 (43,1-67,0)	91,7 (73,0-99,0)	1,59 (1,27-1,99)	0,12 (0,03-0,47)	64,3 (54,0-73,7)	0,68 (0,60-0,75)	0,0028

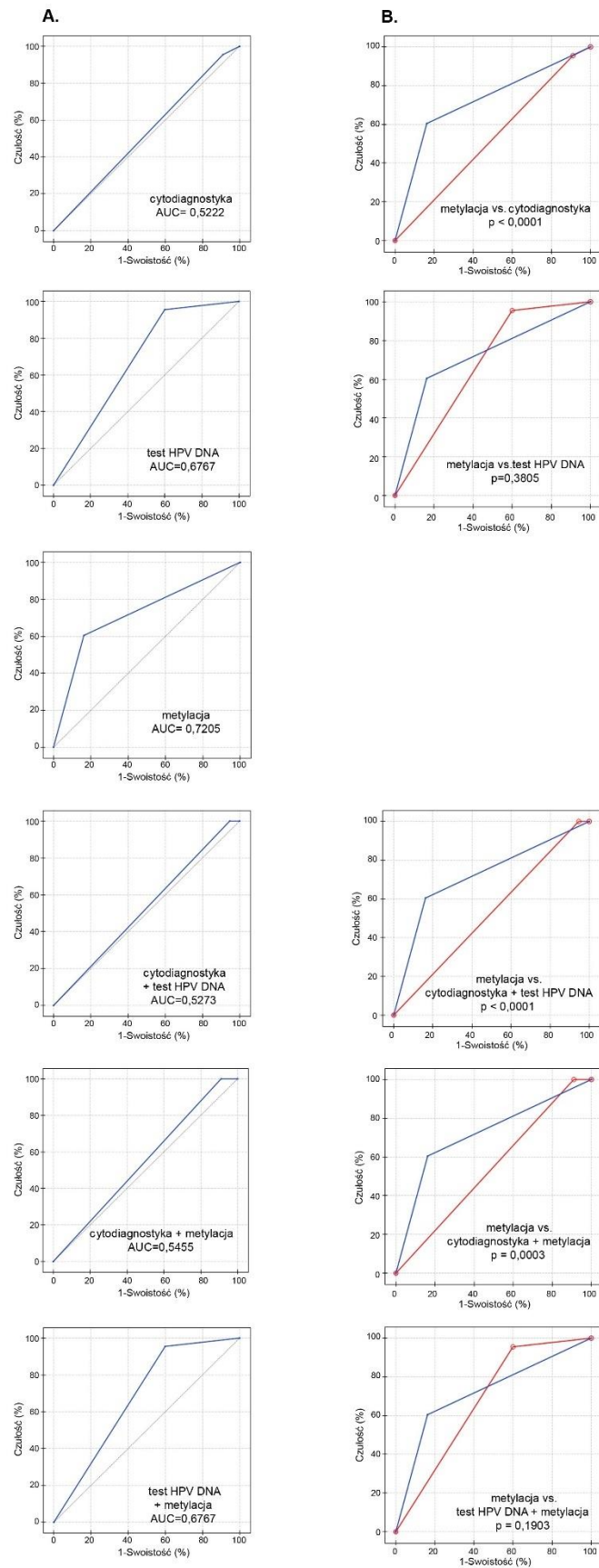
Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności (ACC) wszystkich strategii diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 przedstawiono na wykresie 12.



Wykres 12. Porównanie czułości, swoistości i dokładności (ACC) strategii diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2.

W celu analizy przydatności wszystkich metod diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 wykreślono wykresy krzywych ROC. Najlepszą przydatność diagnostyczną uzyskano dla samodzielnego testu metylacyjnego, pole pod krzywą ROC (AUC) oszacowano na 0,72 ($p=0,0002$). AUC dla cytodiagnostyki i testu HPV DNA wyniosło odpowiednio 0,52 i 0,68 (wykres 13A).

Przydatność testu QIASure w diagnozowaniu zmian co najmniej CIN2, w stosunku do pozostałych strategii porównano za pomocą wielkości pól pod krzywymi ROC (AUC). AUC testu metylacyjnego miało istotnie statystycznie wyższą wartość niż AUC cytodiagnostyki oraz testów podwójnych: cytologia + test HPV DNA i cytologia + metylacja (wykres 13B).



Czułość cytodiagnostyki dla rozpoznania $\geq$ CIN2 spadała wraz z punktem odcięcia rozpoznania nieprawidłowego wyniku - ASC-US+, LSIL+, HSIL+ i wyniosła odpowiednio 95,3%, 93%, 60,5%. Swoistość natomiast rosła wraz z progiem o wyższym zaawansowaniu rozpoznania cytologicznego (9,1%, 32,7%, 76,4%), co wiązało się ze spadającym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich - 51% (50/98), 37,8% (37/98), 13,3% (13/98) (tabela 18).

Porównanie badania cytologicznego przy różnych progach diagnostycznych do pozostałych metod wykazało, że dla zmian $\geq$ CIN2 najwyższą czułość osiągnęła cytodiagnostyka ASC-US+ oraz test na DNA HPV (obie metody – 95,3%), następnie cytologia LSIL+ (93%), cytologia HSIL+ oraz metylacja (obie metody – 60,5%). Najkorzystniejszą swoistość (83,6%) oraz wartość PPV (74,3%) obliczono dla testu metylacyjnego FAM19A4/mir124-2. Wartość NPV metody QIASure (73%) była niższa niż testu na DNA HPV (91,7%) i cytodiagnostyki LSIL+ (85,7%), ale wyższa niż cytodiagnostyki ASC-US+ (71,4%) i HSIL+ (71,2%) (tabela 18).

Tabela 18. Porównanie cytodiagnostyki przy progu odcięcia ASC-US+, LSIL+, HSIL+, testu na DNA HPV i testu metylacyjnego w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)
Cytodiagnostyka ASC-US+	95,3 (84,3-99,5)	9,1 (3,0-20,0)	45,1 (34,6-55,8)	71,4 (29,0-96,3)
Cytodiagnostyka LSIL+	93 (80,9-98,5)	32,7 (20,7-46,7)	52 (40,7- 63,9)	85,7 (63,7-97,0)
Cytodiagnostyka HSIL+	60,5 (44,4-75,0)	76,4 (63,0-86,8)	66,7 (49,8-80,9)	71,2 (57,9-82,2)
Test HPV DNA	95,3 (84,2-99,4)	40 (27,0-54,1)	55,4 (43,4-67,0)	91,7 (73,0-99,0)
Metylacja	60,5 (44,4-75,0)	83,6 (71,2-92,2)	74,3 (56,7-87,5)	73 (60,3-83,4)

Test HPV DNA oraz trzy warianty ko-testingu wykryły wszystkie zmiany $\geq$ CIN3 (n=26). Cytodiagnostyka prawidłowo zdiagnozowała 92,3% (24/26) przypadków $\geq$ CIN3, a test metylacyjny 80,8% (21/26) (tabela 19).

Odsetek wyników fałszywie dodatnich dla rozpoznania co najmniej CIN3 w przypadku badania cytologicznego wyniósł aż 68,4% (67/98), w przypadku testu PCR na DNA HPV 49% (48/98). Metoda analizująca hipermetylację genów

supresorowych FAM19A4/mir124-2 fałszywie zdiagnozowała jedynie 14 kobiet (14,3%), które nie miały rozpoznania $\geq$ CIN3 (tabela 19).

Tabela 19. Porównanie ilości wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wykrywanych przez poszczególne metody diagnostyczne dla zmian $\geq$ CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Prawdziwie pozytywne	Prawdziwie negatywne	Fałszywie pozytywne	Fałszywie negatywne
Cytodiagnostyka	24	5	67	2
Test HPV DNA	26	24	48	0
Metylacja	21	58	14	5
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	26	3	69	0
Cytodiagnostyka + Metylacja	26	5	67	0
Test HPV DNA + Metylacja	26	24	48	0

Dla rozpoznania $\geq$ CIN3 czułość multipleksowego testu FAM19A4/mir124-2 została obliczona na 80,8%, co w stosunku do badania cytologicznego (92,3%) i testu na DNA HPV (100%) było niższą wartością. Przy pomocy testu molekularnego identyfikującego DNA HPV, a także trzech wariantów testów podwójnych, zdiagnozowano wszystkie zmiany $\geq$ CIN3. Metoda metylacyjna dla zmian $\geq$ CIN3 cechowała się znacznie wyższą specyficznością (80,6%) w porównaniu do pozostałych testów (test HPV DNA – 33,3%, cytodiagnostyka – 6,9%) (tabela 20).

Dodatnia wartość predykcyjna testu QIASure dla zmian $\geq$ CIN3 osiągnęła najwyższy (60%) wynik ze wszystkich porównywanych strategii diagnostycznych. Wartość NPV testu na DNA HPV oraz wszystkich metod podwójnych wyniosła 100%. Natomiast pacjentki z ujemnym wynikiem metylacji mogły być pewne w 92,1% (parametr NPV), że nie mają rozpoznania $\geq$ CIN3 (tabela 20).

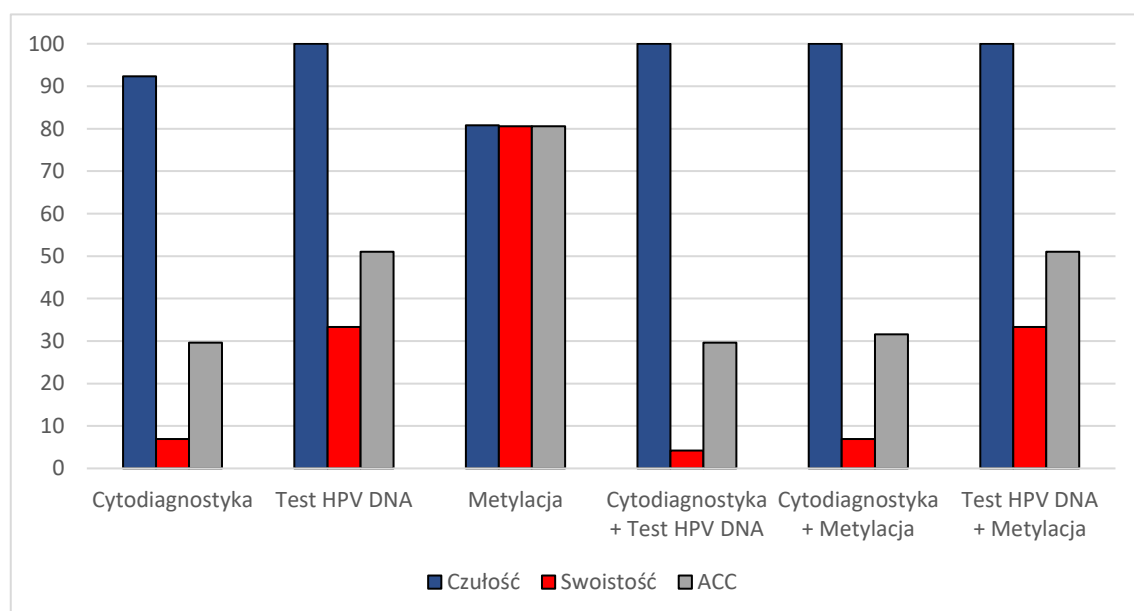
Szansa na otrzymanie dodatniego wyniku testu QIASure przez pacjentkę rzeczywiście posiadającą zmianę $\geq$ CIN3 była 4,15 razy większa (parametr PRL) niż szansa na otrzymanie takiego wyniku przez pacjentkę ze zmianą $\leq$ CIN2. Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego w przypadku badania cytologicznego wyniósł 0,99, a w przypadku testu molekularnego identyfikującego DNA HPV 1,5 (tabela 20).

Pacjentki po wykonaniu testu metylacyjnego bez względu na wynik mogły być w 80,6% pewne postawionego rozpoznania (ACC dla zmian $\geq$ CIN3). Dokładność cytodiagnostyki i testu HPV DNA wyniosły odpowiednio 29,6% i 51% (tabela 20).

Tabela 20. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	PLR (95% CI)	NLR (95% CI)	ACC [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	92,3 (74,9-99,1)	6,9 (2,3-15,3)	26,4 (17,7-36,7)	71,4 (29,0-96,3)	0,99 (0,87-1,13)	1,11 (0,23-5,36)	29,6 (20,8-39,7)	0,50 (0,44-0,56)	0,9551
Test HPV DNA	100 (86,8-100)	33,3 (22,7-45,4)	35,1 (24,4-47,1)	100 (85,8-100)	1,5 (1,27-1,77)	0	51 (40,7-61,3)	0,67 (0,61-0,72)	0,0121
Metylacja	80,8 (60,6-93,4)	80,6 (69,5-88,9)	60 (42,1-76,1)	92,1 (82,4-97,4)	4,15 (2,50-6,89)	0,24 (0,11-0,53)	80,6 (71,4-87,9)	0,81 (0,72-0,90)	<0,0001
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (86,8-100)	4,2 (0,9-11,7)	27,4 (18,7-37,5)	100 (29,2-100)	1,04 (0,99-1,10)	0	29,6 (20,839,7)	0,52 (0,50-0,54)	0,7537
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (86,8-100)	6,9 (2,3-15,5)	28 (19,1-38,2)	100 (47,8-100)	1,08 (1,01-1,15)	0	31,6 (22,6-41,8)	0,53 (0,51-0,56)	0,6009
Test HPV DNA + Metylacja	100 (86,8-100)	33,3 (22,7-45,4)	35,1 (24,4-47,1)	100 (85,8-100)	1,5 (1,27-1,77)	0	51 (40,7-61,3)	0,67 (0,61-0,72)	0,0121

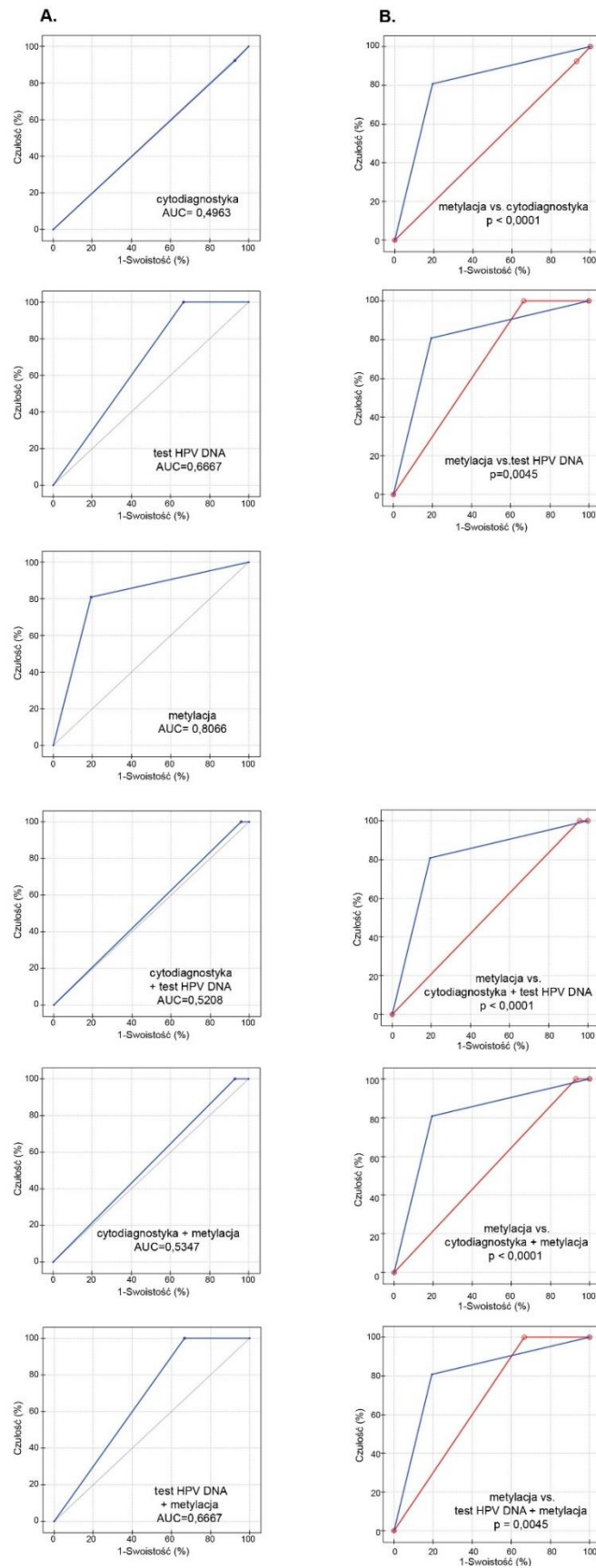
Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności (ACC) wszystkich strategii diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 przedstawiono na wykresie 14.



Wykres 14. Porównanie czułości, swoistości i dokładności (ACC) strategii diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3.

Analiza krzywych ROC wykazała, że najlepszą przydatnością dla wykrycia zmian co najmniej CIN3 charakteryzuje się samodzielnie użyty test metylacyjny - AUC=0,81 ($p<0,0001$). Pole pod krzywą ROC (AUC) testu HPV DNA oraz cytodiagnostyki obliczono odpowiednio na 0,67 oraz 0,50 (wykres 15A).

W celu oceny przydatności testu QIASure w diagnozowaniu zmian $\geq$ CIN3, w stosunku do pozostałych metod, porównano wielkości pól pod krzywymi ROC (AUC). Krzywa ROC testu metylacyjnego cechowała się istotnie statystycznie większym polem niż pole każdej z pozostałych metod, co pozwala na dokładniejsze diagnozowanie zmian $\geq$ CIN3 przez test FAM19A4/mir124-2 (wykres 15B).



Wykres 15. A. Wykresy krzywych ROC: dla cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych zastosowanych w celu wykrycia zmian $\geq$ CIN3; B. Porównania wielkości pola pod krzywą ROC (AUC) testu metylacyjnego z polami pod krzywymi ROC (AUC) pozostałych strategii diagnostycznych zastosowanych w celu wykrycia zmian $\geq$ CIN3.

Dla zmian $\geq$ CIN3 czułość cytodiagnostyki spadała wraz z progiem odcięcia rozpoznania nieprawidłowego wyniku - ASC-US+, LSIL+, HSIL+ i wyniosła odpowiednio 92,3%, 88,5%, 69,2%. Swoistość natomiast rosła wraz z punktem odcięcia o wyższym zaawansowaniu rozpoznania cytologicznego (6,9%, 25%, 70,8%) (tabela 21).

Porównanie badania cytologicznego przy różnych progach diagnostycznych do pozostałych metod wykazało, że dla zmian $\geq$ CIN3 najwyższą czułość osiągnął test na DNA HPV (100%), następnie kolejno cytodiagnostyka ASC-US+ (92,3%), cytodiagnostyka LSIL+ (88,5%), metylacja (80,8%), cytodiagnostyka HSIL+ (69,2%) (tabela 21).

Dla zmian $\geq$ CIN3 najwyższą swoistość (80,6%) oraz pozytywną wartość predykcyjną (60%) oszacowano dla testu QIASure. Wartość NPV testu metylacyjnego (92,1%) była niższa niż testu molekularnego na DNA HPV (100%), ale wyższa niż NPV cytodiagnostyki przy każdym progu odcięcia (tabela 21).

Tabela 21. Porównanie cytodiagnostyki przy progu odcięcia ASC-US+, LSIL+, HSIL+, testu na DNA HPV i testu metylacyjnego w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)
Cytodiagnostyka ASC-US+	92,3 (74,9-99,1)	6,9 (2,3-15,3)	26,4 (17,7-36,7)	71,4 (29,0-96,3)
Cytodiagnostyka LSIL+	88,5 (69,8-97,6)	25 (15,5-36,6)	29,9 (20,0-41,4)	85,7 (63,7- 97,0)
Cytodiagnostyka HSIL+	69,2 (48,2-85,7)	70,8 (58,9-81,0)	46,2 (30,1-62,8)	86,4 (75,0-94,0)
Test HPV DNA	100 (86,8-100)	33,3 (22,7-45,4)	35,1 (24,4-47,1)	100 (85,8-100)
Metylacja	80,8 (60,6-93,4)	80,6 (69,5-88,9)	60 (42,1-76,1)	92,1 (82,4-97,4)

Metoda metylacyjna, test na DNA HPV oraz trzy testy podwójne wykryły wszystkie 4 raki szyjki macicy (1 rak płaskonabłonkowy, 2 raki gruczołowe, 1 rak neuroendokryny). Cytodiagnostyka użyta samodzielnie nie zdiagnozowała 1 przypadku raka płaskonabłonkowego szyjki macicy. Odsetek wyników fałszywie dodatnich dla rozpoznania raka szyjki macicy w przypadku testu metylacyjnego był prawie 3-krotnie niższy niż pozostałych strategii diagnostycznych (tabela 22).

Tabela 22. Porównanie ilości wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wykrywanych przez poszczególne metody diagnostyczne dla rozpoznania raka szyjki macicy w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Prawdziwie pozytywne	Prawdziwie negatywne	Fałszywie pozytywne	Fałszywie negatywne
Cytodiagnostyka	3	6	88	1
Test HPV DNA	4	24	70	0
Metylacja	4	63	31	0
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	4	3	91	0
Cytodiagnostyka + Metylacja	4	5	89	0
Test HPV DNA + Metylacja	4	24	70	0

Dla wykrycia raka szyjki macicy czułość wszystkich strategii diagnostycznych, z wyjątkiem cytodiagnostyki, wyniosła 100%. Badanie cytologiczne zdiagnozowało 3 z 4 raków szyjki macicy. Metoda metylacyjna dla raka szyjki macicy charakteryzowała się najwyższą swoistością (67%) oraz wartością PPV (11,4%) ze wszystkich pojedynczych testów. Ujemna wartość predykcijna wszystkich strategii diagnostycznych, oprócz badania cytologicznego, wyniosła 100% (tabela 23).

Szansa na otrzymanie dodatniego wyniku testu QIASure przez pacjentkę rzeczywiście chorą na raka szyjki macicy była 3,03 razy większa niż szansa na otrzymanie wyniku dodatniego przez pacjentkę zdrową (parametr PLR). Dla porównania wynik PLR cytodiagnostyki oraz testu na DNA HPV wyniósł 0,80 i 1,34 (tabela 23).

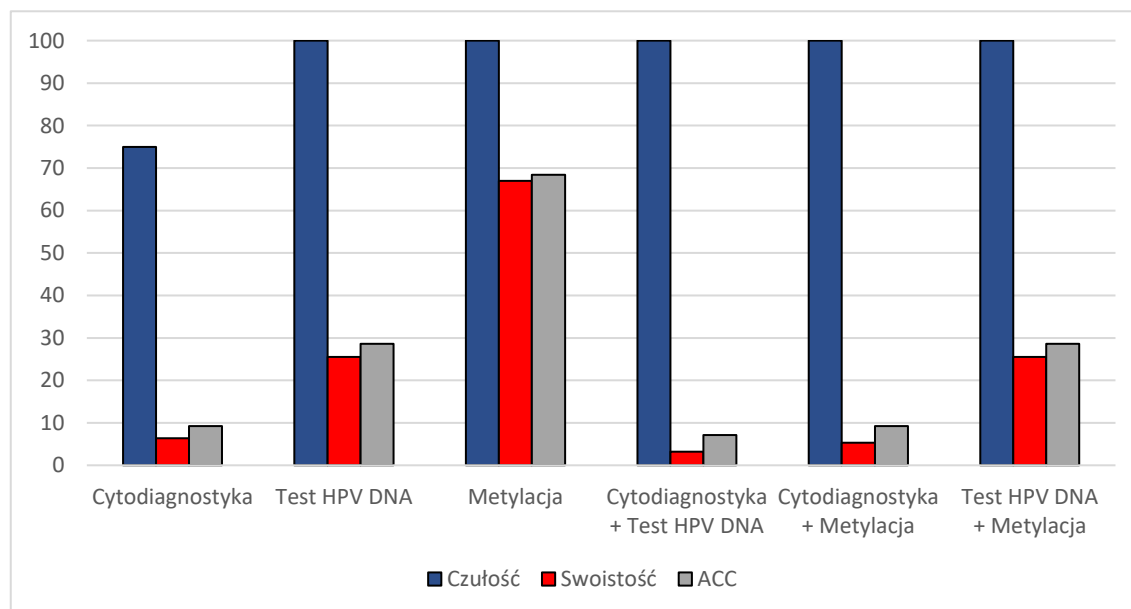
Szansa na otrzymanie negatywnego wyniku każdego z testów, z wyjątkiem cytologii, przez pacjentkę rzeczywiście chorą na raka szyjki macicy była zerowa (parametr NLR). Natomiast szansa, że pacjentka z rakiem szyjki macicy otrzyma prawidłowy wynik badania cytologicznego była aż 3,92 razy większa niż na otrzymanie prawidłowej cytologii przez pacjentkę ze zmianą $\leq$ CIN3 (tabela 23).

Najlepszą dokładność testu (ACC=68,4%), bez względu na wynik, dla rozpoznania raka szyjki macicy wykazano w przypadku metody metylacyjnej zastosowanej samodzielnie lub w połączeniu z testem na DNA HPV. Dokładność badania cytologicznego obliczono odpowiednio na 9,2%, a testu HPV DNA na 28,6% (tabela 23).

Tabela 23. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu raka szyjki macicy w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	PLR (95% CI)	NLR (95% CI)	ACC [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	75 (19,4-99,4)	6,4 (2,4-13,4)	3,3 (0,7-9,3)	85,7 (42,1-99,7)	0,80 (0,45-1,41)	3,92 (0,61-25,3)	9,2 (4,3-16,7)	0,41 (0,16-0,65)	0,5297
Test HPV DNA	100 (39,8-100)	25,5 (17,1-35,6)	5,4 (1,5-13,3)	100 (85,8-100)	1,34 (1,19-1,51)	0	28,6 (19,9-38,6)	0,63 (0,58-0,67)	0,3888
Metylacja	100 (39,8-100)	67 (56,6-76,4)	11,4 (3,2-26,7)	100 (94,3-100)	3,03 (2,27-4,05)	0	68,4 (58,2-77,4)	0,84 (0,79-0,88)	0,0237
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (39,8-100)	3,2 (0,7-9,0)	4,2 (1,2-10,4)	100 (29,2-100)	1,03 (1,0-1,07)	0	7,1 (2,9-14,2)	0,52 (0,50-0,53)	0,9142
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (39,8-100)	5,3 (1,7-12,0)	4,3 (1,2-10,6)	100 (47,8-100)	1,06 (1,01-1,11)	0	9,2 (4,3-16,7)	0,53 (0,50-0,55)	0,8575
Test HPV DNA + Metylacja	100 (39,8-100)	25,5 (17,1-35,6)	5,4 (1,5-13,3)	100 (85,8-100)	1,34 (1,19-1,51)	0	28,6 (19,9-38,6)	0,63 (0,58-0,67)	0,3888

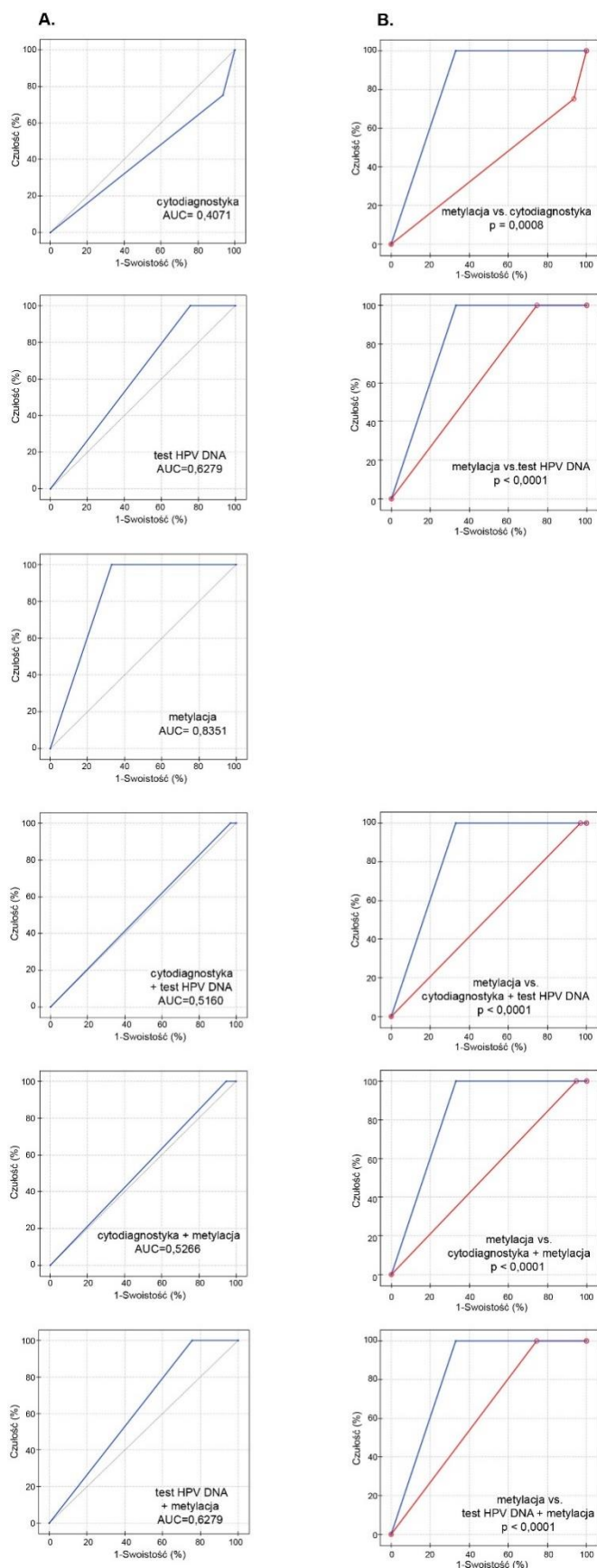
Porównanie parametrów czułości, swoistości i dokładności (ACC) wszystkich strategii diagnostycznych w wykrywaniu raka szyjki macicy przedstawiono na wykresie 16.



Wykres 16. Porównanie czułości, swoistości i dokładności (ACC) strategii diagnostycznych w wykrywaniu raka szyjki macicy.

Posługując się analizą krzywych ROC określono przydatność wszystkich strategii diagnostycznych w wykrywaniu raka szyjki macicy. Najlepszą przydatność diagnostyczną uzyskano dla testu metylacyjnego - pole pod krzywą ROC (AUC) oszacowano na 0,84 ($p=0,0237$). AUC badania cytologicznego i testu HPV DNA wyniosło odpowiednio 0,41 i 0,63 (wykres 17A).

Przydatność testu QIASure w diagnozowaniu raka szyjki macicy, w stosunku do pozostałych strategii triage, porównano za pomocą wielkości pól pod krzywymi ROC (AUC). AUC testu metylacyjnego miało istotnie statystycznie wyższą wartość niż AUC wszystkich pozostałych strategii diagnostycznych (wykres 17B).



Wykres 17. A. Wykresy krzywych ROC: dla cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych zastosowanych w celu wykrycia raka szyjki macicy; B. Porównania wielkości pola pod krzywą ROC (AUC) testu metylacyjnego z polami pod krzywymi ROC (AUC) pozostałych strategii diagnostycznych zastosowanych w celu wykrycia raka szyjki macicy.

Zbadano parametry diagnostyczne wszystkich strategii diagnostycznych dla zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy w 2 grupach wiekowych: <30 r.ż. i ≥ 30 r.ż.

Dla zmian $\geq$ CIN2 wśród kobiet <30 r.ż. najwyższą czułość oszacowano dla cytodiagnostyki zastosowanej samodzielnie oraz w połączeniu z testem na DNA HPV i z metylacją (czułość każdej strategii 100%). Metoda metylacyjna charakteryzowała się najniższą czułością (64,3%) przy najwyższej swoistości (90,9%) i wartości PPV (81,8%). Najlepszą przydatność – pole pod krzywą ROC (AUC) obliczono dla testu QIASure (0,78; $p=0,0058$) (tabela 24).

Tabela 24. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w grupie pacjentek <30 r.ż.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	100 (76,8-100)	9,1 (1,1-29,2)	41,2 (24,7-59,3)	100 (2,7-100)	0,55 (0,48-0,61)	0,6496
Test HPV DNA	85,7 (57,2-98,2)	31,8 (13,9-54,9)	44,4 (25,5-64,7)	77,8 (40,0-97,2)	0,59 (0,45-0,73)	0,3809
Metylacja	64,3 (35,1-87,2)	90,9 (70,8-98,9)	81,8 (48,2-97,7)	80 (59,3-93,2)	0,78 (0,63-0,92)	0,0058
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (76,8-100)	4,5 (0,1-22,8)	40 (23,9-57,9)	100 (2,2-100)	0,52 (0,48-0,57)	0,4102
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (76,8-100)	9,1 (1,1-29,2)	41,2 (24,6-59,3)	100 (2,7-100)	0,55 (0,48-0,61)	0,3248
Test HPV DNA + Metylacja	85,7 (57,2-98,2)	31,8 (13,9-54,9)	44,4 (25,4-64,7)	77,8 (40,0-97,2)	0,59 (0,45-0,73)	0,1905

Dla zmian $\geq$ CIN2 wśród kobiet ≥ 30 r.ż. najwyższą czułość obliczono dla testu na DNA HPV użytego samodzielnie oraz dla wszystkich testów podwójnych (100%). Test QIASure cechował się najniższą czułością (58,6%) przy najwyższej swoistości (78,8%) i dodatniej wartości predykcyjnej (70,8%). Przydatność diagnostyczna o najlepszych parametrach w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w grupie kobiet powyżej 30 r.ż. została oszacowana dla testu na DNA HPV użytego samodzielnie lub w połączeniu z metylacją (AUC=0,73; $p=0,0022$) (tabela 25).

Tabela 25. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w grupie pacjentek ≥ 30 r.ż.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	93,1 (77,2-99,2)	9,1 (1,9-24,3)	47,4 (34,0-61,0)	60 (14,7-94,7)	0,51 (0,44-0,58)	0,8822
Test HPV DNA	100 (88,1-100)	45,5 (28,1-63,7)	61,7 (46,4-75,5)	100 (78,2-100)	0,73 (0,64-0,81)	0,0022
Metylacja	58,6 (38,9-76,5)	78,8 (61,1-91,0)	70,8 (48,9-87,4)	68,4 (51,3-82,5)	0,69 (0,57-0,80)	0,0116
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (88,1-100)	6,1 (0,7-20,2)	48,3 (35,2-61,6)	100 (2,7-100)	0,53 (0,49-0,57)	0,6824
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (88,1-100)	9,1 (1,9-24,3)	49,2 (35,9-62,5)	100 (29,2-100)	0,55 (0,50-0,60)	0,5394
Test HPV DNA + Metylacja	100 (88,1-100)	45,5 (28,1-63,7)	61,7 (46,4-75,5)	100 (78,2-100)	0,73 (0,64-0,81)	0,0022

Dla zmian $\geq$ CIN3 wśród kobiet <30 r.ż. czułość i wartość NPV wszystkich strategii diagnostycznych, z wyjątkiem metody metylacyjnej (odpowiednio 88,9% i 96%), wyniosły 100%. Test FAM19A4/mir124-2 osiągnął najwyższą swoistość (88,9%) i dodatnią wartość predykcyjną (72,7%) w tej grupie kobiet. Czułość i swoistość testu QIASure wynoszące 88,9% wpłynęły na największą przydatność diagnostyczną tejże metody wśród kobiet <30 r.ż. - pole pod krzywą ROC (AUC) (0,89; $p=0,0006$) (tabela 26).

Tabela 26. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w grupie pacjentek <30 r.ż.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	100 (66,4- 100)	7,4 (0,9-24,3)	26,5 (12,9-44,4)	100 (2,7-100)	0,54 (0,49-0,59)	0,7423
Test HPV DNA	100 (66,4-100)	33,3 (16,5-54,0)	33,3 (16,5-54,0)	100 (66,4-100)	0,67 (0,58-0,76)	0,1390
Metylacja	88,9 (51,8-99,8)	88,9 (70,8-97,7)	72,7 (39,0-94,0)	96 (79,7-100)	0,89 (0,76-100)	0,0006
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (66,4-100)	3,7 (0,1-19,0)	25,7 (12,5-43,3)	100 (2,2-100)	0,52 (0,48-0,56)	0,8694
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (66,4-100)	7,4 (0,9-24,3)	26,5 (12,9-44,4)	100 (2,7-100)	0,54 (0,49-0,59)	0,7423
Test HPV DNA + Metylacja	100 (66,4-100)	33,3 (16,5-54,0)	33,3 (16,5-54,0)	100 (66,4-100)	0,67 (0,58-0,76)	0,1390

Dla zmian $\geq$ CIN3 wśród kobiet ≥ 30 r.ż. najwyższą czułość osiągnął test molekularny HPV DNA zastosowany samodzielnie oraz wszystkie strategie ko-testingu (100%). Metoda metylacyjna charakteryzowała się najniższą czułością (76,5%) przy najwyższej swoistości (75,6%) i wartości PPV (54,2%). Najlepszą przydatność – pole pod krzywą ROC (AUC) obliczono również dla testu QIASure (0,76; $p=0,0017$) (tabela 27).

Tabela 27. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w grupie pacjentek ≥ 30 r.ż.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	88,2 (63,6-98,5)	6,7 (1,4-18,3)	26,3 (15,5-39,7)	60 (14,7-94,7)	0,48 (0,39-0,56)	0,7583
Test HPV DNA	100 (80,5-100)	33,3 (20,0-49,0)	36,2 (22,7-51,5)	100 (78,2-100)	0,67 (0,60-0,74)	0,0442
Metylacja	76,5 (50,1-93,2)	75,6 (60,5-87,1)	54,2 (32,8-74,5)	89,5 (75,2-97,1)	0,76 (0,64-0,88)	0,0017
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (80,5-100)	4,4 (0,5-15,2)	28,3 (17,5-41,4)	100 (2,7-100)	0,52 (0,49-0,55)	0,7885
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (80,5-100)	6,7 (1,4-18,3)	28,8 (17,8-42,1)	100 (29,2-100)	0,53 (0,50-0,57)	0,6874
Test HPV DNA + Metylacja	100 (80,5-100)	33,3 (20,0-49,0)	36,2 (22,7-51,9)	100 (78,2-100)	0,67 (0,60-0,74)	0,0442

Dla rozpoznania raka szyjki macicy wśród kobiet < 30 r.ż. czułość i negatywna wartość predykcyjna wszystkich strategii diagnostycznych wyniosły 100%. Najwyższą specyficzność uzyskał test QIASure (73,5%). Najkorzystniejszą przydatność - pole pod krzywą ROC (AUC) obliczono również dla metody metylacyjnej (0,87; $p=0,0843$) (tabela 28).

Tabela 28. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu raka szyjki macicy w grupie pacjentek <30 r.ż.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	100 (2,7-100)	5,9 (0,7-19,7)	5,9 (0,7-19,7)	100 (2,7-100)	0,53 (0,49-0,57)	0,8901
Test HPV DNA	100 (2,7-100)	26,5 (12,9-44,4)	7,4 (0,9-24,3)	100 (66,4-100)	0,63 (0,56-0,71)	0,5342
Metylacja	100 (2,7-100)	73,5 (55,6-87,1)	18,2 (2,3-51,8)	100 (86,3-100)	0,87 (0,79-0,94)	0,0843
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (2,7-100)	2,9 (0,1-15,3)	5,7 (0,7-19,2)	100 (2,2-100)	0,51 (0,49-0,54)	0,9449
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (2,7-100)	5,9 (0,7-19,7)	5,9 (0,7-19,7)	100 (2,7-100)	0,53 (0,49-0,57)	0,8901
Test HPV DNA + Metylacja	100 (2,7-100)	26,5 (12,9-44,4)	7,4 (0,9-24,3)	100 (66,4-100)	0,63 (0,56-0,71)	0,5342

Dla rozpoznania raka szyjki macicy wśród kobiet ≥ 30 r.ż. czułość i wartość NPV wszystkich strategii diagnostycznych, z wyjątkiem cytodiagnostyki, wyniosły 100%. Najwyższą swoistość (63,3%) i najlepszą przydatność – pole pod krzywą ROC (AUC) obliczono dla testu QIASure (0,82; p=0,1300) (tabela 29).

Tabela 29. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu raka szyjki macicy w grupie pacjentek ≥ 30 r.ż.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	50 (1,1- 98,9)	6,7 (1,8-16,2)	1,8 (0,04-9,4)	80 (28,4-99,5)	0,28 (0-0,77)	0,3003
Test HPV DNA	100 (2,7-100)	25 (14,7-37,9)	4,3 (0,5-14,5)	100 (78,2-100)	0,62 (0,57-0,68)	0,5501
Metylacja	100 (2,7-100)	63,3 (49,9-75,4)	8,3 (1,0-27,0)	100 (90,7-100)	0,82 (0,76-0,88)	0,1300
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (2,7-100)	3,3 (0,4-11,5)	3,3 (0,4-11,5)	100 (2,7-100)	0,52 (0,49-0,54)	0,9365
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (2,7-100)	5 (1,0-13,9)	3,4 (0,4-11,7)	100 (29,2-100)	0,53 (0,50-0,55)	0,9049
Test HPV DNA + Metylacja	100 (2,7-100)	25 (14,7-37,9)	4,3 (0,5-14,5)	100 (78,2-100)	0,63 (0,57-0,68)	0,5501

Spośród wszystkich testów użytych samodzielnie w grupach pacjentek poniżej i powyżej 30 r.ż., test na DNA HPV charakteryzował się najwyższą przydatnością diagnostyczną dla rozpoznań $\geq$ CIN2 w grupie kobiet $\geq$ 30 r.ż. W pozostałych przypadkach największe pole pod krzywą ROC (AUC) osiągnął test metylacyjny QIASure.

Porównanie wszystkich strategii diagnostycznych wykazało, że dla samych zmian CIN2, test QIASure charakteryzował się wyższą swoistością (83,6%) i wartością PPV (35,7%) od pozostałych metod. Czułość oraz negatywna wartość predykcyjna metylacji dla zmian CIN2 okazały się najniższe ze wszystkich porównywanych testów, odpowiednio 29,4% i 79,3%. Wielkości pól pod krzywymi ROC wszystkich metod były podobne (AUC metylacji – 0,57, AUC cytodiagnostyki - 0,55, AUC testu HPV DNA – 0,64) przy $p > 0,05$ (tabela 30).

Tabela 30. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	100 (80,5-100)	9,1 (3,0-20,0)	25,4 (15,5-37,5)	100 (47,8-100)	0,55 (0,51-0,58)	0,5731
Test HPV DNA	88,2 (63,6-98,5)	40 (27,0-54,1)	31,3 (18,7-46,3)	91,7 (73,0-99,0)	0,64 (0,54-0,74)	0,0801
Metylacja	29,4 (10,3-56,0)	83,6 (71,2-92,2)	35,7 (12,8-64,9)	79,3 (66,6-88,8)	0,57 (0,44-0,69)	0,4186
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (80,5-100)	5,5 (1,1-15,1)	24,6 (15,1-36,5)	100 (29,2-100)	0,53 (0,50-0,56)	0,7353
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (80,5-100)	9,1 (3,0-20,0)	25,4 (15,5-37,5)	100 (47,8-100)	0,55 (0,51-0,58)	0,5731
Test HPV DNA + Metylacja	88,2 (63,6-98,5)	40 (27,0-54,1)	31,3 (18,7-46,3)	91,7 (73,0-99,0)	0,64 (0,54-0,74)	0,0801

Dla policzonych oddzielnie zmian CIN3 czułość testu metylacyjnego była najniższa (77,3%) w stosunku do pozostałych strategii diagnostycznych, przy najlepszych parametrach swoistości (83,6%) i PPV (65,4%). Wartość NPV testu FAM19A4/mir124-2 (90,2%) była wyższa niż samodzielnie użytej cytodiagnostyki (83,3%), ale niższa niż metody molekularnej na DNA HPV i testów podwójnych: cytodiagnostyka + test HPV DNA i cytodiagnostyka + metylacja (NPV wymienionych strategii - 100%) (tabela 31).

Najlepszą przydatność diagnostyczną oszacowano dla pojedynczego testu metylacyjnego, pole pod krzywą ROC (AUC) wyniosło 0,80 ($p < 0,0001$). AUC cytodiagnostyki i testu HPV DNA obliczono odpowiednio na 0,52 i 0,70 (tabela 31).

Tabela 31. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.

Metoda diagnostyczna	Czułość [%] (95% CI)	Swoistość [%] (95% CI)	PPV [%] (95% CI)	NPV [%] (95% CI)	AUC (95% CI)	p-wartość (AUC)
Cytodiagnostyka	95,5 (77,2-99,9)	9,1 (3,0-20,0)	29,6 (19,3-41,6)	83,3 (35,9-99,6)	0,52 (0,46-0,58)	0,7565
Test HPV DNA	100 (84,6-100)	40 (27,0-54,1)	40 (27,0-54,1)	100 (84,6-100)	0,70 (63,5-76,5)	0,0064
Metylacja	77,3 (54,6-92,2)	83,6 (71,2-92,2)	65,4 (44,3-82,8)	90,2 (78,6-96,7)	0,80 (0,70-0,91)	<0,0001
Cytodiagnostyka + Test HPV DNA	100 (84,6-100)	5,5 (1,1-15,1)	29,7 (19,7-41,5)	100 (29,2-100)	0,53 (0,50-0,56)	0,7098
Cytodiagnostyka + Metylacja	100 (84,6-100)	9,1 (3,0-20,0)	30,6 (20,2-42,5)	100 (47,8-100)	0,55 (0,51-0,58)	0,5351
Test HPV DNA + Metylacja	100 (84,6-100)	40 (27,0-54,1)	40 (27,0-54,1)	100 (84,6-100)	0,70 (0,64-0,77)	0,0064

6. Dyskusja

Aktualnie trwają prace nad narzędziami diagnostycznymi zapewniającymi większą precyzję w wykrywaniu klinicznie istotnej patologii szyjki macicy. Nowoczesne testy powinny cechować się wysoką czułością, swoistością oraz dodatnią i ujemną wartością predykcyjną. Ponadto dzięki obiektywizacji i automatyzacji powinny eliminować błędy jak w przypadku subiektywnej oceny cytologicznej, a także skracać czas oczekiwania na wynik. Kluczową cechą nowych strategii diagnostycznych neoplazji szyjki macicy jest zredukowanie liczby nieuzasadnionych klinicznie badań kolposkopowych. W niniejszej pracy zweryfikowano wartość diagnostyczną testu metylacyjnego FAM19A4/mir124-2 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy, a także porównano parametry diagnostyczne metylacji z metodą molekularną identyfikującą DNA HPV, cytodiagnostyką i ko-testingiem.

Programy skriningowe oparte na cytodiagnostyce przyczyniły się do obniżenia globalnej zachorowalności i śmiertelności z powodu raka szyjki macicy w ciągu ostatnich 70 lat. Niestety mimo wielu zalet cytodiagnostyki jako testu przesiewowego, związana jest ona z wysokim odsetkiem wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Wyniki fałszywie negatywne wiążą się z poważnymi konsekwencjami dla pacjentek, spowodowanymi brakiem wykrycia istniejącej patologii. Skala tego problemu dla zmian CIN1+ sięga nawet 40-50%^{103,104}. Mogą one wynikać z błędów na etapie pobierania, utrwalania, barwienia preparatów oraz ich interpretacji przez cytotechnika. W pracy chińskiej z 2020 roku spośród 1009 preparatów z rozpoznaniem ostatecznym CIN2+ i VaIN2+, 17,8% pacjentek miało prawidłowy wynik oceny rozmazu cytologicznego¹⁰⁵. W badaniu Gupta i wsp. dokonano ponownej oceny 463 fałszywie ujemnych wyników badań cytologicznych, z czego rozpoznano ostatecznie zmiany CIN2+ aż w 95 przypadkach¹⁰⁶.

W niniejszym badaniu wyniki fałszywie ujemne cytodiagnostyki stwierdzono w 4/98 przypadków. Dwa z nich związane były z zaawansowaną patologią szyjki macicy. W jednym przypadku rozpoznano raka płaskonabłonkowego, w drugim zmianę CIN3, która po usunięciu za pomocą leep-konizacji również okazała się rakiem płaskonabłonkowym. Obie pacjentki zostały skierowane do PPSM GPSK w Poznaniu z powodu klinicznego podejrzenia patologii pomimo prawidłowego wyniku cytologicznego. Niski odsetek wyników fałszywie ujemnych w niniejszym badaniu

wynika ze specyfiki włączonych do niego pacjentek. Do PPSM GPSK kierowane są pacjentki głównie z nieprawidłowym wynikiem oceny rozmazu cytologicznego celem przeprowadzenia pogłębionej diagnostyki. Tymczasem w populacyjnych programach skriningowych nieprawidłowe wyniki cytologiczne stanowią jedynie ok. 2-7% wszystkich ocenianych rozmazów.

Należy podkreślić, że w niniejszej analizie cytodiagnostyka wykryła 3 z 4 raków, w tym 2 raki gruczołowe i 1 rak neuroendokrynnny. Szacuje się, że u pacjentek z rozpoznaniem AIS wyniki cytologiczne są ujemne nawet w 52%, a w przypadku inwazyjnego raka gruczołowego w 24,3%, co istotnie wydłuża czas do postawienia trafnej diagnozy. Ma to niewątpliwy wpływ na szansę pacjentki na całkowite wyleczenie¹⁰⁷.

Znaczącą wadą badań cytologicznych jest duży odsetek wyników fałszywie dodatnich. W niniejszej pracy wyniósł on aż 51% (50/98) dla rozpoznań $\geq$ CIN2 wśród pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym co najmniej ASC-US. Przeważający stosunek nadrozpoznowalności cytologicznej wynika prawdopodobnie z faktu niedostatecznego poziomu oceny i jakości preparatów wykonanych poza PPSM GPSK w Poznaniu. Jak już wspomniano powyżej, do Poradni Patofizjologii Szyjki Macicy kierowane są pacjentki z całej Wielkopolski i sąsiednich województw w celu przeprowadzenia pogłębionej diagnostyki. Wśród ośrodków kierujących do PPSM są indywidualne praktyki lekarskie, gabinety ginekologiczno-położnicze działające w ramach kontraktów NFZ oraz oddziały szpitalne. Poziom oceny cytodiagnostycznej realizowanej przez te jednostki jest bardzo zróżnicowany. W przeważającej większości rozpoznania cytologiczne pochodzą z cytologii konwencjonalnej.

Z danych chińskich z 2021 roku wynika, że z 25 338 pacjentek z ASC-US, zmiany CIN2+ w histopatologii rozpoznano ostatecznie u 7,1% wszystkich badanych¹⁰⁸. W pracy porównującej parametry diagnostyczne cytologii konwencjonalnej z LBC udowodniono, że cytologia płynna charakteryzuje się mniejszą ilością wyników fałszywie dodatnich¹⁰⁹. Z kolei Sodhani i wsp. wykazali, że ASC-US nie jest klinicznie istotnym rozpoznaniem i znacząco, w większości przypadków niepotrzebnie, zwiększa ilość wykonywanych kolposkopii z biopsją. Dodatkowo wskazano, że cytologia LSIL+ wydaje się być dopuszczalnym progmem skierowań na diagnostykę pogłębioną, istotnie obniżając liczbę biopsji, przy zachowaniu wysokiej czułości testu¹¹⁰. W niniejszym

badaniu na 14 pacjentek z ASC-US, neoplazja szyjki macicy ($\geq$ CIN2) została wykryta jedynie w 1 przypadku. Według wielu analiz ASC-US jest najczęstszym rozpoznaniem wśród wszystkich nieprawidłowych rozmazów cytologicznych¹¹¹. W badaniu wykonanym przez PPSM najczęstszym rozpoznaniem cytologicznym było tymczasem LSIL, które stanowiło 38,8%. U pacjentek z LSIL+ odsetek wyników fałszywie dodatnich dla zmian $\leq$ CIN1 był również wysoki i wyniósł 48%.

Wysoki odsetek wyników fałszywie pozytywnych wpływa na obniżenie swoistości testu, a zatem zwiększenie nakładów finansowych związanych z diagnostyką pogłębioną. W niniejszej pracy swoistość cytodiagnostyki w identyfikacji $\geq$ CIN2 obliczono na zaledwie 9,1%, przy satysfakcjonującej czułości 95,3%. Wartość PPV i NPV wyniosły 45,1% i 71,4%. Podobne wyniki uzyskano w krajowym międzyośrodkowym badaniu, w którym czułość, swoistość, PPV i NPV wyniosły odpowiednio 85%, 23%, 39% i 72%⁵⁵. W dużym kohortowym badaniu POBASCAM wyodrębniono 1100 pacjentek HPV-dodatnich, u których określono czułość i swoistość cytodiagnostyki w wykrywaniu zmian CIN2+ na 66% i 81,4%, PPV i NPV odpowiednio na 87,96% i 54,5%⁵⁸.

Przetrwale zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego jest silnie przyczynowo powiązane z ryzykiem rozwoju zaawansowanej neoplazji i raka szyjki macicy. Dlatego też testy molekularne identyfikujące DNA HPV umożliwiają wykrywanie pacjentek z podwyższonym ryzykiem rozwoju CIN. Wiele prac dowodzi, że test HPV DNA cechuje się wyższą czułością, ale niższą swoistością niż cytodiagnostyka^{112–115}. W badaniach przeprowadzonych na materiale PPSM swoistość testu wykrywającego DNA 14 onkogennych typów HPV dla zmian $\geq$ CIN2, w porównaniu do cytodiagnostyki, była wyższa (40% vs. 9,1%), natomiast czułości obu testów były sobie równe i wyniosły 95,3%. Takie same zależności opublikowali Belinson i wsp., uzyskując podobną czułość obu testów – 95% dla testu HPV DNA i 94% dla badania cytologicznego, a także wyższą swoistość metody PCR niż cytodiagnostyki – odpowiednio 85% i 78%. W powyższej pracy obliczono również parametry diagnostyczne badania cytologicznego w wykrywaniu neoplazji szyjki macicy dla progu odcięcia $\geq$ ASC-US, $\geq$ LSIL i $\geq$ HSIL. Wykazano, że czułość testu w wykrywaniu zarówno CIN2+, jak i CIN3+ spadała wraz z progiem o wyższym zaawansowaniu rozpoznania cytologicznego. Swoistość cytodiagnostyki natomiast rosła odpowiednio

dla progu odcięcia $\geq$ ASC-US, $\geq$ LSIL, $\geq$ HSIL¹¹⁶. Zależności te potwierdzono w niniejszej pracy.

Swoistość testu HPV DNA w populacji kobiet włączonych do niniejszego badania dla punktu końcowego $\geq$ CIN2 wyniosła 40%, a dla $\geq$ CIN3 33,3% i w obu przypadkach była wyższa od cytodiagnostyki, chociaż nadal niesatysfakcjonująca. Na niską swoistość testu HPV DNA wpływ ma duży odsetek wyników fałszywie dodatnich spowodowanych incydentalnym zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego, zwłaszcza w młodszych grupach wiekowych. Według amerykańskich towarzystw u kobiet <30 r.ż. rekomendowane jest wykonywanie jedynie badań cytologicznych, dopiero po 30 roku życia wskazuje się na dużą rolę metody molekularnej identyfikującej DNA HPV^{68,73-75}. Taka taktyka redukuje liczbę skierowań na badania kolposkopowe i ogranicza nieuzasadnioną klinicznie diagnostykę inwazyjną u pacjentek bez neoplazji szyjki macicy. Powyższa strategia znajduje odzwierciedlenie w wynikach niniejszej pracy, gdzie swoistość testu HPV DNA dla zmian $\geq$ CIN2 u młodszych kobiet wyniosła 31,8% i była niższa niż u pacjentek $\geq$ 30 r.ż., u których obliczona została na 45,5%. Prawdziwość wyników dodatnich potwierdza oszacowana wartość PPV – 44,4% u kobiet <30 r.ż. i 61,7% u kobiet $\geq$ 30 r.ż. Analiza swoistości testu HPV DNA dla zmian $\geq$ CIN3 nie różniła się ze względu na wiek i wyniosła odpowiednio 33,3% w obu grupach wiekowych.

W dużym badaniu kohortowym opublikowanym przez Rijkaarta i wsp., analizującym strategię triage wykrywania neoplazji szyjki macicy, wykazano wyższą czułość, ale niższą swoistość testu podwójnego składającego się z cytodiagnostyki i testu HPV DNA, w porównaniu do obu tych metod użytych samodzielnie. Dla wykrycia zmian CIN2+ czułość cytodiagnostyki wyniosła 62,7%, swoistość 89,1%, natomiast testu na DNA HPV odpowiednio 77,8% i 56,4%. Połączenie obu metod razem znacznie zwiększyło czułość diagnostyczną - 95%, ponadto podwyższyło wartość NPV do 97,6%⁵⁷. W niniejszej pracy ukazano tożsame trendy. Warto zauważyć, że czułość oraz negatywna wartość predykcyjna ko-testingu składającego się z cytodiagnostyki i testu na DNA HPV obliczona na potrzeby niniejszego badania, dla zmian $\geq$ CIN2 i $\geq$ CIN3 we wszystkich grupach wiekowych wyniosła 100%.

Negatywna wartość predykcyjna testu molekularnego bliska 100% oznacza wysoką prawdziwość wyników ujemnych, a tym samym bardzo niskie ryzyko rozwoju

zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy w ciągu najbliższych lat u kobiet HPV-negatywnych. Randomizowane badanie opublikowane w 2018 roku obejmujące ponad 16 tys. pacjentek wykazało, że przy ujemnym wyniku testu na DNA HPV częstość występowania zmian CIN3+ po 2 latach jest znacznie niższa (1,4/1000) niż przy prawidłowym wyniku cytologii (5,4/1000)¹¹⁷. W 2019 roku Gilham i wsp. przedstawili wyniki badania kohortowego (n=24,496), w którym udowodniono, że ujemny wynik testu na DNA HPV daje skumulowane ryzyko zachorowania na $\geq$ CIN3 po 10 latach (0,31%) porównywalne do ryzyka zachorowania przy prawidłowym wyniku badania cytologicznego już po 3 latach (0,30%)¹¹⁸. Wprowadzenie metody molekularnej do programów skriningowych pozwala na wydłużenie interwałów między badaniami, mając na uwadze czas jaki upływa od zakażenia HPV do rozwoju patologii szyjki macicy.

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w populacji włączonej do niniejszej pracy, test HPV DNA wykrył 100% zmian CIN3 oraz wszystkie 4 raki szyjki macicy – 1 rak płaskonabłonkowy, 2 raki gruczolowe oraz 1 rak neuroendokrynnny, co czyni go najczulszym samodzielnie użytym testem porównywanym w niniejszej analizie. Niestety zarówno test na obecność DNA HPV, jak i cytodiagnostyka nie są pozbawione wysokiego odsetka wyników fałszywie dodatnich, co generuje dużą ilość wykonywanych badań inwazyjnych oraz ryzyko i nakłady finansowe z nimi związane.

Poszukiwania metody diagnostycznej, która koncentrowałaby się na redukcji nieuzasadnionej klinicznie diagnostyki pogłębionej, doprowadziły do badań nad molekularnymi testami metylacyjnymi opartymi o hipermetylację promotorów genów supresorowych. Aktualnie trwają prace nad około dwudziestoma różnymi genami biomarkerów metylacji, które korelują z zaawansowaną neoplazją i rakiem szyjki macicy. Określenie spójnych parametrów diagnostycznych testów metylacyjnych nadal nie jest proste. Badania nad wykorzystaniem metylacji wybranych genów w procesie wykrywania patologii szyjki macicy są w dużej mierze niespójne i nieporównywalne. Różnią się lokalizacją badanych genów, metodologią badań czy przyjętymi progami nasilenia metylacji^{85,119}. Dla przykładu analiza metylacji DNA czterech wybranych genów w populacji koreańskiej wykazała wyższą czułość i niższą swoistość w wykrywaniu raka szyjki macicy w przypadku genów ADCYAP1 i PAX1 w porównaniu do genów MAL i CADM1. Ponadto ADCYAP1 i PAX1 cechowały się

większą przydatnością niż MAL i CADM1 (pole pod krzywą ROC odpowiednio 0,911 i 0,916 vs. 0,854 i 0,756)¹²⁰.

W opublikowanej w 2019 roku metaanalizie 43 wybranych badań oceniono parametry diagnostyczne metody metylacji u kobiet ze śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy. Analizie poddano różne testy genowe. Przy standaryzowanej swoistości na poziomie 70%, oszacowano łączną czułość dla zmian CIN2+ na 68,6%, dla zmian CIN3+ na 71,1%. W badaniach porównujących metylację DNA z cytodiagnostyką, określono niższą czułość i wyższą swoistość testów metylacyjnych dla zmian CIN2+ i CIN3+. W pracach, w których oceniano metodę metylacyjną w porównaniu do testów na DNA HPV HR, metylacja okazała się znacznie mniej czuła i dużo bardziej swoista w wykrywaniu zmian CIN2+¹²¹.

Głównym celem niniejszej pracy była analiza parametrów diagnostycznych testu metylacyjnego – QIASure, oceniającego hipermetylację promotorów genów supresorowych FAM19A4/mir124-2, w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy, a także porównanie tejże metody z cytodiagnostyką, testem na DNA HPV i ko-testingiem. Czułość multipleksowego testu FAM19A4/mir124-2 wykazana w ramach badań przeprowadzonych na materiale PPSM dla zmian $\geq$ CIN2 wyniosła 60,5%, co w porównaniu do cytodiagnostyki i testu HPV DNA było niższą wartością (obie metody 95,3%). Test metylacyjny dla zmian $\geq$ CIN2 charakteryzował się natomiast najwyższą swoistością ze wszystkich metod – 83,6%. Najwyższa swoistość testu metylacyjnego jest konsekwencją najniższego odsetka wyników fałszywie dodatnich, jedynie 9,2% (9/98). Podobne tendencje uzyskano dla zmian $\geq$ CIN3, gdzie zarówno czułość, jak i swoistość testu QIASure obliczono na około 80%. Wysoka swoistość testu pozwala na redukcję nieuzasadnionych klinicznie skierowań na kolposkopię, ograniczając przy tym ryzyko i stres pacjentek związany z diagnostyką inwazyjną.

Wartość PPV metylacji w niniejszym badaniu była najwyższa ze wszystkich metod i dla zmian $\geq$ CIN2 została oszacowana na 74,3%, a dla $\geq$ CIN3 na 60%, co świadczy o wysokiej precyzji testu. Negatywna wartość predykcyjna okazała się najkorzystniejsza w przypadku metody identyfikującej DNA HPV, dla zmian $\geq$ CIN3 wyniosła ona 100%, testu metylacyjnego 92,1%, cytologii zaś 71,4%. NPV obu metod molekularnych dla rozpoznania raka osiągnęła wynik 100%. Wysoka wartość NPV daje

dużą pewność braku choroby i może pozwolić na wydłużenie interwałów między kolejnymi badaniami u osób z negatywnym wynikiem testu QIASure.

Analizie poddano także parametry diagnostyczne policzone osobno dla zmian CIN2, CIN3 i raka szyjki macicy. Czulość testu FAM19A4/mir124-2 wyniosła dla zmian CIN2 29,4%, dla CIN3 77,3%, a dla raka 100%. Na podstawie wyników można wywnioskować, że czulość testu metylacyjnego rośnie wraz z zaawansowaniem rozpoznania patologii szyjki macicy.

W wieloośrodkowym, retrospektywnym badaniu, zaprojektowanym w ramach VALID-SCREEN UE Horyzont 2020, poddano ocenie przydatność kliniczną testu QIASure. Do badania włączono 2384 pacjentki z dodatnim testem w kierunku DNA HPV, z 4 krajów: Szkocji, Danii, Słowenii i Holandii. Wyniki uzyskane w analizie są zbieżne z pochodzącymi z niniejszej pracy. Łączna czulość testu FAM19A4/mir124-2 dla raka szyjki macicy wyniosła 95%, dla zmian CIN3 77,2%, a dla CIN2 wahała się między ośrodkami od 33,3% do 61,1%. Swoistość metody metylacyjnej została oceniona na 78,3%. Wartość PPV dla zmian $\geq$ CIN2 osiągnęła wynik 36,7%, a dla $\geq$ CIN3 28,3%. Parametr NPV dla raka szyjki macicy wyniósł 99,9%, dla zmian $\geq$ CIN3 96,9%, a dla $\geq$ CIN2 93%. Każda pacjentka została ponadto poddana badaniu cytologicznemu LBC. W porównaniu do metylacji, czulość cytologii w wykrywaniu zmian CIN3 była niższa – przy progu rozpoznania ASC-US wyniosła 75%, przy LSIL 68,2%. Swoistość cytologii $\geq$ ASC-US była niższa, a $\geq$ LSIL wyższa w stosunku do testu FAM19A4/mir124-2 i wyniosła odpowiednio 70,1% i 85,2%¹²².

W badaniu przeprowadzonym w 2014 roku w 11 ośrodkach na Tajwanie porównano metodę metylacji PAX1 i SOX1 z cytodiagnostyką i testem na DNA HPV oraz oceniono parametry diagnostyczne metod połączonych. Analizą objęto 676 pacjentek, w całej grupie częstość identyfikacji metylacji obu genów wzrastała wraz z nasileniem neoplazji. Na podstawie danych liczbowych zawartych w tabeli 3 zamieszczonej w pracy można zauważyć, że dla zmian CIN3+ najwyższą czulością pojedynczego testu charakteryzowało się badanie cytologiczne i test HPV DNA (91% i 89%). Najkorzystniejszą swoistość natomiast osiągnął test metylacyjny PAX1 oraz cytodiagnostyka (91% i 90%). Co ciekawe, najlepszą czulość testu podwójnego wyliczono dla metody składającej się z cytologii i testu na DNA HPV (97%), a najwyższą swoistość dla testu HPV DNA połączonego z metylacją PAX1

(96%). Wielkość pola pod krzywą ROC (AUC) o najwyższej wartości wśród wszystkich strategii diagnostycznych obliczono dla cytodiagnostyki zastosowanej samodzielnie (0,91). Należy podkreślić, że do badania zostały włączone pacjentki z wynikiem cytologicznym $\geq$ LSIL, co znacznie poprawia parametry diagnostyczne tejże metody¹²³.

W 2014 roku Verhoef opublikował wraz z zespołem analizę, w której porównano multipleksowy test metylacyjny MAL/mir124-2 wykonywany samodzielnie przez pacjentki, z badaniem cytologicznym pobieranym przez lekarzy. Czulość obu metod dla zmian CIN2+ była porównywalna (cytologia – 70,8%, metylacja – 70,5%), dla zmian CIN3+ wyższa w przypadku cytodiagnostyki (74,8%) niż testu metylacyjnego (67,5%). Badanie dowiodło, że samodzielnie pobrany test metylacyjny stanowi obiektywną alternatywę dla badania cytologicznego, a razem z testem na DNA HPV pozwala na prowadzenie skринingu całkowicie opartego na diagnostyce molekularnej¹²⁴.

De Strooper i wsp. w 2014 roku ocenili przydatność diagnostyczną metody połączonej składającej się z testu metylacyjnego dla genów CADM1/MAL i cytodiagnostyki. Do badania włączono pacjentki HPV-dodatnie. Analiza danych wykazała, że dla zmian CIN2+ test podwójny cechował się wyższą czulością (84,5%) w porównaniu do cytologii (65,5%) i metylacji (62,1%) wykonywanych oddzielnie, przy niewiele niższej od nich swoistości: test połączony - 69,9%, cytologia – 83,5%, metylacja – 78,4%. Analogicznie wyglądały wyniki dla zmian CIN3+. Każda ze strategii triage cechowała się wysoką wartością NPV, przy czym dla testu podwójnego była ona najwyższa i dla zmian CIN2+ wyniosła 93,2%, a dla CIN3+ 96,2%¹²⁵.

Wyniki te można odnieść do badań na populacji kobiet włączonych do niniejszej pracy. Test podwójny złożony z cytodiagnostyki oraz metylacji oceniającej geny FAM19A4/mir124-2 charakteryzował się czulością 100% zarówno dla zmian $\geq$ CIN2, jak i $\geq$ CIN3, co było wyższym wynikiem niż czulości obu tych metod wykonanych oddzielnie. Niska swoistość cytodiagnostyki, spowodowana bardzo dużym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich, uzyskana w tym badaniu wpłynęła również na niską swoistość testu cytologia + metylacja. Dla zmian $\geq$ CIN2 wyniosła ona 9,1%, a dla $\geq$ CIN3 zaledwie 6,9%. Nie można zignorować kwestii ograniczenia niniejszej

pracy, o którym wspomniano wcześniej, jakim jest specyfika włączonej do badania populacji. Prawie 93% badanych stanowiły pacjentki z nieprawidłowym wynikiem cytologii, z czego 55% to wyniki fałszywie dodatnie. Fakt ten nie pozwala na uwiarygodnienie obliczeń dotyczących swoistości cytodiagnostyki, a tym samym testu połączonego z metylacją. Warto podkreślić natomiast, że wartość NPV obu metod razem osiągnęła 100%. Analiza krzywej ROC wykazała, że przydatność testu podwójnego w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 jest porównywalna z przydatnością samej cytodiagnostyki, pole pod krzywą ROC (AUC) obliczono odpowiednio, jedynie na 0,55 i 0,52. AUC równe około 0,5 oznacza brak zdolności testu do rozróżnienia między wynikami pozytywnymi a negatywnymi. Najlepszą przydatnością (AUC=0,72) charakteryzował się oddzielnie aplikowany test metylacyjny.

W opublikowanych w 2015 roku przez Verhoeffa i wsp. wynikach analizujących te same trzy strategie diagnostyczne oparte na cytodiagnostyce oraz teście metylacyjnym CADM1/MAL, w populacji pacjentek HPV-dodatnich (n=354), otrzymano tożsame trendy dotyczące parametrów diagnostycznych jak powyżej. Dla zmian CIN3+ uzyskano wyższą czułość testu podwójnego, przy znacznie niższej swoistości - odpowiednio 88,7% i 53,5%, w porównaniu do obu metod wykonanych samodzielnie. Czułość i swoistość pojedynczego testu metylacyjnego wyniosły odpowiednio 69,4% i 71,2%, cytodiagnostyki zaś 77,4% i 73,8%. Ponadto autorzy zaobserwowali wzrost częstości identyfikacji metylacji wraz z zaawansowaniem patologii szyjki macicy, w przypadku zmian CIN2 metylacja była pozytywna w 39,3%, w CIN3 w 66,1%, a w rakach szyjki macicy w 100%. Metylacja wykryła wszystkie 6 raków szyjki macicy, 2 z nich nie zostały zdiagnozowane przez badanie cytologiczne. Co ciekawe, 17 kobiet z pozytywnym wynikiem testu metylacyjnego miało negatywny wynik oceny histopatologicznej biopsji tkankowej $\leq$ CIN1¹²⁶.

W niniejszej pracy wśród kobiet z wynikiem biopsji $\leq$ CIN1 (biopsja bez cech neoplazji, CIN1) test metylacyjny QIASure był dodatni w 9/55 przypadków. Każda z tych 9 pacjentek miała ponadto pozytywny wynik testu na DNA HPV. Warto zaznaczyć, że w odróżnieniu od cytodiagnostyki i kolposkopii, test metylacyjny analogicznie do testu molekularnego na DNA HPV, jest obiektywnym narzędziem diagnostycznym i daje precyzyjną informację na temat toczącego się procesu nowotworowego na szyjce macicy. Materiał do testu pobierany jest z całej tarczy i kanału szyjki macicy oraz ze sklepień pochwy. Wynik biopsji natomiast może być

falszywie ujemny, co jest konsekwencją subiektywnej oceny kolposkopowej i potencjalnie błędnie pobranego materiału diagnostycznego. Na szyjce macicy mogą występować jednocześnie zmiany o różnym stopniu nasilenia i czasie trwania. Badania van Baarsa i wsp. z 2016 roku na 178 biopsjach pobranych od 65 pacjentek z różnymi stopniami neoplazji potwierdziły tę hipotezę. Każdy materiał biopsyjny został poddany analizie histopatologicznej oraz metylacyjnej. Autorzy jednoznacznie wskazują, że częstość identyfikacji metylacji CADM1/MAL wzrasta wraz z zaawansowaniem zmiany na szyjce macicy i jest specyficzna dla tej zmiany. Większość kobiet z wielokrotnymi biopsjami, w materiale z rozpoznaniem CIN2/3 miało pozytywną metylację, a w biopsji bez cech neoplazji wynik testu metylacyjnego był ujemny¹²⁷.

Wzrost stopnia korelacji między dodatnią metylacją a zaawansowaniem neoplazji szyjki macicy potwierdza także publikacja De Strooper i wsp. z 2014 roku, w której oceniono skuteczność kliniczną testu FAM19A4. U pacjentek ze zmianą CIN2 obliczono odsetek pozytywnych wyników metylacji na 63,2%, ze zmianą CIN3 oraz z rakiem szyjki macicy odpowiednio na 73,3% i 100%. Ponadto autorzy zaobserwowali wzrost proporcjonalny stopnia korelacji pozytywnej metylacji do czasu trwania zmiany. Metylacja uzyskała wynik dodatni dla wszystkich raków szyjki macicy (n=22) oraz późnych zmian CIN2/3 trwających co najmniej 5 lat, podczas gdy dla wczesnych zmian CIN2/3 metylacja była pozytywna w 42,1% przypadków⁹⁵. Kontynuując prace nad metodą metylacyjną, De Strooper i wsp. przedstawili w tym samym roku wyniki kolejnego badania, oceniającego przydatność testu CADM1, MAL i mir124-2 w wykrywaniu raka szyjki macicy i endometrium. Potwierdzono, że test metylacyjny wykrywa wszystkie raki szyjki macicy (n=79) bez względu na typ histologiczny, a także większość - 76% (16/21) raków endometrium⁹⁴.

Niedawno opublikowano wyniki wieloośrodkowego badania zaprojektowanego w ramach VALID-SCREEN (666800), finansowanego przez program UE Horyzont 2020, analizującego metylację genów FAM19A4/mir124-2 w wykrywaniu inwazyjnego raka szyjki macicy. Materiał pobrano od 519 pacjentek z rakiem szyjki macicy pochodzących z 25 krajów. Do analizy metylacji użyto testu PCR QIASure. Metylacja została potwierdzona w 98,3% przypadków raka szyjki macicy (510/519), w tym w rakach HPV-ujemnych oraz rzadkich typach histologicznych. Dodatni wynik metylacji uzyskano u pacjentek z rakiem płaskonabłonkowym (313/318), gruczolakorakiem (121/123), rakiem gruczołowopłaskonabłonkowym (42/42),

z rzadkimi typami raka (30/32), w tym z rakiem jasnokomórkowym (14/14), rakiem neuroendokrynnym (12/13), gruczolakorakiem z elementami raka neuroendokrynnego w utkaniu histopatologicznym (1/1), gruczolakorakiem śluzowym żołądka (2/2), gruczolakorakiem śluzowym niesklasyfikowanym (not otherwise specified – NOS) (1/1) oraz z nieokreślonymi histologicznie typami raka (4/4). Pozytywność testu dla obu genów supresorowych wykazano w 79% przypadków (n=410), dodatni wynik dla pojedynczego genu FAM19A4 uzyskano w 13,9% (n=72), a dla mir124-2 w 5,4% (n=28)¹²⁸.

Wyniki dotyczące wykrywania raka szyjki macicy przy pomocy metody metylacji uzyskane w ramach niniejszego badania są zgodne z przytoczonymi doniesieniami. Test metylacyjny QIASure wykrył wszystkie 4 raki szyjki macicy, w tym 1 rak płaskonabłonkowy, 2 raki gruczołowe oraz 1 rak neuroendokrynnym. Ponadto uzyskano dodatnią metylację u pacjentki z wynikiem biopsji CIN3, u której po leczeniu leep-konizacją, ostatecznym rozpoznaniem również był rak płaskonabłonkowy. Dwie pacjentki z rakiem szyjki macicy otrzymały wynik metylacji pozytywny dla obu genów FAM19A4 i mir124-2, dwie natomiast jedynie dla genu FAM19A4.

W 2018 roku Verlaet i wsp. przedstawili wyniki analizy wzorów metylacji DNA 12 genów na modelu in vitro oraz przy użyciu materiału pobranego od pacjentek. W obu modelach wykazano znaczący wzrost poziomu metylacji wszystkich 12 genów wraz zaawansowaniem choroby, wskazując na wczesny początek metylacji w zmianach CIN2/3 i najwyższy poziom w rakach szyjki macicy¹²⁹.

W niniejszej pracy obliczono iloraz szans (OR) zachorowania na neoplazję szyjki macicy u kobiet z pozytywnym wynikiem metylacji. Iloraz szans na wystąpienie zmian CIN2 u pacjentek z dodatnią metylacją wyniósł 2,13 (95% CI: 0,60–7,54) w porównaniu do braku istotnej patologii szyjki macicy - $\leq$ CIN1. OR wystąpienia zmian CIN3 dla kobiet z dodatnim wynikiem testu QIASure w stosunku do wystąpienia zmian niższych niż CIN1, oszacowano na 17,38 (95% CI: 5,10 – 59,25), a zmian $\geq$ CIN3 na 21,47 (95% CI: 6,41–71,91). Ponadto wykazano istotny statystycznie wzrost obserwowanych przypadków wystąpienia dodatniej metylacji wraz z zaawansowaniem stwierdzonego rozpoznania histopatologicznego.

W metaanalizie opracowanej w 2019 roku przez Kelly i wsp. wykazano zwiększone ryzyko dodatniej metylacji u kobiet ze zmianą CIN2 w stosunku do kobiet

ze zmianą $\leq$ CIN1, surowy iloraz szans (crude odds ratio - cOR) wyniósł 2,83 (95% CI: 2,01–4,00). Ryzyko to wzrastało wraz zaawansowaniem neoplazji, u kobiet ze zmianą CIN3, w porównaniu do $\leq$ CIN1, cOR wyniósł 7,92 (95% CI: 6,10–10,29), a u kobiet z rakiem szyjki macicy 32,11 (95% CI: 22,51–45,79)¹²¹. Z kolei Bu i wsp., w badaniu z 2018 roku oceniającym metylację FAM19A4 u kobiet HPV-dodatnich w populacji chińskiej (n=230), obliczyli cOR pozytywnej metylacji w grupie pacjentek ze zmianą histopatologiczną LSIL, HSIL i z rakiem szyjki macicy w stosunku do kobiet z prawidłową biopsją, odpowiednio na 4,64 (95% CI: 1,58–13,58), 10,79 (95% CI: 4,21–27,68) i 120,11 (95% CI: 33,35–432,53). Autorzy wykazali także dodatnią korelację między metylacją FAM19A4 a zakażeniem HPV16/18, które występowało także istotnie częściej w porównaniu do zakażenia HPV 12 innych typów wysokiego ryzyka (68,81% vs. 30,19%). W badaniu porównano ponadto przydatność diagnostyczną metylacji, cytodiagnostyki, genotypowania HPV16/18 oraz testu połączonego z metylacji i genotypowania HPV. Czułość testu FAM19A4 w wykrywaniu $\geq$ HSIL była niższa niż cytodiagnostyki i testu podwójnego, odpowiednio 75,42%, 83,05% i 86,44% przy najwyższej spośród wszystkich metod swoistości – 81,44%. Analiza krzywej ROC wykazała najlepszą przydatność w wykrywaniu zmian $\geq$ HSIL dla testu metylacyjnego użytego samodzielnie, AUC=0,81¹³⁰.

Na potrzeby niniejszej pracy dokonano obliczeń dotyczących korelacji między pozytywnym wynikiem testu metylacyjnego a zakażeniem HPV. W grupie pacjentek z dodatnią metylacją wszystkie pacjentki miały jednocześnie pozytywny wynik testu na DNA HPV, czego nie zauważono u pacjentek z ujemną metylacją (Test Chi²; p=0,000026). Rozkład wariantów dodatniego wyniku HPV był istotnie statystycznie różny w grupie pacjentek z metylacją (+) w stosunku do metylacji (-), p=0002. Natomiast nie wykazano istotnie statystycznych różnic dotyczących dominujących genotypów HPV w obu grupach.

W pracy Lin i wsp. z 2011 roku porównano metodę metylacji opartą o analizę genów PAX1, WT1, PCDH10, z testem na DNA HPV. Do badania włączono 222 pacjentki z rozpoznaniem ASC-US. Wykazano powiązanie metylacji wszystkich trzech genów z nasileniem neoplazji szyjki macicy. U kobiet z pozytywnym wynikiem metylacji iloraz szans (OR) wystąpienia zmian $\geq$ CIN3 był wyższy niż u pacjentek z dodatnim testem na DNA HPV. W zestawieniu z testem HPV DNA, metoda metylacyjna charakteryzowała się niższym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich,

a co za tym idzie mniejszą ilością skierowań na badania kolposkopowe. Metylacja natomiast cechowała się wyższym odsetkiem wyników fałszywie ujemnych w stosunku do testu na DNA HPV¹³¹.

Takie same wnioski udało się uzyskać Li i wsp. w badaniu opublikowanym w 2015 roku, w którym potwierdzono większą skuteczność metody metylacyjnej PAX1 w wykrywaniu zmian CIN2+ w porównaniu do testu na DNA HPV. Analizą objęto 463 pacjentki z ASC-US, w całej grupie wykazano wzrost stopnia korelacji metylacji wraz ze wzrostem stopnia złośliwości zmian - 0% pozytywnych wyników w prawidłowych tkankach, 8,2% w CIN1, 73,7% w CIN2, 92,3% w CIN3 i 100% w rakach szyjki macicy. Dla porównania w teście HPV DNA uzyskano wyniki bez znaczącej tendencji wzrostowej, odpowiednio 17,2%, 60,2%, 57,9%, 69,2% i 100%. Czułość i swoistość testu PAX1 dla wykrycia zmian CIN2+ obliczono na 82,4% i 95,6%, pole pod krzywą ROC wyniosło 0,89, PPV, NPV i dokładność testu odpowiednio 59,6%, 98,6% i 94,6%. Wszystkie powyższe parametry diagnostyczne opisane dla metylacji były wyższe niż metody identyfikującej DNA HPV. Autorzy potwierdzili, iż segregacja pacjentek z ASC-US przy pomocy testu metylacyjnego pozwala na wykluczenie zmian o niskim stopniu złośliwości i ograniczenie wykonywanych badań kolposkopowych¹³².

W 2015 roku Xu i wsp. opublikowali pracę analizującą przydatność metod molekularnych – metylacji PAX1 i testu na DNA HPV, w wykrywaniu raka szyjki macicy (n=121). Pozytywny wynik PAX1 potwierdzono we wszystkich przypadkach raka, w 44% zmian CIN2/3 i 9% zmian CIN1, w tkankach prawidłowych nie wykazano dodatkowej metylacji. Dla porównania test identyfikujący DNA HPV był pozytywny w 92% przypadków raka, 91% CIN2/3, 81% CIN1 i 17% prawidłowych biopsji. Na tej podstawie udowodniono lepszą użyteczność metody metylacyjnej w różnicowaniu raka i zaawansowanej neoplazji szyjki macicy od neoplazji niskiego stopnia i prawidłowej błony śluzowej. Pole pod krzywą ROC (AUC) testu PAX1 dla rozróżnienia raka szyjki macicy od zmian $\leq$ CIN3 wyniosło 0,88, przy czułości 81% i swoistości 93%¹³³.

De Strooper i wsp. opublikowali w 2016 roku wyniki analizy użyteczności testu FAM19A4/mir124-2 pobieranego samodzielnie przez pacjentki, w wykrywaniu zmian CIN3+. Uzyskano satysfakcjonujące parametry diagnostyczne wszystkich zestawów testowych niezależnie od narzędzia użytego do pobrania próbek. Połączenie metody

metylacji z genotypowaniem HPV 16/18 zwiększało znacząco czułość testu, ale zmniejszało jego swoistość, pozwalając jednak na całkowicie samodzielne wykonanie całej diagnostyki skriningowej przez pacjentki¹³⁴. Badanie na samodzielnie pobranych próbkach przeprowadzili także Hesselink i wsp. w 2014 roku. W oparciu o analizę ludzkich genów β -aktyny uznano, że 355 z 377 próbek zawierało materiał o odpowiedniej ilości DNA i jakości wymaganej do testów metylacyjnych PCR – CADM1, MAL i mir124-2. W pracy porównano kombinacje bi-markerów metylacyjnych. Dla zestawu MAL/mir124-2 uzyskano najlepszą moc diagnostyczną, ponadto wyższą czułość niż dla genotypowania HPV 16/18. Czułość testu metylacyjnego MAL/mir124-2 dla zmian co najmniej CIN3 wzrastała wraz z wiekiem pacjentek, przy malejącej swoistości¹³⁵. W pracy van Baarsa i wsp. z 2016 roku również zauważono powiązanie metylacji z wiekiem. Mianowicie pacjentki ze zmianą CIN2+ i dodatnim wynikiem testu metylacyjnego były istotnie statystycznie starsze niż pacjentki z ujemną metylacją (średnia wieku 42 vs. 30). Dodatkowo stopień korelacji pozytywnej metylacji CADM1 i MAL wzrastał wraz z wiekiem¹²⁷.

Badanie COMETH opublikowane w 2016 roku przez Luttmmer i wsp. objęło 508 kobiet z dodatnim wynikiem testu identyfikującego DNA HPV. W pracy porównano różne strategie skriningowe oparte na osobnym teście metylacyjnym FAM19A4, cytodiagnostyce, genotypowaniu HPV 16/18 oraz testach podwójnych w różnej konfiguracji. Analizując dane z tabeli 1 zamieszczonej w publikacji można stwierdzić, że najwyższą czułość dla zmian $\geq$ CIN3 uzyskano dla testu połączonego; metylacja + cytologia – 94,4%. Niewiele niższą czułość wykazano również dla testów połączonych; metylacja + genotypowanie HPV oraz cytologia + genotypowanie HPV – oba 92,2%. Maksymalną swoistość wśród wszystkich strategii diagnostycznych obliczono dla metylacji użytej samodzielnie – 71,1%. W pracy wykazano dodatnią korelację między czułością i swoistością metylacji FAM19A4 a wiekiem pacjentek. U kobiet powyżej 30 roku życia czułość metylacji dla zmian co najmniej CIN3 wyniosła 88,3% i była wyższa niż czułość cytodiagnostyki i genotypowania HPV, odpowiednio 85% i 70%. W tej grupie wiekowej osiągnięto znacznie wyższą swoistość (62,1%) testu metylacyjnego w porównaniu do pozostałych metod użytych samodzielnie. Z przytoczonych danych wynika, że metylacja FAM19A4 jest atrakcyjną metodą skriningową dla kobiet HPV-dodatnich po 30 roku życia¹³⁶.

Jak wynika z obliczeń przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy, porównujących wszystkie strategie skринingowe, najlepszą przydatność diagnostyczną uzyskano dla samodzielnego testu FAM19A4/mir123-2. Pole pod krzywą ROC (AUC) dla zmian $\geq$ CIN2 oszacowano na 0,72, dla zmian $\geq$ CIN3 na 0,81, a dla raka szyjki macicy na 0,84. Pojedynczy test metylacyjny charakteryzował się najwyższą swoistością ze wszystkich metod, dla zmian $\geq$ CIN2 – 83,6%, dla zmian $\geq$ CIN3 – 80,6%. Analizując zestawienie testów podwójnych maksymalną czułość, swoistość i przydatność osiągnięto dla testu połączonego; metylacja + test HPV DNA. Należy zauważyć, że czułość tego zestawu testowego jest wyższa niż czułość samej metylacji (dla zmian $\geq$ CIN3 100% vs. 80,8%), przy niższej swoistości i AUC (dla $\geq$ CIN3 33,3% vs. 80,6% i 0,67 vs. 0,81). Nie można zignorować faktu, iż test połączony; metylacja + test HPV DNA uzyskał takie same parametry diagnostyczne dla zmian $\geq$ CIN2 i $\geq$ CIN3, jak samodzielny test na DNA HPV. W populacji włączonej do niniejszego badania nie ma przypadku pacjentki z dodatnią metylacją przy jednocześnie ujemnym wyniku testu wirusowego, stąd metylacja nie podnosi wartości diagnostycznej po połączeniu z testem na DNA HPV w stosunku do samego testu identyfikującego wirusa.

Analiza korelacji między dodatnim wynikiem testu metylacyjnego QIASure a wiekiem pacjentek wykazała, że dla zmian $\geq$ CIN3 i osobno dla raka szyjki macicy, test metylacyjny ma największą przydatność ze wszystkich porównywanych strategii diagnostycznych bez względu na wiek. Ciekawą obserwacją jest fakt, iż dla zmian $\geq$ CIN2 przydatność metody metylacji u kobiet $\geq$ 30 r.ż. była nieco niższa niż testu na DNA HPV, pole pod krzywą ROC (AUC) odpowiednio 0,69 i 0,73. Natomiast u kobiet przed 30 rokiem życia dla zmian $\geq$ CIN2 analiza pola pod krzywą ROC wykazała, że test metylacyjny miał wyższą wartość AUC niż cytodiagnostyka i test HPV DNA. Powszechnie wiadomo, że u pacjentek po 30 r.ż. test identyfikujący DNA HPV jest bardziej skuteczny niż cytodiagnostyka, a u kobiet młodszych trend ten jest odwrotny. W analizowanej grupie kobiet, w przypadku metylacji nie wykazano korelacji związanej z wiekiem. Jak wynika z powyższego, metylacja powiązana jest nie tyle z wiekiem, ile z zaawansowaniem neoplazji szyjki macicy.

W 2018 roku De Strooper i wsp. opublikowali wyniki analizy post hoc dotyczącej ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy u pacjentek HPV-dodatnich (n=1040) po 14 latach od wykonania diagnostyki przesiewowej. Przy dodatnim

wyjściowym wyniku testu QIASure identyfikującym metylację FAM19A4/mir124-2, zachorowalność na raka szyjki macicy po 14 latach wyniosła 5,5%, natomiast przy nieprawidłowym wyniku badania cytologicznego 4,1%. 14-letnia skumulowana zapadalność na raka szyjki, dla kobiet z ujemnym wyjściowym wynikiem metylacji została oszacowana na 1,7%, a dla kobiet z prawidłowym wynikiem cytologii na 2,4%¹³⁷. Z kolei Dick i wsp. w 2019 roku przedstawili badanie follow-up po 14 latach, analizujące ryzyko wystąpienia zmian CIN3+ u pacjentek HPV-dodatnich (n=1025). Skumulowana 14-letnia zapadalność na zmiany co najmniej CIN3 u kobiet z pierwotnym dodatnim wynikiem testu QIASure wyniosła 39,8%, a z nieprawidłową cytologią 46,5%. Wśród kobiet z ujemnymi wyjściowymi wynikami metylacji FAM19A4/mir124-2 i cytodiagnostyki zachorowalność po 14 latach była porównywalna (16,3% vs. 15,6%)¹³⁸. Skumulowaną częstość występowania zarówno zmian CIN3+, jak i raka szyjki macicy po 14 latach od przeprowadzenia skriningu, obliczono także na potrzeby pracy Vinka i wsp. z 2021 roku (n=979). Dla kobiet z ujemną metylacją FAM19A4/mir124-2 ryzyko CIN3+ po 14 latach wyniosło tyle samo, ile dla kobiet z prawidłowym wynikiem cytologii – 12,8%. Połączenie obu testów przy negatywnym wyniku, dało niższe ryzyko – 10,9%. Skumulowana częstość występowania raka szyjki macicy przy wyjściowych ujemnych wynikach testu QIASure i cytologii była zgodna z oszacowaną w powyższej publikacji pod kierownictwem De Strooper i wyniosła odpowiednio 1,1% i 2,0%¹³⁹. Wszyscy autorzy dowiedli, że test metylacyjny jest dobrą alternatywą dla cytodiagnostyki jako triage dla kobiet HPV-dodatnich, zapewniając niskie długoterminowe ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy przy ujemnym wyniku.

W niniejszej pracy wszystkie kobiety z rakiem szyjki macicy, które miały wykonany test QIASure, zostały prawidłowo zdiagnozowane otrzymując dodatni wynik metylacji. Wartość NPV testu FAM19A4/mir124-2 wynosząca 100% dla badanej populacji informuje o tym, że pacjentki z ujemnym wynikiem testu metylacyjnego mogły być w 100% pewne braku raka szyjki macicy.

Jak opisano wcześniej, w populacji kobiet włączonych do niniejszego badania, test metylacyjny QIASure charakteryzował się najwyższą swoistością, wartością PPV i polem pod krzywą ROC (AUC) dla zmian $\geq$ CIN2 i $\geq$ CIN3, w porównaniu do testu na DNA HPV i cytodiagnostyki. Zatem 83,6% kobiet bez zmian $\geq$ CIN2 i 80,6% bez zmian $\geq$ CIN3 zostało poprawnie zdiagnozowanych otrzymując ujemny wynik

metylacji, co jest konsekwencją najniższego odsetka wyników fałszywie ujemnych – dla zmian $\geq$ CIN2 – 9,2%, a dla $\geq$ CIN3 – 14,3%. Pacjentki z pozytywnym wynikiem testu QIASure mogły być w 74,3% pewne, że mają zmianę $\geq$ CIN2. Najbardziej optymalne parametry czułości i swoistości metylacji dały najwyższy wynik AUC ze wszystkich porównywanych testów, dla zmian $\geq$ CIN2 – 0,72, $\geq$ CIN3 – 0,81, a dla raka szyjki macicy 0,84.

Na potrzeby niniejszej pracy obliczono i porównano dodatkowe parametry diagnostyczne wszystkich metod. Test FAM19A4/mir124-2 w stosunku do innych strategii cechował się najwyższym ilorazem wiarygodności wyniku dodatniego (PLR), co oznacza, że szansa na otrzymanie dodatniego wyniku metylacji przez pacjentkę rzeczywiście posiadającą zmianę $\geq$ CIN3 była 4,15 razy większa niż szansa, że pozytywny wynik otrzymałaby pacjentka ze zmianą $\leq$ CIN2. Dla porównania PLR cytodiagnostyki wyniósł 0,99, a testu HPV DNA 1,5. Najlepszą dokładność testu (ACC) wykazano również dla metody QIASure, pacjentki po wykonaniu metylacji mogły być pewne postawionej diagnozy w przypadku $\geq$ CIN2 w 73,5%, a w przypadku $\geq$ CIN3 w 80,6%. Dla zmian $\geq$ CIN2 ACC cytodiagnostyki obliczono na 46,9%, a testu HPV DNA na 64,3%, dla zmian $\geq$ CIN3 odpowiednio na 29,6% i 51%.

W 2019 roku przeprowadzono analizę w 6 ośrodkach na materiale pobranym od 1680 pacjentek, w której oceniono zgodność między- i wewnątrzlaboratoryjną testu metylacyjnego QIASure odpowiednio na 92,5% i 91,4%, co potwierdziło dużą powtarzalność testu¹⁴⁰. Z kolei Dippmann i wsp. opublikowali w 2020 roku wyniki pracy porównującej dwa testy metylacyjne - GynTect® i QIASure. W badaniu oba testy wykryły wszystkie raki szyjki macicy, a różnice w identyfikacji zmian CIN1, CIN2 i CIN3 były nieistotne statystycznie. Test QIASure cechował się jednak wyższym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich i niższą swoistością dla zmian CIN2+ i CIN3+ w porównaniu do testu GynTect®, opartego na sześciu regionach genów - ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 oraz ZNF671¹⁴¹. Poszerzenie panelu wykrywanych genów supresorowych w testach metylacyjnych mogłoby znacznie zwiększyć ich moc diagnostyczną, a przy jednoczesnej komercjalizacji ułatwiłoby wprowadzenie tejże metody do programów skriningowych.

Jak wynika z przeglądu literatury oraz z przeprowadzonej na potrzeby niniejszej pracy analizy, metoda metylacji cechuje się najlepszą przydatnością diagnostyczną

w wykrywaniu zaawansowanej neoplazji oraz raka szyjki macicy w porównaniu do badania molekularnego na obecność DNA HPV i cytodiagnostyki. Niewątpliwą zaletą testów metylacyjnych opartych na markerach epigenetycznych jest ich obiektywizm, co pozwala uniknąć błędów ludzkich takich jak w przypadku subiektywnej interpretacji cytodiagnostycznej. Wysoka swoistość testu QIASure przy zachowaniu satysfakcjonującej czułości umożliwia zredukowanie liczby nieuzasadnionych klinicznie skierowań na kolposkopię. Jest to związane z niższym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich niż w przypadku cytodiagnostyki i niespecyficznego z powodu incydentalnych infekcji wirusowych testu na DNA HPV. Nie ulega wątpliwości, że zastąpienie badań cytologicznych w selekcji pacjentek HPV-dodatnich obiektywnym testem metylacyjnym o wysokiej wartości PPV dla zmian $\geq$ CIN2, pozwoliłoby na znaczne ograniczenie kosztów związanych z diagnostyką pogłębioną. Stuprocentowa czułość metody molekularnej dla genów supresorowych FAM19A4/mir124-2 w wykrywaniu raka szyjki macicy potwierdza konieczność natychmiastowej weryfikacji histopatologicznej i ewentualnego leczenia wszystkich pacjentek z dodatnim wynikiem metylacji. Zadowalająco wysoka negatywna wartość predykcyjna argumentuje za wydłużeniem odstępów czasowych między badaniami przesiewowymi opartymi na testach metylacyjnych. Samodzielne pobranie przez pacjentki próbek na obecność hipermetylacji genów supresorowych i DNA HPV pozwala na przeprowadzenie całkowicie molekularnego badania przesiewowego o przewidywanej wysokiej frekwencji populacji docelowej. Brak konieczności wizyty w gabinecie lekarskim pozwoliłby na zmaksymalizowanie liczby chętnych kobiet do udziału w skriningu przy jednoczesnym ograniczeniu kosztochłonności badań kontrolnych. Na podstawie przytoczonych danych i dokonanych w niniejszej pracy analiz można założyć, że w bliskiej perspektywie czasowej metoda metylacyjna będzie stanowić alternatywę lub uzupełnienie dotychczasowych testów diagnozujących śródnabłonkową neoplazję i raka szyjki macicy.

7. Wnioski

7.1. Wniosek główny

1. Test metylacyjny dla genów supresorowych FAM19A4 i mir124-2 charakteryzuje się wysoką przydatnością diagnostyczną w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia oraz raka szyjki macicy.

7.2. Wnioski szczegółowe

1. Wysoka swoistość testu metylacyjnego dla genów FAM19A4 i mir124-2 przy satysfakcjonującej czułości potwierdza dużą moc diagnostyczną testu w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia oraz raka szyjki macicy.
2. Ilość dodatnich wyników testu metylacyjnego dla genów FAM19A4 i mir124-2 wzrasta wraz z zaawansowaniem stwierdzonego rozpoznania histopatologicznego: $\leq$ CIN1, CIN2, CIN3, rak szyjki macicy.
3. Pacjentki z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego mają jednocześnie pozytywny wynik testu molekularnego na DNA HPV. Nie wykazano istotnie statystycznych różnic dotyczących dominujących genotypów HPV w grupach pacjentek z dodatnim i ujemnym wynikiem testu metylacyjnego.
4. Nie zaobserwowano korelacji między częstością obserwowanych pozytywnych wyników testu metylacyjnego dla genów FAM19A4 i mir124-2 a wiekiem pacjentek.
5. Test metylacyjny dla genów FAM19A4 i mir124-2 cechuje się najwyższą swoistością, wartością PPV, dokładnością oraz przydatnością diagnostyczną w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy, w porównaniu do metody molekularnej identyfikującej DNA HPV, cytodiagnostyki oraz ko-testingu.
6. Wysokie parametry diagnostyczne testu metylacyjnego mogą pozwolić na zredukowanie liczby skierowań na diagnostykę kolposkopową, co w konsekwencji doprowadziłoby do oszczędności nakładów finansowych przeznaczonych na profilaktykę raka szyjki macicy przy zachowaniu wysokiej wykrywalności zaawansowanej neoplazji i raka szyjki macicy.

Streszczenie

Wstęp:

Programy skriningowe oparte na cytodiagnostyce i metodzie molekularnej identyfikującej DNA HPV przyczyniły się do obniżenia globalnej zachorowalności i umieralności z powodu raka szyjki macicy. Niestety, mimo wielu zalet powyższych testów przesiewowych, związane są one z wysokim odsetkiem wyników fałszywie dodatnich, generując nadmierną ilość nieuzasadnionych klinicznie skierowań na diagnostykę pogłębianą. Poszukiwania metody skriningowej, która koncentrowałaby się na redukcji liczby wykonywanych kolposkopii, doprowadziły do badań nad molekularnymi testami metylacyjnymi opartymi o hipermetylację promotorów genów supresorowych.

Cele:

Celem pracy była analiza przydatności diagnostycznej testu metylacyjnego dla genów supresorowych FAM19A4 i mir124-2 w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy, a także porównanie tejże metody z metodą molekularną identyfikującą DNA HPV, cytodiagnostyką oraz ko-testingiem. Ponadto do zadań niniejszego badania należało określenie korelacji między wykrytym procesem metylacji a zaawansowaniem rozpoznanej patologii szyjki macicy, genotypami HPV oraz wiekiem pacjentek.

Material i metoda:

Do badania włączono 98 kobiet między 18 a 69 r.ż. z nieprawidłowym wynikiem cytologicznym lub klinicznym podejrzeniem patologii szyjki macicy. Badania prowadzone były prospektywnie od marca 2019 do lutego 2021 roku w Poradni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Wszystkie pacjentki miały wykonany jakościowy test molekularny (Cobas® 4800 identyfikujący DNA 14 typów HPV HR z genotypowaniem HPV 16/18) oraz multipleksowy test metylacyjny QIASure dla genów supresorowych FAM19A4/mir124-2. Ponadto każda pacjentka miała wykonaną kolposkopię z biopsją tarczy szyjki macicy oraz łyżeczkowanie kanału szyjki macicy. Pacjentki, które nie posiadały wyniku cytologii albo których wynik cytologiczny wymagał weryfikacji, miały pobrany wymaz cytologiczny na podłoże płynne. Analiz statystycznych dokonano przy pomocy pakietu statystycznego PQStat Software 1.8.2.

Wyniki:

Czułość testu metylacyjnego dla genów supresorowych FAM19A4/mir124-2 w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 wyniosła 60,5%, $\geq$ CIN3 - 80,8%, a raka szyjki macicy - 100%. Swoistość metylacji potwierdzająca brak rozpoznania $\geq$ CIN2 obliczono na 83,6%. Dla zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy wartość PPV wyniosła odpowiednio 74,3%, 60% i 11,4%, a NPV odpowiednio 73%, 92,1% i 100%. Dokładność (ACC) testu FAM19A4/mir124-2 dla rozpoznania $\geq$ CIN3 została oszacowana na 80,6%.

Pole pod krzywą ROC (AUC) testu metylacyjnego wyniosło dla zmian $\geq$ CIN3 0,81 (95% CI; 0,72-0,90), a dla raka szyjki macicy 0,84 (95% CI; 0,79-0,88), co potwierdziło dużą moc diagnostyczną testu w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji dużego stopnia oraz raka szyjki macicy.

Test metylacyjny cechował się najwyższą swoistością, wartością PPV, dokładnością (ACC) oraz przydatnością diagnostyczną (pole pod krzywą ROC – AUC) w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy w porównaniu do testu na DNA HPV, cytodiagnostyki oraz ko-testingu.

Wykazano istotny wzrost ilości dodatnich wyników testu metylacyjnego wraz z zaawansowaniem stwierdzonego rozpoznania histopatologicznego: $\leq$ CIN1, CIN2, CIN3, rak szyjki macicy.

Nie wykazano istotnej korelacji między pozytywnym wynikiem testu metylacyjnego a genotypami HPV oraz wiekiem pacjentek włączonych do badania.

Wnioski:

Test metylacyjny FAM19A4/mir124-2 charakteryzuje się wysoką przydatnością diagnostyczną w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia oraz raka szyjki macicy. Ilość dodatnich wyników testu metylacyjnego wzrasta wraz z zaawansowaniem stwierdzonego rozpoznania histopatologicznego. Test FAM19A4/mir124-2 cechuje się najwyższą swoistością, wartością PPV, dokładnością oraz przydatnością diagnostyczną w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 i raka szyjki macicy w porównaniu do metody molekularnej identyfikującej DNA HPV, cytodiagnostyki oraz ko-testingu. Wysokie parametry diagnostyczne testu metylacyjnego mogą pozwolić na zredukowanie liczby skierowań na diagnostykę kolposkopową, co w konsekwencji doprowadziłoby do oszczędności nakładów finansowych przeznaczonych na profilaktykę raka szyjki macicy przy zachowaniu wysokiej wykrywalności zaawansowanej neoplazji i raka szyjki macicy.

Abstract

Background:

Screening programmes based on cytology and molecular methods of HPV DNA identification have contributed to the decreased cervical cancer incidence and mortality worldwide. Unfortunately, despite the many advantages of these screening tests, they are associated with high percentages of false positive results, which generates an excessive number of clinically unjustified referrals for more extensive evaluation. The search for a screening method that would allow to reduce the number of unnecessary colposcopy examinations has prompted researchers to investigate methylation assays that detect hypermethylation of tumour suppressor gene promoters.

Aims:

The aims of this study were to assess the diagnostic usefulness of a methylation assay for the tumour suppressor genes FAM19A4 and miR124-2 in detecting cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma and to compare this method with a molecular method of HPV DNA identification, cytology and co-testing. This study was also aimed to determine the correlations between the identified methylation process and the severity of the cervical pathology identified, the HPV genotypes and the patient age.

Material and methods:

A total of 98 women aged between 18 and 69 years with an abnormal cytology result or a clinically suspected cervical pathology were included in the study. This prospective study was conducted from March 2019 to February 2021 at the Cervical Pathophysiology Clinic, Gynecology and Obstetrics Clinical Hospital, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland.

All the patients had a qualitative molecular assay done (Cobas® 4800 identifying the DNA of 14 high-risk HPV types along with HPV 16/18 genotyping) and a multiplex methylation assay, QIASure, for the tumour suppressor genes FAM19A4/mir124-2. Each patient also underwent colposcopy with ectocervical biopsy and endocervical curettage. Patients with no cytology results or with cytology results requiring verification underwent sampling for liquid-based cytology. Statistical analyses were carried out using the statistical PQStat Software 1.8.2.

Results:

The sensitivity of the FAM19A4/mir124-2 methylation assay for the detection of $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 and cervical carcinoma was 60.5%, 80.8% and 100%, respectively. The specificity of methylation confirming the absence of $\geq$ CIN2 was calculated at 83.6%. For $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 and cervical carcinoma, PPV values were 74.3%, 60% and 11.4%, respectively, and NPV values were 73%, 92.1% and 100%, respectively. The accuracy of the FAM19A4/mir124-2 methylation assay for $\geq$ CIN3 was estimated at 80.6%.

The area under the ROC (AUC) for the methylation assay was 0.81 (95% CI: 0.72–0.90) for $\geq$ CIN3, and 0.84 (95% CI: 0.79–0.88) for cervical carcinoma, which confirms the high diagnostic power of the assay for detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma.

The methylation assay was characterised by the highest specificity, PPV, accuracy and diagnostic usefulness (AUC) for the detection of $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 and cervical carcinoma compared to HPV DNA testing, cytology and co-testing.

A significant increase in the number of positive results of the methylation assay was demonstrated along with the severity of the pathological diagnosis: $\leq$ CIN1, CIN2, CIN3, cervical carcinoma.

No significant correlation was demonstrated between a positive result of the methylation assay on the one hand and the HPV genotypes and age of the patients included in the study on the other hand.

Conclusions:

The FAM19A4/mir124-2 methylation assay is characterised by a high diagnostic usefulness for detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. The number of positive results of the methylation assay increases with the severity of the pathological diagnosis. The FAM19A4/mir124-2 methylation assay is characterised by the highest specificity, PPV, accuracy and diagnostic usefulness for the detection of $\geq$ CIN2, $\geq$ CIN3 and cervical carcinoma compared to the molecular method identifying HPV DNA, cytology and co-testing. The high diagnostic parameters of the methylation assay may allow for a reduction in the number of referrals for colposcopy examinations, which would consequently lead to a decreased expenditure on the prevention of cervical cancer, while preserving the high detectability of advanced cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma.

Wykaz rycin

Rycina 1. Szacowana zapadalność na raka szyjki macicy na świecie w 2020 roku; ASR/100 000 kobiet (GLOBOCAN/IARC 2020)	11
Rycina 2. Szacowana umieralność na raka szyjki macicy na świecie w 2020 roku; ASR/100 000 kobiet (GLOBOCAN/IARC 2020)	11
Rycina 3. Zachorowalność na raka szyjki macicy w Polsce w 2018 roku; ASR/100 000 kobiet (KRN 2018)	18
Rycina 4. Umieralność na raka szyjki macicy w Polsce w 2018 roku; ASR/100 000 kobiet (KRN 2018)	18
Rycina 5. Mapa analizy metylacji wysp CpG w próbkach pobranych z szyjki macicy (n=54 próbki prawidłowe; 50 CIN1; 40 CIN2; 42 CIN3; 270 rak inwazyjny)	44
Rycina 6. Konwersja wodorosiarczynem matrycy DNA. Zmetylowana cytozyna w pozycji 5' utrzymana w stanie niezmienionym, pozostałe niezmetylowane cytozyny przekształcone do uracylu.....	51

Wykaz wykresów

Wykres 1. Szacowana zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy w Europie w 2020 roku; ASR/100 000 kobiet (ECIS 2020).....	12
Wykres 2. Trendy czasowe zachorowalności na raka szyjki macicy w Polsce w latach 1999-2018; współczynnik standaryzowany wiekiem na 100 000 kobiet (KRN 2018)..	15
Wykres 3. Trendy czasowe umieralności z powodu raka szyjki macicy w Polsce w latach 1999-2018; współczynnik standaryzowany wiekiem na 100 000 kobiet (KRN 2018).....	16
Wykres 4. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych w całej populacji pacjentek włączonych do badania (n=98).....	59
Wykres 5. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych w grupie badanej $\geq$ CIN2 (n=43).....	60
Wykres 6. Rozkład procentowy rozpoznań histopatologicznych w grupie pacjentek <30 r.ż. i $\geq$ 30 r.ż.....	61
Wykres 7. Rozkład procentowy wyników cytologicznych w całej populacji włączonej do badania (n=98).....	62
Wykres 8. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych wśród pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego (n=35).	63
Wykres 9. Wykazanie wzrostu obserwowanych przypadków wystąpienia dodatniej metylacji w zależności od stwierdzonego stanu histologicznego	65
Wykres 10. Wykres krzywych ROC dla testu metylacyjnego zastosowanego w celu wykrycia: A. osobno przypadków CIN2, B. osobno przypadków CIN3, C. osobno przypadków raka szyjki macicy.....	66
Wykres 11. Wykres krzywych ROC dla testu metylacyjnego zastosowanego w celu wykrycia A. zmian $\geq$ CIN2, B. zmian $\geq$ CIN3, C. raka szyjki macicy.....	67
Wykres 12. Porównanie czułości, swoistości i dokładności (ACC) strategii diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2.....	72
Wykres 13. A. Wykresy krzywych ROC: dla cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych zastosowanych w celu wykrycia zmian $\geq$ CIN2; B. Porównania wielkości pola pod krzywą ROC (AUC) testu metylacyjnego z polami pod krzywymi ROC (AUC) pozostałych strategii diagnostycznych zastosowanych w celu wykrycia zmian $\geq$ CIN2	74
Wykres 14. Porównanie czułości, swoistości i dokładności (ACC) strategii diagnostycznych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3.....	77
Wykres 15. A. Wykresy krzywych ROC: dla cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych zastosowanych w celu wykrycia zmian $\geq$ CIN3; B. Porównania wielkości pola pod krzywą ROC (AUC) testu metylacyjnego	

z polami pod krzywymi ROC (AUC) pozostałych strategii diagnostycznych zastosowanych w celu wykrycia zmian $\geq$ CIN3 79

Wykres 16. Porównanie czułości, swoistości i dokładności (ACC) strategii diagnostycznych w wykrywaniu raka szyjki macicy 82

Wykres 17. A. Wykresy krzywych ROC: dla cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych zastosowanych w celu wykrycia raka szyjki macicy; B. Porównania wielkości pola pod krzywą ROC (AUC) testu metylacyjnego z polami pod krzywymi ROC (AUC) pozostałych strategii diagnostycznych zastosowanych w celu wykrycia raka szyjki macicy 84

Wykaz tabel

Tabela 1. Porównanie klasyfikacji rozpoznań cytologicznych i odpowiadającej jej terminologii rozpoznań histopatologicznych (na podstawie rekomendacji PTGiP 2016)	28
Tabela 2. Porównanie rekomendacji skryningu raka szyjki macicy według amerykańskich towarzystw naukowych	34
Tabela 3. Polska nomenklatura kolposkopowa 2020 w oparciu o mianownictwo IFCPC 2011 (rekomendacje PTGiP 2020)	39
Tabela 4. Czułość i swoistość testu p16/Ki-67 oraz testu HPV DNA u pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US lub LSIL dla wyników histopatologicznych CIN2 i CIN3, na podstawie danych z metaanalizy	41
Tabela 5. Skala Reida	54
Tabela 6. Tabela kontyngencji 2x2 użyta do przeprowadzenia obliczeń statystycznych.	56
Tabela 7. Udział procentowy rozpoznań histopatologicznych w całej populacji pacjentek włączonych do badania (n=98) z podziałem na 2 grupy wiekowe <30 r.ż. i ≥30 r.ż.	60
Tabela 8. Udział procentowy różnych wariantów wyników testu na DNA HPV wśród pacjentek z poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi w całej populacji włączonej do badania (n=98).	61
Tabela 9. Udział procentowy wyników cytologicznych wśród pacjentek z poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi w całej populacji włączonej do badania (n=98).	62
Tabela 10. Udział procentowy dodatnich i ujemnych wyników testu metylacyjnego wśród poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w całej populacji włączonej do badania (n=98).	64
Tabela 11. Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla wykrycia osobno zmian CIN2, CIN3 i raka szyjki macicy.	66
Tabela 12. Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla wykrycia zmian ≥CIN2, ≥CIN3 i raka szyjki macicy.	67
Tabela 13. Parametry diagnostyczne testu metylacyjnego dla wykrycia zmian ≥CIN2, ≥CIN3 i raka szyjki macicy w podgrupach kobiet <30 r.ż. i ≥30 r.ż.	68
Tabela 14. Korelacja między wynikiem testu metylacyjnego a zakażeniem HPV - analiza rozkładu zidentyfikowanych typów HPV u pacjentek z dodatnim wynikiem testu metylacyjnego w stosunku do pacjentek z ujemnym wynikiem testu metylacyjnego. Test Chi ²	69

Tabela 15. Iloraz szans (OR) na wystąpienie wyróżnionych zmian histopatologicznych: CIN2, CIN3 i $\geq$ CIN3 (w stosunku do zmian $\leq$ CIN1), na podstawie oceny wystąpienia dodatniego wyniku testu metylacyjnego.....	69
Tabela 16. Porównanie ilości wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wykrywanych przez poszczególne metody diagnostyczne dla zmian $\geq$ CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania..	71
Tabela 17. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.	72
Tabela 18. Porównanie cytodiagnostyki przy progu odcięcia ASC-US+, LSIL+, HSIL+, testu na DNA HPV i testu metylacyjnego w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.....	75
Tabela 19. Porównanie ilości wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wykrywanych przez poszczególne metody diagnostyczne dla zmian $\geq$ CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania..	76
Tabela 20. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.	77
Tabela 21. Porównanie cytodiagnostyki przy progu odcięcia ASC-US+, LSIL+, HSIL+, testu na DNA HPV i testu metylacyjnego w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania.....	80
Tabela 22. Porównanie ilości wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wykrywanych przez poszczególne metody diagnostyczne dla rozpoznania raka szyjki macicy w całej populacji pacjentek włączonych do badania.	81
Tabela 23. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu raka szyjki macicy w całej populacji pacjentek włączonych do badania.....	82
Tabela 24. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w grupie pacjentek <30 r.ż.....	85
Tabela 25. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN2 w grupie pacjentek $\geq$ 30 r.ż.....	86
Tabela 26. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w grupie pacjentek <30 r.ż.....	86
Tabela 27. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian $\geq$ CIN3 w grupie pacjentek $\geq$ 30 r.ż.....	87

Tabela 28. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu raka szyjki macicy w grupie pacjentek <30 r.ż. 88

Tabela 29. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu raka szyjki macicy w grupie pacjentek ≥30 r.ż. 88

Tabela 30. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian CIN2 w całej populacji pacjentek włączonych do badania. 89

Tabela 31. Porównanie parametrów diagnostycznych cytodiagnostyki, testu na DNA HPV, testu metylacyjnego i kombinacji testów podwójnych w wykrywaniu zmian CIN3 w całej populacji pacjentek włączonych do badania. 90

Piśmiennictwo

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, i wsp. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer; GLOBOCAN 2020. Dostępne na stronie: <https://gco.iarc.fr/today>, [data dostępu: 19/02/2021].
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, i wsp. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249.
3. Chatterjee S, Gupta D, Caputo TA, Holcomb K. Disparities in Gynecological Malignancies. *Front Oncol*. 2016;6:36.
4. Maguire RL, Vidal AC. Disparities in Cervical Cancer Incidence and Mortality: Can Epigenetics Contribute to Eliminating Disparities? W: *Advances in Cancer Research*, Vol 133. Pod redakcją: Ford ME, Watson DK. Elsevier; 2017:129-156.
5. Mann L, Foley KL, Tanner AE, Sun CJ, Rhodes SD. Increasing Cervical Cancer Screening Among US Hispanics/Latinas: A Qualitative Systematic Review. *J Cancer Educ Off J Am Assoc Cancer Educ*. 2015;30(2):374-387.
6. Olusola P, Banerjee HN, Philley JV, Dasgupta S. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*. 2019;8(6):622.
7. Tefera F, Mitiku I. Uptake of Cervical Cancer Screening and Associated Factors Among 15–49-Year-Old Women in Dessie Town, Northeast Ethiopia. *J Cancer Educ*. 2017;32(4):901-907.
8. Cunningham MS, Skrastins E, Fitzpatrick R, i wsp. Cervical cancer screening and HPV vaccine acceptability among rural and urban women in Kilimanjaro Region, Tanzania. *BMJ Open*. 2015;5(3):e005828.
9. Mboumba Bouassa RS, Prazuck T, Lethu T, Jenabian MA, Meye JF, Bélec L. Cervical cancer in sub-Saharan Africa: a preventable noncommunicable disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(6):613-627.
10. Devarapalli P, Labani S, Nagarjuna N, Panchal P, Asthana S. Barriers affecting uptake of cervical cancer screening in low and middle income countries: A systematic review. *Indian J Cancer*. 2018;55(4):318.
11. ECIS - European Cancer Information System. European Union; 2021. Dostępne na stronie: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, [data dostępu: 22/02/2021].
12. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(5):579-583.
13. Grigore M, Popovici R, Pristavu A, Grigore AM, Matei M, Gafitanu D. Perception and use of Pap smear screening among rural and urban women in Romania. *Eur J Public Health*. 2017;27(6):1084-1088.

14. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy; 2018. Dostępne na stronie: <http://onkologia.org.pl/raporty/>, [data dostępu: 25/02/2021].
15. Nowakowski A, Janik B, Klimiuk A, Macios A, Maślanowska I, Bednoż B. Pilotaż zastosowania badania molekularnego w kierunku wirusa brodawczaka ludzkiego wysokiego ryzyka (HPV HR) jako nowego testu przesiewowego w programie profilaktyki raka szyjki macicy w Polsce. Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne na stronie: <http://profilaktykaraka.coi.waw.pl/pilotaz-badan-hpv-dna/>, [data dostępu: 25/02/2021].
16. Grzybowski P. Dane o realizacji programów. Według stanu na dzień 1 marca 2021 r. Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ); 2021. Dostępne na stronie: <http://www.nfz.gov.pl/dla-pacjenta/programy-profilaktyczne/dane-o-realizacji-programow>, [data dostępu: 22/03/2021].
17. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, i wsp. 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*. 2018;391(10125):1023-1075.
18. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol*. 2009;45:S3-S12.
19. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, i wsp. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-19.
20. Arroyo LS. Human Reference clones. International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center. Karolinska Institutet; 2021. Dostępne na stronie: https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/, [data dostępu: 4/03/2021].
21. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1-17.
22. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, i wsp. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048-1056.
23. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer; 2021. Dostępne na stronie: <https://gco.iarc.fr/>, [data dostępu: 4/03/2021].
24. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010;202(12):1789-1799.

25. Harro CD, Pang YY, Roden RB, i wsp. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):284-292.
26. Zhang J, Cheng K, Wang Z. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2020;302(6):1329-1337.
27. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, i wsp. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-459.
28. Berti FCB, Pereira APL, Cebinelli GCM, Trugilo KP, Brajão de Oliveira K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;34:1-13.
29. Bosch FX, Qiao YL, Castellsagué X. CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Int J Gynecol Obstet.* 2006;94:S8-S21.
30. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 90, Human Papillomaviruses. IARC; 2007:113-117.
31. Shanmugasundaram S, You J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses.* 2017;9(8):229.
32. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
33. Nguyen HP, Ramírez-Fort MK, Rady PL. The Biology of Human Papillomaviruses. W: Human Papillomavirus: Bench to Bedside, Current Problems in Dermatology, Vol 45. Pod redakcją: Ramírez-Fort MK, Khan F, Rady PL, Tying SK. S. KARGER AG; 2014:19-32.
34. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol.* 2003;77(8):4818-4826.
35. Buck CB, Cheng N, Thompson CD, i wsp. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *J Virol.* 2008;82(11):5190-5197.
36. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 2009;143(2):195-208.
37. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *J Virol.* 2003;77(24):13125-13135.
38. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* 2011;19(1):33-39.

39. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-560.
40. Magal S, Jackman A, Ish-Shalom S, i wsp. Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J Gen Virol*. 2005;86:611-621.
41. Van Doorslaer K, Burk RD. Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology*. 2012;433(1):216-219.
42. Egawa N, Wang Q, Griffin HM, i wsp. HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006282.
43. Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. 2011;1809(11-12):668-677.
44. Honegger A, Schilling D, Sülthmann H, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F. Identification of E6/E7-Dependent MicroRNAs in HPV-Positive Cancer Cells. W: *MicroRNA and Cancer: Methods and Protocols*. Pod redakcją: Wu W. Springer; 2018:119-134.
45. Broders AC. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *J Am Med Assoc*. 1932;99(20):1670-1674.
46. Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer*. 1953;6(2):224-234.
47. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*. 1967;10(4):748-784.
48. Reich O, Regauer S, McCluggage WG, Bergeron C, Redman C. Defining the Cervical Transformation Zone and Squamocolumnar Junction: Can We Reach a Common Colposcopic and Histologic Definition? *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol*. 2017;36(6):517-522.
49. Kędzia H, Kędzia W. Nowotwory Nabłonkowe Szyjki Macicy. W: *Nowotwory Narządów Płciowych Kobiety, Diagnostyka patomorfologiczna, Postępowanie kliniczne*, Wyd. 2. MedPharm Polska; 2010:177-240.
50. Kędzia W, Karowicz-Bilińska A, Spaczyński M. Nowotwory Szyjki Macicy. Nowotwory szyjki macicy. W: *Praktyczna Ginekologia Onkologiczna*. Pod redakcją: Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Wielkopolskie Towarzystwo Onkologii Ginekologicznej; 2012:91-109.
51. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, i wsp. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;360:k499.

52. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
53. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Karowicz-Bilińska A, Kędzia W, Spaczyński R. Skryning. W: *Praktyczna Ginekologia Onkologiczna*. Pod redakcją: Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Wielkopolskie Towarzystwo Onkologii Ginekologicznej; 2012;23-27.
54. Nasierowska-Guttmejer A, Kędzia W, Rokita W, i wsp. Polish recommendations regarding diagnostics and treatment of cervical squamous intraepithelial lesions according to the CAP/ASCCP guidelines. *Ginekol Pol*. 2016;87(9):670-676.
55. Rokita W, Kędzia W, Pruski D, i wsp. Comparison of the effectiveness of cytodiagnosics, molecular identification of HPV HR and CINtecPLUS test to identify LG SIL and HG SIL. *Ginekol Pol*. 2012;83(12):894-898.
56. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*. 2011;12(9):880-890.
57. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, i wsp. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer*. 2012;130(3):602-610.
58. Dijkstra MG, Niekerk D van, Rijkaart DC, i wsp. Primary hrHPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening: How to Manage Screen-Positive Women? A POBASCAM Trial Substudy. *Cancer Epidemiol Prev Biomark*. 2014;23(1):55-63.
59. Spaczyński M, Karowicz-Bilinska A, Kędzia W, i wsp. Costs of population cervical cancer screening program in Poland between 2007-2009. *Ginekol Pol*. 2010;81(10):750-756. Polish.
60. Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji. Wydział Świadczeń Opieki Zdrowotnej. Cytologia na podłożu płynnym w ramach programu profilaktyki raka szyjki macicy - kwalifikacja świadczenia. Raport w sprawie oceny świadczenia opieki zdrowotnej. 2018. Dostępne na stronie: <https://bipold.aotm.gov.pl/index.php/zlecenia-mz-2017>, [data dostępu: 24/03/2021].
61. Astbury K, Martin CM, Ring M, i wsp. Future molecular aspects of cervical cytology. *Curr Diagn Pathol*. 2006;12(2):104-113.
62. Tidy JA, Mason WP, Farrell PJ. A new and sensitive method of screening for human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol*. 1989;74(3 Pt 1):410-414.
63. Reid R, Greenberg MD, Lorincz A, i wsp. Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(6 Pt 1):1461-1471.

64. Cox JT, Schiffman MH, Winzelberg AJ, Patterson JM. An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. *Obstet Gynecol.* 1992;80(3 Pt 1):389-395.
65. Sitarz K, Szostek S. Food and drug administration — approved molecular methods for detecting human papillomavirus infection. *Ginekol Pol.* 2019;90(2):104-108.
66. Cubie HA, Seagar AL, McGoogan E, i wsp. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Pathol.* 2001;54(1):24-29.
67. Bottari F, Boveri S, Iacobone AD, i wsp. Transition from Hybrid Capture 2 to Cobas 4800 in Hpv detection: sensitivity and specificity for Cin2+ in two time periods. *Infect Dis Lond Engl.* 2018;50(7):554-559.
68. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, i wsp. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2020;24(2):102-131.
69. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, i wsp. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* 2008;337:a1754
70. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, i wsp. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol.* 2011;12(7):663-672.
71. Samorząd Województwa Opolskiego. Program polityki zdrowotnej w kierunku wczesnego wykrywania wirusa human papilloma-virus (HPV) w województwie opolskim. Okres realizacji programu 2016-2020. 2014. Dostępne na stronie: <https://rpo.opolskie.pl/?p=106>, [data dostępu: 28/03/2021].
72. Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, i wsp. Cost-Effectiveness of Cervical-Cancer Screening in Five Developing Countries. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2158-2168.
73. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Updated Guidelines for Management of Cervical Cancer Screening Abnormalities. ACOG; 2020. Dostępne na stronie: <https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-advisory/articles/2020/10/updated-guidelines-for-management-of-cervical-cancer-screening-abnormalities>, [data dostępu: 1/04/2021].
74. US Preventive Services Task Force; Curry SJ, Krist AH, Owens DK, i wsp. Screening for Cervical Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 2018;320(7):674-686.
75. Fontham ETH, Wolf AMD, Church TR, i wsp. Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(5):321-346.

76. Jin XW, Lipold L, Foucher J, i wsp. Cost-Effectiveness of Primary HPV Testing, Cytology and Co-testing as Cervical Cancer Screening for Women Above Age 30 Years. *J Gen Intern Med.* 2016;31(11):1338-1344.
77. Ge Y, Christensen P, Luna E, Armylagos D, Schwartz MR, Mody DR. Performance of Aptima and Cobas HPV testing platforms in detecting high-grade cervical dysplasia and cancer. *Cancer Cytopathol.* 2017;125(8):652-657.
78. Duvlis S, Popovska-Jankovic K, Arsova ZS, Memeti S, Popeska Z, Plaseska-Karanfilska D. HPV E6/E7 mRNA versus HPV DNA biomarker in cervical cancer screening of a group of Macedonian women: HPV E6/E7 mRNA and HPV DNA Biomarker in Cervical Cancer Screening. *J Med Virol.* 2015;87(9):1578-1586.
79. Ruan Y, Liu M, Guo J, Zhao J, Niu S, Li F. Evaluation of the accuracy of colposcopy in detecting high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2020;302(6):1529-1538.
80. Jach R, Mazurec M, Trzeszcz M, i wsp. COLPOSCOPY 2020 - COLPOSCOPY PROTOCOLS: A Summary of the Clinical Experts Consensus Guidelines of the Polish Society of Colposcopy and Cervical Pathophysiology and the Polish Society of Gynaecologists and Obstetricians. *Ginekol Pol.* 2020;91(6):362371.
81. Jach R, Mazurec M, Nowakowski A, Pityński K. KOLPOSKOPIA 2020: POLSKA NOMENKLATURA KOLPOSKOPOWA w oparciu o mianownictwo IFCPC 2011, Podsumowanie Konsensusu Ekspertów, Rekomendacje Grupy Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników oraz Polskiego Towarzystwa Kolposkopii i Patofizjologii Szyjki Macicy. 2020. Dostępne na stronie: <https://www.ptgin.pl/rekomendacje-ptgip-0>, [data dostępu: 7/04/2021].
82. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer.* 2019;10(12):2654-2660.
83. Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. 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 Cytopathol.* 2019;127(3):169-180.
84. Waddington CH. Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature.* 1942;150(3811):563-565.
85. Lorincz AT. Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. *Acta Cytol.* 2016;60(6):501-512.
86. Burnett TS, Sleeman JP. Uneven distribution of methylation sites within the human papillomavirus la genome: possible relevance to viral gene expression. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(23):8847-8860.
87. Au Yeung CL, Tsang WP, Tsang TY, Co NN, Yau PL, Kwok TT. HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep.* 2010;24(6):1599-1604.

88. Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*. 2007;26(11):1650-1655.
89. Lorincz AT, Brentnall AR, Vasiljević N, i wsp. HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. *Int J Cancer*. 2013;133(3):637-644.
90. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*. 2010;11(3):191-203.
91. Luttmer R, De Strooper LMA, Steenbergen RDM, i wsp. Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(9):961-974.
92. Snellenberg S, De Strooper LMA, Hesselink AT, i wsp. Development of a multiplex methylation-specific PCR as candidate triage test for women with an HPV-positive cervical scrape. *BMC Cancer*. 2012;12(1):551.
93. Jiménez-Wences H, Martínez-Carrillo DN, Peralta-Zaragoza O, i wsp. Methylation and expression of miRNAs in precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection. *Oncol Rep*. 2016;35(4):2297-2305.
94. De Strooper LMA, van Zummeren M, Steenbergen RDM, i wsp. CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J Clin Pathol*. 2014;67(12):1067-1071.
95. De Strooper LMA, Meijer CJLM, Berkhof J, i wsp. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2014;7(12):1251-1257.
96. Becton Dickinson. BD Totalys SlidePrep [informacja o produkcji firmy Becton Dickinson]. 2017;500019394(01). Polish.
97. Roche Molecular Systems, Inc. Cobas® 4800 HPV Test, Do stosowania w diagnostyce in vitro [informacja o produkcji firmy Roche Diagnostics GmbH]. Doc. Rev. 5.0. 2012;05990335001-05. Polish.
98. Malloy C, Sharris J, Herdman C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low-Resource Settings. Dostępne na stronie: <https://screening.iarc.fr/doc/HPV-DNA-Testing-Issues.pdf>, [data dostępu: 10/09/2021].
99. Zymo Research Corporation. Instrukcja zestawu EZ DNA Methylation™ Kit, Numery katalogowe: D5001 oraz D5002 [informacja o produkcji firmy Zymo Research]. Wersja 1.2.6. Polish.
100. QIAGEN. QIAure Methylation Test - Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi) [informacja o produkcji firmy QIAGEN]. Wersja 1. 2019;HB-2304-004;1117742. Polish.

101. Kłosiński W, Jędrzejczyk S, Guzowski G, Klimek H, Sieroszewski P. Usefulness of Reid Colposcopic Index (RCI) in the analysis of colposcopic images. *Menopausal Rev.* 2012;4:324-328.
102. Kushwah S, Kushwah B. Correlation of two colposcopic indices for predicting premalignant lesions of cervix. *J -Life Health.* 2017;8(3):118.
103. Vahedpoor Z, Behrashi M, Khomehchian T, Abedzadeh-Kalahroudi M, Moravveji A, Mohmadi-Kartalayi M. Comparison of the diagnostic value of the visual inspection with acetic acid (VIA) and Pap smear in cervical cancer screening. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2019;58(3):345-348.
104. Song T, Seong SJ, Lee SK, i wsp. Searching for an ideal cervical cancer screening model to reduce false-negative errors in a country with high prevalence of cervical cancer. *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol.* 2020;40(2):240-246.
105. Ma DY, Dong Y, Feng H, Wang TT, Zhao J. Analysis of factors influencing the false-negative diagnosis of cervical/vaginal liquid based cytology. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2020;49(8):806-811. Chinese.
106. Gupta N, John D, Dudding N, Crossley J, Smith JHF. Factors contributing to false-negative and potential false-negative cytology reports in SurePath™ liquid-based cervical cytology. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol.* 2013;24(1):39-43.
107. Moukarzel LA, Angarita AM, VandenBussche C, i wsp. Preinvasive and Invasive Cervical Adenocarcinoma: Preceding Low-Risk or Negative Pap Result Increases Time to Diagnosis. *J Low Genit Tract Dis.* 2017;21(2):91-96.
108. Tao X, Zhang H, Wang L, i wsp. Atypical squamous cells of undetermined significance cervical cytology in the Chinese population: Age-stratified reporting rates, high-risk HPV testing, and immediate histologic correlation results. *Cancer Cytopathol.* 2021;129(1):24-32.
109. Tanabodee J, Thepsuwan K, Karalak A, i wsp. Comparison of Efficacy in Abnormal Cervical Cell Detection between Liquid-based Cytology and Conventional Cytology. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2015;16(16):7381-7384.
110. Sodhani P, Gupta S, Singh V, Sehgal A, Halder K, Parashari A. Sensitivity of the Pap Test in Detecting High Grade Lesions. *Acta Cytol.* 2006;50(2):181-184.
111. Davey DD, Souers RJ, Goodrich K, Mody DR, Tabbara SO, Booth CN. Bethesda 2014 Implementation and Human Papillomavirus Primary Screening: Practices of Laboratories Participating in the College of American Pathologists PAP Education Program. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(10):1196-1202.
112. De Vuyst H, Claeys P, Njiru S, i wsp. Comparison of pap smear, visual inspection with acetic acid, human papillomavirus DNA-PCR testing and cervicography. *Int J Gynecol Obstet.* 2005;89(2):120-126.

113. Depuydt CE, Makar AP, Ruymbeke MJ, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. BD-ProExC as Adjunct Molecular Marker for Improved Detection of CIN2⁺ after HPV Primary Screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(4):628-637.
114. Mahmud SM, Sangwa-Lugoma G, Nasr SH, i wsp. Comparison of human papillomavirus testing and cytology for cervical cancer screening in a primary health care setting in the Democratic Republic of the Congo. *Gynecol Oncol.* 2012;124(2):286-291.
115. Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, i wsp. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: The FASE study. *Int J Cancer.* 2011;129(3):691-701.
116. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, i wsp. Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: A Cross-Sectional Comparative Trial of Multiple Techniques to Detect Cervical Neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2001;83(2):439-444.
117. Ogilvie GS, van Niekerk D, Krajden M, i wsp. Effect of Screening With Primary Cervical HPV Testing vs Cytology Testing on High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia at 48 Months: The HPV FOCAL Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018;320(1):43-52.
118. Gilham C, Sargent A, Kitchener HC, Peto J. HPV testing compared with routine cytology in cervical screening: long-term follow-up of ARTISTIC RCT. *Health Technol Assess Winch Engl.* 2019;23(28):1-44.
119. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, i wsp. Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *Int J Cancer.* 2018;143(4):735-745.
120. Kim MK, Lee IH, Lee KH, i wsp. DNA methylation in human papillomavirus-infected cervical cells is elevated in high-grade squamous intraepithelial lesions and cancer. *J Gynecol Oncol.* 2016;27(2):e14.
121. Kelly H, Benavente Y, Pavon MA, De Sanjose S, Mayaud P, Lorincz AT. Performance of DNA methylation assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2019;121(11):954-965.
122. Bonde J, Floore A, Ejegod D, i wsp. Methylation markers FAM19A4 and miR124-2 as triage strategy for primary human papillomavirus screen positive women: A large European multicenter study. *Int J Cancer.* 2021;148(2):396-405.
123. Lai HC, Ou YC, Chen TC, i wsp. PAX1/SOX1 DNA methylation and cervical neoplasia detection: a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Cancer Med.* 2014;3(4):1062-1074.

124. Verhoef VMJ, Bosgraaf RP, van Kemenade FJ, i wsp. Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(3):315-322.
125. De Strooper LMA, Hesselink AT, Berkhof J, i wsp. Combined CADM1/MAL Methylation and Cytology Testing for Colposcopy Triage of High-Risk HPV-Positive Women. *Cancer Epidemiol Prev Biomark.* 2014;23(9):1933-1937.
126. Verhoef VMJ, van Kemenade FJ, Rozendaal L, i wsp. Follow-up of high-risk HPV positive women by combined cytology and bi-marker CADM1/MAL methylation analysis on cervical scrapes. *Gynecol Oncol.* 2015;137(1):55-59.
127. van Baars R, van der Marel J, Snijders PJF, i wsp. CADM1 and MAL methylation status in cervical scrapes is representative of the most severe underlying lesion in women with multiple cervical biopsies. *Int J Cancer.* 2016;138(2):463-471.
128. Vink FJ, Meijer CJLM, Clifford GM, i wsp. FAM19A4/miR124-2 methylation in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Int J Cancer.* 2020;147(4):1215-1221.
129. Verlaat W, Van Leeuwen RW, Novianti PW, i wsp. Host-cell DNA methylation patterns during high-risk HPV-induced carcinogenesis reveal a heterogeneous nature of cervical pre-cancer. *Epigenetics.* 2018;13(7):769-778.
130. Bu Q, Wang S, Ma J, i wsp. The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1182.
131. Lin CJ, Lai HC, Wang KH, i wsp. Testing for methylated PCDH10 or WT1 is superior to the HPV test in detecting severe neoplasms (CIN3 or greater) in the triage of ASC-US smear results. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(1):21.e1-7.
132. Li SR, Wang ZM, Wang YH, i wsp. Value of PAX1 Methylation Analysis by MS-HRM in the Triage of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(14):5843-5846.
133. Xu J, Xu L, Yang B, Wang L, Lin X, Tu H. Assessing methylation status of PAX1 in cervical scrapings, as a novel diagnostic and predictive biomarker, was closely related to screen cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(2):1674-1681.
134. De Strooper LMA, Verhoef VMJ, Berkhof J, i wsp. Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol Oncol.* 2016;141(2):341-347.
135. Hesselink AT, Heideman DAM, Steenbergen RDM, i wsp. Methylation marker analysis of self-sampled cervico-vaginal lavage specimens to triage high-risk HPV-positive women for colposcopy. *Int J Cancer.* 2014;135(4):880-886.

136. Luttmer R, De Strooper LMA, Berkhof J, i wsp. Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *Int J Cancer*. 2016;138(4):992-1002.
137. De Strooper LMA, Berkhof J, Steenbergen RDM, i wsp. Cervical cancer risk in HPV-positive women after a negative FAM19A4/mir124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int J Cancer*. 2018;143(6):1541-1548.
138. Dick S, Kremer WW, De Strooper LMA, i wsp. Long-term CIN3+ risk of HPV positive women after triage with FAM19A4/miR124-2 methylation analysis. *Gynecol Oncol*. 2019;154(2):368-373.
139. Vink FJ, Lissenberg-Witte BI, Meijer CJLM, i wsp. FAM19A4/miR124-2 methylation analysis as a triage test for HPV-positive women: cross-sectional and longitudinal data from a Dutch screening cohort. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(1):125.e1-125.e6.
140. Floore A, Hesselink A, Oštrbenk A, i wsp. Intra- and inter-laboratory agreement of the FAM19A4/mir124-2 methylation test: Results from an international study. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(4):e22854.
141. Dippmann C, Schmitz M, Wunsch K, i wsp. Triage of hrHPV-positive women: comparison of two commercial methylation-specific PCR assays. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):171.

Załącznik 1 – zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 36/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 r. Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu leczniczego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat w złożeniu tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 469); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat w złożeniu wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 10 stycznia 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. n. med. Witold Kędzia

Miejsce prowadzenia badań:

**Klinika Ginekologii, Katedra Perinatologii i Ginekologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Anna Lewek

Członkowie zespołu

**badawczego: prof. dr hab. n. med. Witold Kędzia
lek. Anna Lewek**

Temat badań:

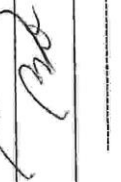
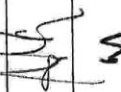
**„Analiza przydatności metylacji wybranych genów w wykrywaniu
śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy w porównaniu do metody
molekularnej i cytodiagnostyki”.**

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr 36/19 z dnia 10.01.2019r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	ks. prof. UAM dr hab. Andrzej Bohdanowicz	teologia	Wydział Teologiczny Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Wieżowa 2/4, Poznań	
6.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
7.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
8.	mgr Krystyna Malingier	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Zakład Zdrowia Publicznego UMP, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Wojciech Szluzewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
12.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
13.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
14.	prof. dr hab. Joanna Twarowska- Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	